

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

**Präklinische Evaluation des Adapter CAR Systems
(AdCAR-T)**

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

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

vorgelegt von

Hau, Jana Mi-Young

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P.J. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Tag der Disputation: 10.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebserkrankungen	1
1.2	Neuroblastom und akute lymphatische Leukämie (ALL)	2
1.3	Therapieansätze (pädiatrischer) Tumoren	3
1.4	Immuntherapien	4
1.5	CAR-T-Zellen	6
1.5.1	Aufbau und Funktionsweise	6
1.5.2	Klinische Erfolge konventioneller CAR-T-Therapien	9
1.6	Limitationen konventioneller CAR-Therapien	10
1.7	Neue CAR-T Entwürfe	14
1.8	Einleitung der AdCAR-T Technologie	16
1.9	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Programme	21
2.1.3	Zubehör	21
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.5	Medien	23
2.1.6	Antikörper	25
2.1.7	Zelllinien	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultivierung	27
2.2.2	Isolierung von PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)	28
2.2.3	Magnetische Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS)	29
2.2.4	T-Zell Aktivierung	31
2.2.5	Transfektion und Transduktion	33

2.2.6	Molekularer Aufbau der AdCAR-T Konstrukte	34
2.2.7	Generierung von Adaptermolekülen mittels Biotinylierung	35
2.2.8	Expressionsfärbungen	36
2.2.9	Luciferase Zytotoxizitäts Assay	37
2.2.10	xCELLigence (Real-Time Cytotoxicity Assay, RTCA).....	39
2.2.11	Intrazelluläre Färbung (Intracellular Staining, ICS)	42
2.2.12	Durchflusszytometrische Analyse und Zellsortierung (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS).....	43
2.2.13	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Expression chimärer Antigenrezeptoren.....	46
3.2	Vergleich der AdCAR-T Konstrukte unterschiedlicher Spacerlänge [IgG4 (XS), CD8 (S), IgG4 (M), IgG4 (L) und IgG4 (XL)]	49
3.3	AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse unter verschiedenen E:T Verhältnissen.....	56
3.4	AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse unter verschiedenen Antikörperdosierungen.....	62
3.5	AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse mit unbiotinyliertem Antikörper oder Antikörper irrelevanter Spezifität.....	66
3.6	AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse mit freiem Biotin und Humanserum	70
4	Diskussion	74
4.1	Bisherige Adapter-CAR Systeme.....	75
4.2	Das AdCAR-System ist effektiv und kontrollierbar	79
4.3	Das AdCAR-System ist spezifisch und sicher	80
4.4	Das AdCAR-System ist universal und flexibel	81
4.5	Das AdCAR-System <i>in vivo</i>	84
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	86
5	Zusammenfassung.....	87

6	Referenzen	89
7	Abbildungsverzeichnis	96
8	Erklärung zum Eigenanteil	98
9	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Allophycocyanin
AdCAR-T	Adapter CAR-T-Zelle
ADCC	antibody dependent cell mediated cytotoxicity
ADPC	antibody-dependent cellular phagocytosis
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-presenting cell
AS	Aminosäure
ATC	aktivierte T-Zellen
BBIR	biotin-binding immune receptor
BCMA	b-cell maturation antigen
BCR	B-Zell Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BUV	Brilliant UltraViolet
BV	Brilliant Violet
BV	Brentuximab Vedotin
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor
CCR	chimeric costimulatory receptor
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
CRS	cytokine release syndrom
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DCC	deleted in colorectal cancer
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
E:T	Effektor : Target

EBV	Epstein-Barr-Virus
EBV-CTLs	Epstein-Barr-Virus spezifische cytotoxische T-Lymphozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	food and drug administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FR α	Folatrezeptor α
FSC	Forward light scatter
GM-CSF	granulozyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Good Manufacturing Practice
GvHD	Graft-versus-Host Disease
HEK	Human embryonic kidney
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	humanes Leukozytenantigen
huEGFRt	humanes EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) Polypeptid
iCAR	inhibitorischer chimärer Antigenrezeptor
iCasp9	inducible caspase 9
ICOS	Inducible costimulator
ICS	Intracellular Staining
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LLE	linker/label epitope
LNGFR	low-affinity nerve growth factor
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLL	mixed lineage leukemia

MM	Multiples Myelom
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NSCLC	non-small cell lung cancer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OPCML	opioid binding protein/cell-adhesion molecule-like
PAX5	paired box gene 5
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripher blood mononuclear cell
PBS(E)	Phosphat buffered saline (EDTA)
PD-1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNE	peptide neoepitope
PSCA	prostate stem cell antigen
PSMA	prostate-specific membrane antigen
PTLD	posttransplantation lymphoproliferative disease
ROR	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tet transaktivator
scFv	single chain variable fragment
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSC	Sideward light scatter
TcR	T-Zell Rezeptor
Tet	Tetracyclin
TIL	Tumordinfiltrierender Lymphozyt
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TM	targeting module
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Zur heutigen Zeit erkrankt laut Robert-Koch-Institut jeder zweite Erwachsene, unabhängig vom Geschlecht, an Krebs. In Deutschland beträgt die Anzahl an Neuerkrankungen jährlich knapp 480.000, während die Mortalität bei 225.000 für beide Geschlechter liegt. Die 5-Jahres-Überlebensrate unterliegt nach wie vor einem breiten Spektrum, das von sehr günstigen bis äußerst schlechten Raten, beispielsweise beim Pankreaskarzinom, reicht. Die wachsende Bevölkerung und fortschreitende medizinische Entwicklung führt zu einer zunehmenden Veränderung der Altersverteilung. Darin liegt ein wesentlicher Grund, dass die Krebsinzidenz im letzten Jahrzehnt um 6% bei Männern und 9% bei Frauen gestiegen ist [1].

Die jährliche Inzidenz pädiatrischer Krebserkrankungen liegt derzeit bei 16,7% aller Kinder unter 15 Jahren. 8,4% der Betroffenen entwickeln in den darauffolgenden 30 Jahren sogar mindestens eine weitere Neoplasie [2]. Eine präventive Vorbeugung von Krebserkrankungen ist nach wie vor schwierig [3]. Die Verteilung der verschiedenen pädiatrischen Krebsarten liegt anders als bei Erwachsenen (**Abb. 1.1**). Hervorgehoben werden muss die Anzahl embryonaler Tumoren, darunter das Neuroblastom, sowie die hämatologischen Erkrankungen, die eine zentrale Rolle im Kindesalter sowie in der Jugend einnehmen. Sie treten bei Kindern vor allem in der akuten Form auf, chronische Formen sind im Gegensatz zu Erwachsenen sehr selten [2]. Etwa ein Drittel aller Diagnosen fällt dabei auf Leukämien, der zweitgrößte Teil fällt auf die ZNS-Tumoren (24,6%), gefolgt von den Lymphomen (10,7%) [1].

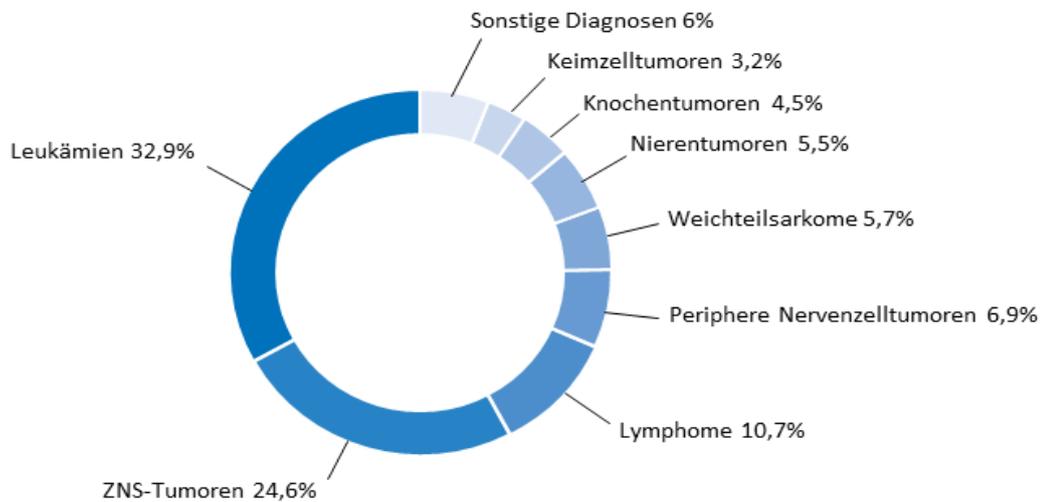


Abb. 1.1 Diagnosespektrum der Krebsarten bei Kindern (Daten von 2004-2015)

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung pädiatrischer Krebserkrankungen, darunter fällt der größte Teil auf Leukämien (**Robert Koch Institut 2017, Krebs in Deutschland für 2013/2014**) [1].

1.2 Neuroblastom und akute lymphatische Leukämie (ALL)

Ein wichtiger Vertreter embryonaler Tumoren mit etwa 8% aller pädiatrischen Tumoren ist das Neuroblastom, der häufigste extrakranielle solide Tumor im jungen Kindesalter mit einer Inzidenz von 140 in Deutschland. Ursächlich entarten Zellen des sympathischen Nervensystems und treten vor allem im Grenzstrang links und rechts der Wirbelsäule sowie im Nebennierenmark auf [4, 5]. Genetische Mutationen oder veränderte Chromosomen sowie Umweltfaktoren werden diskutiert, die genaue Herkunft der Erkrankung ist jedoch noch nicht geklärt.

Das Gangliosid GD2 ist ein Oberflächenmarker, der auf neuroektodermalen Tumoren wie dem Neuroblastom oder Subgruppen des Melanoms, aber auch auf gesundem Gewebe exprimiert wird [6]. Es wird in dieser Arbeit als Zielantigen gegen die Neuroblastomlinie LS verwendet (siehe **Kap. 2.1.7**).

Bisher besteht die Behandlung vor allem aus operativen Verfahren und Chemotherapie. Neue immuntherapeutische Konzepte, wie der Einsatz von GD2 Antikörpern [7-9] oder dem adoptiven Transfer virusspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) mit anti-GD2 CARs [10] werden jedoch zunehmend Teil der Behandlung.

Die ALL wird zu den malignen Neoplasien des blutbildenden Systems gezählt. Sie macht etwa 80% aller Leukämien im Kindesalter aus. Durch einen gestörten Reifeprozess entstehen unreife Zellen (Blasten), die in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Die Ursache der Krankheit ist weiterhin unklar. Ionisierende Strahlung, Zytostatika, Infektionen, Umweltfaktoren oder genetische Mutationen (z.B. Trisomie 21) wurden bisher als bekannte Risikofaktoren diskutiert [11]. Neben bisher vermuteten Umwelt- und Infektionsfaktoren rücken zunehmend Veränderungen des Immunsystems ins Zentrum der Forschung.

Die Behandlung umfasst grundsätzlich (Poly-) Chemotherapie, Strahlenbehandlung und Stammzelltransplantationen. Dank moderner neuer Therapiekonzepte beträgt die Heilungsrate der ALL mittlerweile über 90% [12, 13]. Dennoch gibt es Kinder, die eine Erkrankung mit ungünstigen Prognosefaktoren aufweisen, wie initial hohe Leukozytenzahlen oder eine allgemein schlecht therapierbare Leukämie Subgruppe. Deren Überlebensrate ist nach wie vor schlecht und liegt nach 5 Jahren bei nur 50 – 60% [11, 14].

1.3 Therapieansätze (pädiatrischer) Tumoren

Die Tumorthherapie basiert grundsätzlich auf drei Pfeilern: Chemotherapie, chirurgische Intervention und Bestrahlung. Jede Therapie an sich hat Vorteile, doch auch strenge Limitationen. Chirurgische Interventionen setzen eine gute Zugänglichkeit zum OP-Gebiet und einen operablen soliden Tumor voraus. Oft wird eine Kombination mit (neo-) adjuvanten Maßnahmen nötig. Sobald Bestrahlung und Chemotherapie benötigt werden, sind die Patienten häufig erheblichen Nebenwirkungen ausgesetzt. Mit Neurotoxizität, beeinträchtigtem

Immunsystem, gastrointestinalen Beschwerden, Gewichtsabnahme oder Fatigue sind nur einige Nebenwirkungen genannt.

In den letzten Jahrzehnten konnte erfreulicherweise ein Rückgang der Mortalität an pädiatrischen Krebserkrankungen verzeichnet werden. Statistisch signifikant sank die Mortalitätsrate bei spezifischen Krebsarten zwischen 2000 und 2010, darunter die des Neuroblastoms und der akuten lymphatischen Leukämie [15]. Dank moderner neuer Therapieansätze konnte die 5-Jahres- Überlebensrate aller Krebserkrankungen bei Kindern in den letzten drei Jahrzehnten von 67% auf 85% gesteigert werden [1].

Dennoch machen die Fakten und Zahlen deutlich, dass die pädiatrischen Krebserkrankungen nach wie vor ein lohnenswertes Forschungsgebiet darstellen und eine ständige Weiterentwicklung weiterer Therapiekonzepte nötig ist.

1.4 Immuntherapien

Als vierte Therapiesäule rückt zunehmend das Konzept der Immuntherapien in den Vordergrund. Das Spektrum ist breit und umfasst unterschiedliche Therapieansätze mit monoklonalen Antikörpern, Tumorimpfstoffen oder den adoptiven Zelltransfer von T-Zellen oder natürlichen Killerzellen [16]. Die Innovation und Bedeutung der Immuntherapie in der heutigen Zeit wird deutlich am Beispiel der Immunologen *James P. Allison* und *Tasuku Honjo*, die für die Grundlagenforschung zur Checkpoint-Inhibition über die T-Zell-Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 den Medizin Nobelpreis 2018 erhielten. Patienten mit metastasiertem Melanom werden bereits mit dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab behandelt und auch die Wirkung von anti-PD1 Antikörpern wurde erfolgreich gegen ein breites Tumorspektrum nachgewiesen [17-19].

Monoklonale Antikörper sind in der Lage über eine Vielzahl von Mechanismen einen Antitumor-Effekt auszulösen. Bispezifische Antikörper beispielsweise aktivieren T-Zellen oder NK-Zellen während sie gleichzeitig an der Oberfläche der Tumorzelle binden. Über Rekrutierung und Aktivierung der Effektorzellen werden Antitumor-Effekte durch Zytokinproduktion und/oder direkte Lyse ausgelöst. Antikörper sind weiterhin in der Lage, Todesligand-Rezeptoren zu

binden, Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu blockieren oder durch Konjugation an Zytostatika oder Radioisotope den direkten Zelltod des Tumors auszulösen. Über die Bindung an Fc-Rezeptor tragende Zellen des angeborenen Immunsystems, meistens NK-Zellen oder Makrophagen, wird via ADCC die Apoptose der Tumorzelle eingeleitet. Auch die Blockade des CD47 Rezeptors (Inaktivierung des „don't eat me“ Signals) oder Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine sind einsetzbar (**Abb. 1.2**) [16, 20, 21].

Erfolgreich wurde bereits der bispezifische CD19/CD3 Antikörper Blinatumomab gegen B-ALL getestet [22, 23].

Als eines der ersten getesteten immuntherapeutischen Methoden wurden Tumorimpfstoffe gegen spezifische Tumorantigene eingesetzt. Sipuleucel-T war 2010 der erste durch die FDA anerkannte Tumorimpfstoff zum Einsatz bei Männern mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom [24].

Ein sehr vielversprechender Ansatz ist der adoptive Transfer krebsspezifischer T-Zellen. Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) konnten beeindruckende Ergebnisse liefern [25-28]. Ähnlich stellen sich antigenspezifische CTLs dar (cytolytic T cells), die Tumorspezifität durch wiederholte Stimulation antigenpräsentierender Zellen (APCs) oder durch Zytokinstimulation erreichen können [16]. Eingesetzt wurden virusspezifische CTLs in der Behandlung von Virusinfektionen immunsupprimierter Patienten oder bei Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierter lymphoproliferativer Erkrankung nach Transplantation (PTLD) [29, 30].

Da die Antigenpezifität ausschließlich über die α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors bestimmt wird, ist ein weiterer Ansatz, T-Zell-Rezeptoren genetisch auf CTLs oder T-Helferzellpopulationen zu transferieren um eine Tumorantigen- oder Virusspezifität zu erreichen [31]. Die transgenen TCRs sind strukturell identisch zu nativen TCRs, unterliegen aber der MHC-Restriktion und sind auf Patienten beschränkt, die das selbe HLA-Allel aufweisen [16].

Eine elegante Form MHC-unabhängiger Signalerkennung stellen chimäre Antigenrezeptoren (CARs) dar (siehe **Kap. 1.5**).

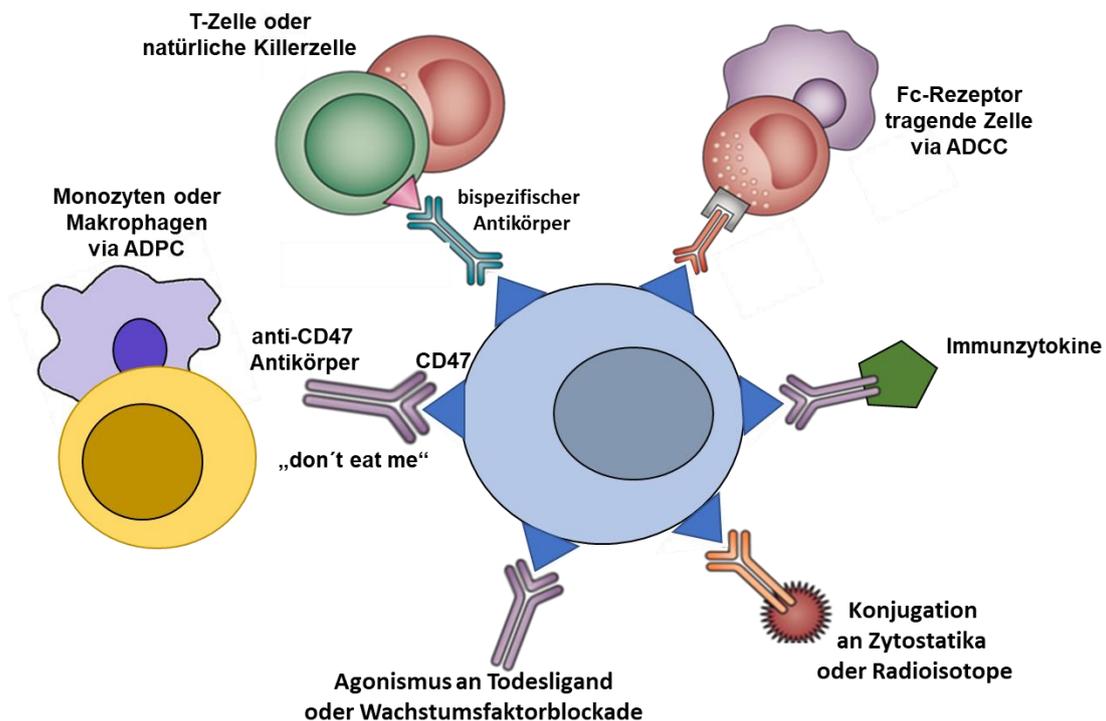


Abb. 1.2 Spektrum monoklonaler Antikörper Antitumor-Effekte auszulösen

Monoklonale Antikörper, bispezifische Antikörperkonstrukte und Fusionsproteine sind über diverse Mechanismen einsetzbar, um antitumorale Effekte auszulösen (**adaptiert aus Mackall et al. 2014, *Immune-based therapies for childhood cancer. Nature Reviews Clinical Oncology* [16, 20, 21].**

1.5 CAR-T-Zellen

1.5.1 Aufbau und Funktionsweise

Bereits in den frühen 90er Jahren wurden die chimären Antigenrezeptoren von *Gross und Eshhar et al.*, gefolgt von *Goverman et al.* beschrieben [32-34]. Prinzipiell ist die Leitidee, spezifische MHC-unabhängige Antigenerkennung mit der Aktivierung einer T-Zelle zu kombinieren. Um diese Eigenschaften zu verbinden, ist ein CAR folgendermaßen aufgebaut (**Abb. 1.3**) [16]: Es wird ein extrazellulärer Teil von einem Intrazellulären unterschieden. Die extrazelluläre

Domäne setzt sich aus einem spezifischen scFv (single chain variable fragment) -Teil eines monoklonalen Antikörpers und einem Platzhalter (Spacer) zusammen. Über eine CD8 Transmembran ist sie an die intrazelluläre Signaldomäne konjugiert. Besteht diese lediglich aus der CD3 ζ Kette einer T-Zelle, wird das CAR als eines der „ersten Generation“ bezeichnet. Wird eine co-stimulierende Signaldomäne zwischengeschaltet, ändert sich die Bezeichnung in eines der „zweiten Generation“ und in Anwesenheit zweier co-stimulierender Signaldomänen in die eines der „dritten Generation“. Dabei kann es sich beispielsweise um die co-stimulierenden Domänen CD27, CD28, CD134 (OX40), CD244, CD278 (ICOS (inducible costimulator)) oder CD137 (4-1BB) handeln [35]. Wie viele Studien nachweisen konnten, wird die Effektivität durch co-Stimulation gesteigert und somit auch die T-Zell Proliferation und Persistenz [36-39]. Die erste eingebaute co-stimulierende Domäne CD28 bewirkte einerseits eine drastisch steigende Produktion von IL-2, andererseits erhöhte sie die Persistenz der CAR-T-Zellen gegenüber regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) [35, 40, 41]. Studien, die die in dieser Arbeit verwendete co-stimulierende Domäne CD137 (4-1BB) untersuchten, konnten allerdings überlegene Ergebnisse bezüglich Langzeitüberleben der T-Zellen *in vivo* und antileukämischer Effizienz im Vergleich zur CD28-Domäne aufweisen [35, 36].

Unklar ist weiterhin, ob CARs dritter Generation denen mit nur einer inkorporierten co-Signaldomäne überlegen sind [42, 43].

Neben der Varietät der co-stimulierenden Domäne wird als Signaldomäne üblicherweise die CD3 ζ Kette einer T-Zelle verwendet [35]. Es wurden aber auch Fc γ Rezeptor-Signaldomänen in Versuchen gegen Ovarialkarzinome beschrieben [44].

Die Spacerregion stammt von einem CD8 oder IgG4 Molekül ab. Für die Interaktion zwischen CAR-T- und Tumorzelle ist diese Domäne von Wichtigkeit, da sie die Beweglichkeit der Antigenbindungsdomäne beeinflusst und den Abstand zwischen beiden Zellen bestimmt [35]. Diese Interaktion und Bedeutung der Länge des Spacers wurde in Experimenten gegen diverse Tumorantigene wie CD22, CD19, CEA (karzinoembryonales Antigen), NCAM (neurales

Zelladhäsionsmolekül), das onkofetale Antigen 5T4 und ROR1 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1) [45-52] untersucht.

Der exakte Mechanismus der CAR-vermittelten Signaltransduktion ist nicht vollständig geklärt. Nachweislich finden viele der physiologischen TCR-mediierten Vorgänge während der Aktivierung durch chimäre Antigenrezeptoren statt, dazu gehören beispielsweise die Tyrosinphosphorylierung der signaltransduzierenden intrazellulären Untereinheiten der Signaldomäne oder die Rekrutierung der ZAP-70 Kinase [53]. *Bridgeman et al.* zeigten in ihrer Studie, dass die Signaltransduktion in der CAR-Therapie nach Antigenbindung zum einen direkt über die Aktivierung der Signaldomäne der T-Zelle und zum anderen indirekt über assoziierte Ketten im TCR-Komplex vermittelt wird [54].

Es gibt verschiedene Wege, die CARs in die T-Zellen zu transferieren. Eine Methode, die wenig zu Immunogenität aber zu permanenter Genexpression führt, ist der Transfer über einen lentiviralen Vektor [35], der auch in dieser Arbeit verwendet wurde (siehe **Kap. 2.2.5**).

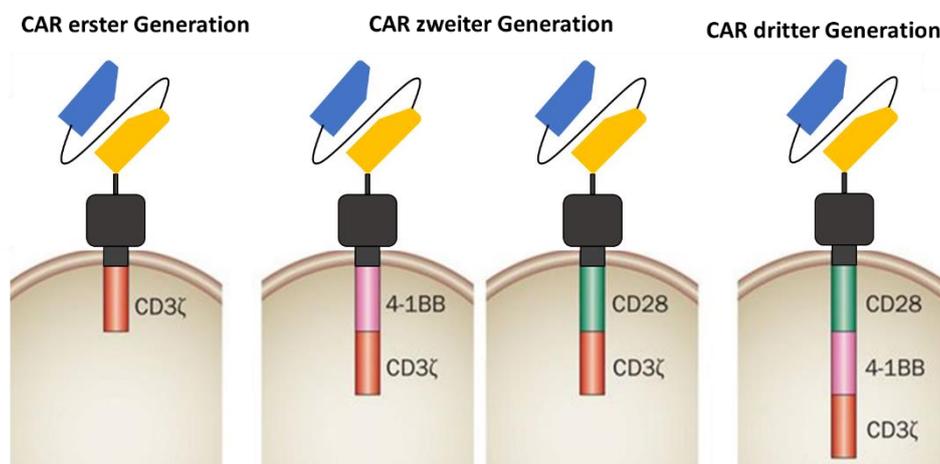


Abb. 1.3 Aufbau CARs erster bis dritter Generation

Das Schaubild zeigt die Bestandteile verschiedener CAR-Generationen. Die erste Generation enthält intrazellulär lediglich die CD3 ζ Kette. In Anwesenheit einer oder mehrerer co-stimulierender Signaldomänen wird es CAR der „zweiten“ oder „dritten Generation“ genannt (adaptiert aus Mackall et al. 2014, *Immune-based therapies for childhood cancer*, *Nature Reviews Clinical Oncology*) [16].

1.5.2 Klinische Erfolge konventioneller CAR-T-Therapien

Der adoptive T-Zell-Transfer mit CARs konnte bisher bemerkenswerte klinische Ergebnisse erzielen.

Am besten und häufigsten untersucht wurde der Therapieansatz bisher gegen das Tumorantigen CD19. Patienten mit ALL, die ein Rezidiv erleiden, sind trotz bestehender aggressiver Therapieansätze schwer behandelbar. *Maude et al.* beschreiben anti-CD19 CAR modifizierte T-Zellen als „eine Therapie, die viele Limitationen der Bisherigen überwinden könnte.“ In ihrer Studie konnte bemerkenswerterweise eine komplette Remission bei 27 von 30 Patienten mit ALL-Rezidiv (> 90%) erreicht werden, darunter Patienten mit Blinatumomab-resistenter Erkrankung oder Patienten nach bereits durchlaufener Stammzelltransplantation [55].

Weitere erfolgreiche Ergebnisse mit zum Teil kompletten Remissionsraten gegen ALL [56-59] und CLL [60] wurden beschrieben.

Neben der lymphatischen Leukämie wurden CAR-T-Zellen aber auch gegen ein breiteres Spektrum an hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wie Non-Hodgkin Lymphomen [61, 62], dem Multiplen Myelom [63] oder dem selteneren Hodgkin-Lymphom untersucht. Bei Letzterem wurde bisher unter anderem das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Brentuximab Vedotin (BV) therapeutisch angewandt, dieses Konjugat beinhaltet einen CD30 Antikörper [35]. Als Therapieoption im Falle eines Rezidivs nach vorangegangener BV-Behandlung, stellt die CAR-T-Zell Therapie eine alternative Methode der zellulären Immuntherapie dar [64, 65].

Als vielversprechende Angriffspunkte in der Immuntherapie gegen AML haben sich die Oberflächenmarker CD33 und CD123 (IL-3 Rezeptor α Kette) herausgestellt [35]. Eine gegen diese beiden Tumorantigene gerichtete CAR-Therapie führte erfolgreich zu einer Verminderung der AML Tumorzellen [66].

Auch solide Tumoren sind Ziel der CAR-Therapie. Diverse GD2 Antikörper beispielsweise, einfach oder in Kombination mit IL2 und/oder GM-CSF (granulozyte macrophage colony-stimulating factor), wie ch14.18 [7, 67, 68], 3F8 [69, 70] und 14.G2A [71, 72] wiesen klinischen Benefit und einen vielversprechenden Ansatz in diesem Therapiesetting auf.

Zusammenfassend stellt sich der adoptive Transfer mit CAR-T-Zellen im weiten Feld der hämatologisch-onkologischen Erkrankungen sowohl als primäre Therapieoption als auch im Falle eines Rezidivs als eine sehr aussichtsvolle Strategie dar. Trotz dieser Erfolge existiert eine Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen, die bisher schwer zu kontrollieren sind.

1.6 Limitationen konventioneller CAR-Therapien

Die CAR-T-Zellen konnten hocheffektive und dauerhafte Ergebnisse in klinischen Untersuchungen aufweisen. Doch es sind Nebenwirkungen in diesem Therapiekonzept zu verzeichnen, die ernstzunehmend sind und sogar lebensbedrohlich enden können.

Konventionelle CAR-Ts erkennen über den extrazellulären spezifischen scFv-Teil das Tumorantigen. Über die intrazelluläre Signaldomäne erfolgt die Aktivierung der T-Zelle in Anwesenheit des jeweiligen Antigens in jedem Falle beziehungsweise wird in dessen Abwesenheit gestoppt. Es existieren also nur zwei Zustände: „on state“ und „off state“. Sind die CAR-Ts einmal im Körper angelangt, expandieren sie >1000fach und ohne jegliche Kontrolle solange das Antigen präsent ist [73]. Der Körper reagiert darauf mit einer massiven Ausschüttung von Zytokinen. Dieser „Zytokinsturm“ (cytokine release syndrome, CRS) ist die häufigste Nebenwirkung im Rahmen der CAR-Therapie. Es stellt ein „Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom“ (SIRS) dar, einen antigenunabhängigen Ausnahmezustand des Körpers ähnlich einer Sepsis [74, 75]. Dabei wird das Syndrom klinisch manifest, wenn eine supraphysiologisch hohe Anzahl an Lymphozyten und/oder myeloischen Zellen aktiviert wird und eine große Menge an inflammatorischen Zytokinen ausgeschüttet [75]. Es können milde erkältungsähnliche Symptome auftreten aber auch hohes Fieber > 40° C, Dyspnoe, Hypotonie und Hypoxie bis hin zu fatalen tödlichen Verläufen durch Verbrauchskoagulopathie und Multiorganversagen [76-78]. Laut *Maude et al.* besteht eine Korrelation zwischen der Entwicklung eines CRS und der Effektivität der CAR-T-Therapie: Diejenigen Patienten, die kein CRS entwickelten, schienen

auch weniger von der Therapie zu profitieren, als diejenigen, die ein schweres CRS erlitten [78]. Die Behandlung von Patienten, die ein schweres CRS erleiden, ist beschränkt. Grundlage bildet eine intensivmedizinische Versorgung mit Vasopressoren, Beatmung, Antiepileptika und Antipyretika, während die gezielte medikamentöse Therapie rar ist [77]. Als Angriffspunkt hat sich das Zytokin IL-6 als zentraler Mediator der Entzündungsreaktion in der Behandlung des CRS herausgestellt [75]. Es führt jedoch bei exzessiver Ausschüttung zu fatalen überschießenden Immunantworten [79]. Als Blockade des IL-6 Signalweges ist der humanisierte monoklonale anti-IL-6 Rezeptor Antikörper Tocilizumab der am besten untersuchteste und bis 2014 auch der einzig durch die FDA zugelassene IL-6 Inhibitor [78]. Im Falle eines ungenügenden Ansprechens auf Tocilizumab werden als Zweitlinientherapie lediglich Kortikosteroide in der Behandlung des schweren CRS empfohlen [74, 75], die jedoch möglicherweise hemmend auf die CAR-T-Zellen wirken und somit das Rezidivrisiko der Erkrankung nach initial gutem Ansprechen begünstigen könnten [77].

Auch neurotoxische Symptome wie fokale neurologische Defizite bis hin zu generalisierten epileptischen Anfällen, Enzephalopathien, Bewusstseinsstörungen und komatösen Zuständen werden beschrieben [57, 76, 77]. Diese allgemein als Neurotoxizität zusammengefasste Symptomatik ist die zweithäufigste Nebenwirkung im CAR-T-Therapiesetting. Dass ähnliche Nebenwirkungen bei Patienten unter Behandlung mit dem bispezifischen Antikörper Blinatumomab beobachtet wurden, legt die Vermutung nahe, dass die Neurotoxizität in Beziehung zur T-Zell Aktivierung steht [23]. Die Therapie wird gleichsam dem CRS mit Tocilizumab und Kortikosteroiden empfohlen [57, 77].

Weiterhin ist der Angriff von Tumorantigenen auf gesundem Gewebe („On-Target off-Tumor Toxizität“) eine relevante Nebenwirkung der CAR-T-Zell Therapie. Die Oberflächenmarker werden in den meisten Fällen nicht exklusiv auf Tumorzellen, sondern auch auf weiterem gesundem Gewebe exprimiert. Laut den CAR-Erstbeschreibern *Gross und Eshhar et al.*, wird „die Sicherheit der Therapie mit CAR-T-Zellen durch deren Fähigkeit bestimmt, zwischen Tumorzellen und

gesundem Gewebe zu unterscheiden“ [6]. Das „ideale“ Antigen wird ubiquitär auf Tumorzellen, aber nicht auf gesundem Gewebe exprimiert. Exklusiv auf Tumoren exprimierte Oberflächenmarker sind jedoch selten [78]. Folglich bergen T-Zell basierte Immuntherapien Gefahrenpotential für die sogenannte „On-Target off-Tumor Toxizität“ [80, 81]. Wesentlich häufiger sind Oberflächenmarker, die im Körper von gesundem Gewebe co-exprimiert werden. Gehäuft auf der Oberfläche von Tumorzellen der hämatologischen Erkrankungen ALL, CLL und NHL vorkommend sind die Antigene CD19, CD20 und CD22 [6]. Diese sind in vielen Studien Angriffspunkt der Therapien. Dabei stellt das B-Zell Antigen CD19 den am erfolgreichsten durch CAR-Therapien getesteten Oberflächenmarker dar, da es spezifisch für die B-Zell-Linie ist und daher, neben gesunden B-Zellen, auf nahezu allen B-Zell-Erkrankungen exprimiert wird [78, 81, 82]. Die Vermutung, dass auch gesunde B-Zellen durch CAR-Therapien angegriffen werden, konnte in diversen Studien beobachtet werden. Es bestätigten sich erwartungsgemäß eine anhaltende B-Zell-Aplasie und Hypogammaglobulinämie [60, 83-85].

Zuletzt haben Tumoren im Laufe der Zeit diverse Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen dem Immunsystem verborgen zu bleiben (Immunevasion). Diese zwar bekannte Strategie nimmt im CAR-T-Konzept jedoch neue bisher nicht aufgetretene Dimensionen an. Sie ist Teil der letzten Phase des sogenannten „Immunoeditings“. Dieses besteht aus der Eliminierungs-, Gleichgewichts- und Escape-Phase. Letztere umfasst Strategien wie die Herabregulation und Abwesenheit spezifischer Tumorantigene, die Überlebenssteigerung durch Überexprimierung von anti-apoptischen Molekülen wie Bcl2 oder die Schaffung einer immunsuppressiven Umgebung für den Tumor [86]. Nicht umsonst wurde die Strategie der Immunevasion als einer der „hallmarks of cancer“ aufgenommen [87]. Ein Hauptmechanismus der Tumoren ist der Verlust des therapielevanten Antigens beziehungsweise Epitopes („antigen-“ oder „epitope-loss“). Getriggert wird dieses Phänomen durch die lange Persistenz der CAR-T-Zellen im menschlichen Körper mit folgendem andauernden Selektionsdruck gegen beispielsweise CD19 [88, 89]. In der CAR-

T-Zell Therapie pädiatrischer Patienten gegen CD19⁺ B-ALL wird bei 10-20% der Behandelten ein Rezidiv durch Epitop-Verlust beschrieben [90]. In einer Subgruppe dieser Patienten konnten *Sotillo et al.* in diversen Proben Missense- und Nonsense-Mutationen im Exon 2 von CD19 als auch Splicing Varianten der CD19 mRNA nachweisen. Diese Mutationen führen zu einer CD19 Variante mit veränderter CD19-Funktionalität und Epitop-Erkennung. Das konventionelle CD19 Epitop konnte weder per FACS-Analyse nachgewiesen noch von den CAR-T-Zellen erkannt werden [90]. So führen die Mutationen zu einer Resistenz gegenüber dem Therapieansatz. Weiterhin wurde beobachtet, dass dieser Mechanismus zu alternativen CD19 Isoformen mit Beibehaltung des eigentlichen CD19 Proteins führt, die sogar Proliferationsvorteile für die leukämischen Zellen darstellen können. Zytoplasmische und extrazelluläre CD19-Ektodomänen stellen deshalb möglicherweise einen alternativen Angriffspunkt in diesem Setting dar, deren Rolle in der Proliferation und Differenzierung der physiologischen B-Zell Entwicklung jedoch noch ungeklärt ist [90].

Eine weitere Hypothese nach *Ruella et al.* beschreibt eine angeborene Prädisposition von CD19 negativen Vorläuferzellen, die die Immunevasion durch Antigenverlust begünstigen könnte [88] .

Weiterhin besitzen frühe B-Vorläuferzellen die Fähigkeit zum Wechsel in andere hämatopoetische Abstammungsreihen [91]. Dieser als „myeloid linear switch“ bezeichnete Mechanismus stellt eine weitere Form der Immunevasion dar, der im Rahmen der CAR-T-Zell Therapien beobachtet wurde. Es führte nicht der alleinige Verlust von CD19 zu einem Wechsel in eine andere Leukämieform, sondern ein vollständiges „Umprogrammieren“ der Abstammungsreihe, wie der Verlust wichtiger Transkriptionsfaktoren, war erforderlich. Diese Beobachtung unterstreicht die Annahme einer anlagebedingten Plastizität jeweiliger spezifischer Leukämieformen, die das Potenzial der Umprogrammierung bestimmt [91].

1.7 Neue CAR-T Entwürfe

Die Behandlung schwerer Nebenwirkungen der Therapie mit konventionellen CARs ist stark begrenzt. Sie umfasst vor allem die irreversible Elimination der T-Zellen sowie immunsuppressive Maßnahmen, die wiederum schwerwiegende Sekundärkomplikationen auslösen können. Diese fehlende Unterscheidung zwischen nützlichem und schädlichem Effekt macht die bisherige symptomatische Therapie unbefriedigend [92]. Deshalb wurden bereits diverse neue CAR-Systeme entwickelt, die als Verbesserung des bisherigen konventionellen Therapieansatzes folgende Voraussetzungen erfüllen müssen:

1. Kontrollierbarkeit durch regelbare Aktivierung des Systems („on-state“)
2. Erhöhte Sicherheit durch regelbare Inaktivierung des Systems („off-state“)
3. Flexibilität durch temporären Wechsel zwischen „on“- und „off-state“
4. Universalität durch sequenziellen oder simultanen Angriff multipler Antigene („multiple targeting“)

Eine Möglichkeit die CAR-T-Zellen zu inaktivieren, ist die Therapie mit Suizidgenen (suicide switch) wie Caspasen, die die Apoptose der T-Zellen induzieren, sobald diese unerwünschte Wirkungen zeigen [73, 93, 94]. Ein großer Nachteil dieser Therapie ist die irreversible Elimination der CAR-T-Zellen mit nachfolgender Progression der Tumorerkrankung.

Weiterhin existiert der Ansatz inhibitorischer chimärer Antigenrezeptoren (iCARs). Nach dem physiologischen Muster inhibitorischer Immunrezeptoren kreierte *Fedorov et al.* PD-1 - und CTLA-4 – basierte iCARs, die in der Lage sind, die T-Zell-Antwort präventiv und antigenspezifisch zu hemmen. Das iCAR wird zusätzlich auf der T-Zelle exprimiert und beinhaltet eine Antigenerkennungsdomäne kombiniert mit einer stark inhibitorischen Domäne, abstammend von den inhibitorischen Immunrezeptoren PD-1 und CTLA-4 [92]. Das Zielantigen wird idealerweise auf „Off-Target“ Gewebe, nicht aber auf den Tumorzellen exprimiert. Sobald die iCARs auf „Off-Target“ Gewebe treffen, wird

das Antigen gebunden, die inhibitorische Signaldomäne aktiviert und somit die T-Zell-Aktivierungsdomäne gehemmt. Sie limitieren so nachweislich temporär die Proliferation der T-Zellen, Zytokinausschüttung und Zytotoxizität [92, 95]. Grundsätzlich sind jedoch das richtige „Timing“ sowie die Intensität der T-Zell-Aktivität von co-inhibitorischen Signaldomänen nicht zu steuern [73].

Im Gegensatz zur Idee, die T-Zell-Aktivierung zu hemmen, entwickelten *Wu et al.* ein „ON-switch“ CAR, das auf einer Positiv-Regulierung von primär inaktiven CAR-T-Zellen basiert. Sie werden erst durch ein externes Signal, in Form von beispielsweise eines kleinen Moleküls, aktiviert. Durch die gute Steuerbarkeit kann der Zeitpunkt der T-Zell-Aktivierung beispielsweise verzögert und das Auftreten toxischer „first pass“ Nebenwirkungen, die unmittelbar nach Gabe der CAR-T-Zellen entstehen, verhindert werden [73].

Dass bispezifische Aktivierung ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie darstellt, konnte anhand diverser Studien mit dem bispezifischen CD3/CD19 Antikörper Blinatumomab gezeigt werden [23, 96].

Basierend auf dem gleichen Prinzip entwickelten *Grada et al.* ein Tandem-CAR (tanCAR), das in der Lage ist, statt einem einzigen gleichzeitig multiple krebsspezifische Zielantigene anzugreifen. Als größter Vorteil der dualen Funktionalität des tanCARs wird angesehen, dass die Abhängigkeit von einem Antigen durch multiple Bindungsdomänen mit möglicher Immunevasion durch Epitopverlust wesentlich geringer wird. Weiterhin wurde nicht nur die erfolgreiche Induktion der T-Zell-Funktion gegen einzeln getestete Antigene nachgewiesen. Die T-Zell-Aktivierung und Lyse der Zielzellen wird durch den simultanen Angriff zweier verschiedener Tumorantigene nachweislich synergistisch verstärkt. Das Spektrum heterogener Antigene von Tumoren und deren Umgebung, die behandelt werden könnten, wird durch Effektoren multipler Spezifität stark erweitert [97].

1.8 Einleitung der AdCAR-T Technologie

Die Besonderheit des Adapter CAR-T (nachfolgend AdCAR-T genannt) Systems liegt darin, dass die Antigenerkennung und T-Zell-Aktivierung in zwei unterschiedlichen Prozessen ablaufen. Den ersten Teil des Systems stellt die Erkennung und Bindung des Tumorantigens durch ein Adaptermolekül, wie einen spezifischen monoklonalen Antikörper, dar. Davon getrennt ist der spezifische scFv-Teil der AdCAR exprimierenden T-Zelle in der Lage, das mit Biotin markierte Adaptermolekül zu erkennen und zu binden. So erfolgt in diesem zweiten Schritt die Aktivierung der T-Zelle und damit die Vermittlung der Effektorfunktionen, z.B. die Lyse der Tumorzelle (**Abb. 1.4**). Die Bindung der AdCAR-Ts an das Adaptermolekül erfolgt spezifisch. Bei konventionellen CAR-T Zellen erfolgt die Bindung an ein Tumorantigen hingegen direkt über einen extrazellulären Teil (**Abb. 1.5**).

Biotin (Vitamin B7, Vitamin H) ist ein natürlicherweise im Körper vorkommendes wasserlösliches Vitamin. Es fungiert als Coenzym bei der Verstoffwechslung von Fetten und Kohlenhydraten. Der Bedarf an Biotin ist nicht sicher geklärt, Schätzwerte belaufen sich auf eine tägliche Menge von etwa 30 – 60 µg [98].

Die physiologische Konzentration im menschlichen Körper ist sehr variabel und beträgt etwa 0,4 - 1,2 µg/l. Circa 12% des gesamten Biotins im Plasma ist kovalent an Proteine gebunden, 7% sind reversibel gebunden und 81% des Biotins sind frei im Plasma [99, 100].

Bisher wurden verschiedene Adapter-CAR Technologien entwickelt (siehe **Kap. 4.1**).

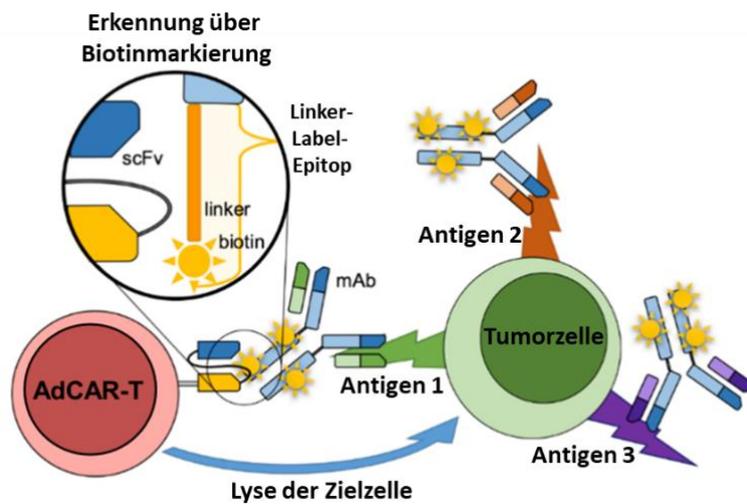


Abb. 1.4 Funktionsweise der AdCAR Technologie

AdCAR-T erkennen tumorassoziierte Antigene auf Zielzellen indirekt über biotinylierte Adaptermoleküle z.B. monoklonale Antikörper. Die Bindungsdomäne (scFv) erkennt Biotin im Kontext einer spezifischen Linkerstruktur, die im Schaubild als Linker-Label-Epitop dargestellt ist. Über das gebundene Adaptermolekül an der Zielzelle wird das AdCAR-T aktiviert und vermittelt analog zu konventionellen CAR-T Zellen ein Aktivierungssignal (adaptiert aus Seitz, Mittelstät, **Hau** et al. 2020, *Adapter CARTM T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*) [101].

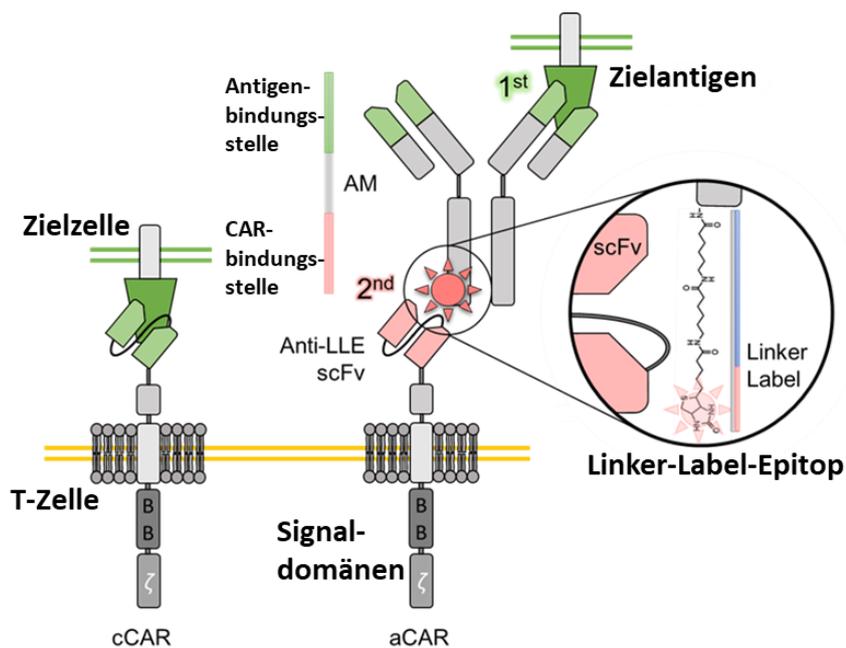


Abb. 1.5 Die AdCAR Technologie im Vergleich mit konventionellen CAR-Ts

Im Gegensatz zur neuen AdCAR-T Technologie (im Schaubild aCAR) wird das Aktivierungssignal bei konventionellen CAR-T Zellen (im Schaubild cCAR) über eine direkte Bindung eines extrazellulären Teils an ein Tumorantigen ausgelöst (adaptiert aus Seitz, Mittelstät, **Hau** et al. 2020, *Adapter CARTM T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*) [101].

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die präklinische Evaluation einer neuen Adapter CAR Technologie (AdCAR). Bei konventionellen CAR Technologien erfolgt eine direkte Erkennung Oberflächen-exprimierter Antigene. Bei Adapter-CAR-Technologien erfolgt die Antigenerkennung indirekt über ein zwischengeschaltetes Adaptermolekül. AdCAR erkennen nicht ein Oberflächen-exprimiertes Antigen, sondern eine Biotinylierung im Kontext einer spezifischen Linkerstruktur auf einem austauschbaren Adaptermolekül. Die Biotinylierung kann chemisch oder enzymatisch an jegliche Adaptermoleküle konjugiert werden. Das System stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen CAR-T-Technologie mit erhöhter Steuer- und Kontrollierbarkeit, Flexibilität und Universalität dar. Bisher konnte die Tumorthherapie mit CAR-Ts in den letzten Jahren bemerkenswerte klinische Ergebnisse lediglich bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems erzielen.

In dieser Arbeit werden fünf Adapter-CAR-T Konstrukte (AdCAR-Ts) der zweiten Generation (co-stimulierende Signaldomäne 4-1BB) mit unterschiedlichen Spacerlängen gegeneinander getestet. Die Transduktion erfolgt mittels eines lentiviralen Transfervektors der zweiten Generation. Es erfolgt die durchflusszytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienz anhand des trunkierten Markergens LNGFR sowie deren MACS-Anreicherung, um vergleichbare Konditionen zu schaffen.

An Adaptermolekülen werden die biontynylierten monoklonalen Antikörper CD19 4G7SDIE sowie GD2 ch14.18 (b-4G7SDIE und b-ch14.18) gegen die B-ALL Vorläufer Zelllinie NALM6 (CD19⁺) und die Neuroblastomzelllinie LS (GD2⁺) funktionell getestet. Als Positivkontrolle dienen konventionelle CD19- und GD2

CAR-T Zellen der zweiten Generation im gleichen Backbone (Grundstruktur des CARs). Die funktionelle Aktivität wird im Hinblick auf das Verhältnis von CAR-T Zellen zu Tumorzellen als auch im Hinblick auf die Adaptermolekülkonzentration und deren Spezifität getestet. Mittelfristiges Ziel ist die klinische Translation der AdCAR-Technologie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Blutanalysegerät ABX Micros CRP 100	Horiba
Brutschrank HERAcell	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Gefrierschrank	Liebherr
Inversionsmikroskop IX50	Olympus
Kryokonservierungstank	Cryostorage System
Kühlschrank	Liebherr, Bosch
Lichtmikroskop CX40LF200	Olympus
LSR II Flow Cytometer	BD™ Biosciences
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec
Mehrkanalpipette 20-200µl	Brand
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Pipetman: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Pipette Research 2,5µl	Eppendorf
Pipettiergerät PIPETBOY	Integra Biosciences
Schüttler Titramax 100	Heidolph
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus
Standzentrifugen:	Hettich
- ROTANTA 46 RSC	
- ROTIXA 50 RS	
Victor 1420 Multilabel Counter	Counter Wallac
Vortexer:	
- MS1 Minishaker	IKA Works
- Reax Top	Heidolph
Wasserbad	Memmert, Köttermann
xCELLigence RTCA	ACEA Biosciences

2.1.2 Programme

BD FACSDiva™	BD™
Excel 2016	Microsoft
GraphPad Prism5	Statcon
RTCA Software 1.2.1	ACEA Biosciences
Wallac1420 Workstation	Wallac
Word 2016	Microsoft

2.1.3 Zubehör

Becherglas	Schott
Butterfly, Safety-Multifly-Set	Sarstedt
Deckglas	Menzel
Desinfektionsspray	Braun
Einmalhandschuhe	Hartmann
Einmalpipetten, Plastik, steril: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Costar
E-Plate VIEW 96	ACEA Bioscience
FACS Analyseröhrchen Rundboden, Polysystren (PS), 1 ml, 5 ml	BD™ Biosciences
Falconröhrchen, Polypropylen (PP), steril: 15 ml, 50 ml	Greiner
Kanülen, Microlance, 19G	BD™ Diagnostics
Kryoröhrchen, PP, steril, 2 ml	Greiner
MACS LS Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec
Mehrfachkulturplatten, steril: 96-well, 48-well, 24-well, 6-well	Costar
Mikrotiterplatte Rundboden 96-well	Costar
Neubauer Zählkammer	Assistent
Parafilm	Bemis
Pipettenspitzen: 20 µl	Ratiolab

200 µl, 1000 µl	Sarsted
Reaktionsgefäße, PP, steril, 1,5ml, 2ml	Eppendorf
Spritzen, steril:	
5 ml, 10 ml, 20 ml	Braun
50 ml	BD™ Diagnostics
Zähluhr	Ivo
Zellkulturflaschen, steril:	Greiner
50 ml, 250 ml, 550 ml	
Zellsieb, 40 µm	BD™ Biosciences

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich
Anti-Biotin MACSiBead Particles™	Miltenyi Biotec
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Biotin	Miltenyi Biotec
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Cytofix/Cytoperm	BD™ Biosciences
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
D-Luciferin synthetic	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	PAA Laboratories
G418-Selektionsantibiotikum	Biochrom
GolgiStop	BD™ Biosciences
Heparin-Natrium 25 000®-ratiopharm	Ratiopharm
Ionomycin	Sigma-Aldrich
MACSelect MicroBeads CD4 human	Miltenyi Biotec
MACSelect MicroBeads CD8 human	Miltenyi Biotec
MACSSelect LNGFR MicroBeads	Miltenyi Biotec
PFA	Merck
PMA	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom

2.1.5 Medien

Tumormedium

500 ml RPMI 1640 Medium	Biochrom
10% fetales Kälberserum (FCS) <i>(30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert)</i>	Biochrom
1% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
1% Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom

CAR Medium

500 ml TexMacs	Miltenyi Biotec
10% Humanserum	Life technologies
1% Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom
0,1% humanes IL-7 (10ng/ml)	Miltenyi Biotec
0,05 % humanes IL-15 (5ng/ml)	Miltenyi Biotec

HEK Medium

500ml DMEM	Life technologies
10% fetales Kälberserum (FCS) <i>(30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert)</i>	Biochrom
1% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
1% Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom

Medium für Cytokine Staining Assay

500 ml RPMI 1640	Biochrom
10% BSA	Sigma-Aldrich
1% L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
1% Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000µg/ml)	Biochrom

1mM Na-Pyruvat	Lonza
1% non-essential AS	Lonza
50µM beta-Mercaptoethanol	Roth

FACS Puffer

500ml Phosphat buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories
2% fetales Kälberserum (FCS) <i>(30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert)</i>	Biochrom
0,01% NaAzid	Merck
2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich

PBSE

500 ml Phosphat buffered saline (PBS)	PAA Laboratories
2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich

PermWash

500 ml Phosphat buffered saline (PBS)	PAA Laboratories
0,1% Saponin-S7900	Sigma-Aldrich
0,05% BSA A-3059	Sigma-Aldrich
0,02% NaAzid	Merck

2.1.6 Antikörper

Antigen	Klon	Konjugat	Spezies / Isotyp	Hersteller
CD10	REA877	LLE biotin	Human(recomb.) IgG1	Miltenyi
CD19	4G7SDIE	LLE biotin	Mouse IgG1	in house
CD19	REA675	LLE biotin	Human(recomb.) IgG1	Miltenyi
GD2	Ch14.18	LLE biotin	chim mouse/human IgG1	EUSA Pharma
CD3	BW264/56	Violet-Blue	Mouse IgG2a	Miltenyi
CD4	SK3	BUV395	Mouse IgG1	BD
CD8	BW135/80	APC- Vio770	Mouse IgG2a	Miltenyi
CD10	REA877	APC	Human(recomb.) IgG1	Miltenyi
CD10	HI10A	PE-CF594	Mouse IgG1	BD
CD19	REA675	APC	Human(recomb.) IgG1	Miltenyi
LLE-Biotin	Bio3	FITC, APC	Mouse IgG1	Miltenyi
CD271	REA844	FITC, APC	Human(recomb.) IgG1	Miltenyi
TNF α	MAb11	PB	Human(recomb.) IgG1	Biologend
Live/Dead	-	AF350	-	Invitrogen

2.1.7 Zelllinien

Versuche gegen das Zielantigen CD19 wurden mit *Nalm6* durchgeführt, einer pädiatrischen B-ALL Vorläufer Zelllinie in Lösung (DSMZ Nr. ACC 128).

Die adhären wachsenden Neuroblastom Zelllinie *LS* wurde zu Versuchen gegen das Zielantigen GD2 verwendet (DSMZ Nr. ACC 675).

HEK293, humane embryonale Nierenzellen transformiert mit Adenovirus Typ 5 (*Ad5*), wurden zur Transfektion (siehe **Kap. 2.2.5**) herangezogen (DSMZ Nr. ACC 305).

Die Tumorzelllinien wurden vom Leibniz-Institut, DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - zur Verfügung gestellt.

Nalm6LucmCherry ist die Firefly Luciferase exprimierende Tumorzelllinie *Nalm6*, detektierbar durch das rote Fluoreszenzprotein *mCherry*. Stabil transduziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. Irmela Jeremias, Helmholtz Zentrum München.

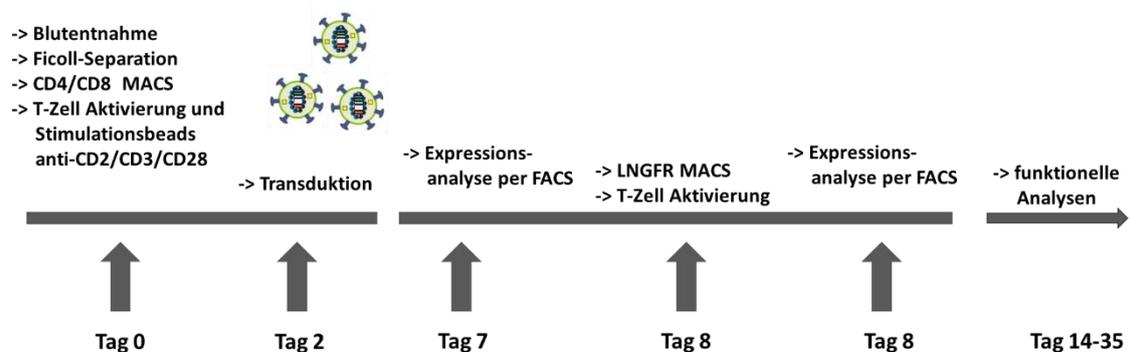


Abb. 2.1 Arbeitsplan

Das Schaubild zeigt den zeitlichen Ablauf des Arbeitsplans von der Blutentnahme der Spender, Gewinnung und Aktivierung der T-Zellen (Tag 0) über deren Transduktion (Tag 2) und Zellseparation der CAR-Ts (Tag 8) bis zur funktionellen Analyse Tag (14-35).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

2.2.1.1 Suspensionszelllinien: Nalm6 und Nalm6LucmCherry

Die in Suspension wachsenden B-ALL Vorläufer-Zelllinien werden in oben beschriebenem Tumormedium bei 37° und 5%igem CO₂-Gehalt im Brutschrank nach den Vorgaben der DSMZ kultiviert. Je nach Zelldichte wird das Tumormedium alle 1-2 Tage zum Teil erneuert, sodass eine optimale Dichte von 1x10⁶/ml Zellen vorliegt. Die Verdoppelungszeit der Tumorzellen liegt bei 36 Stunden. Die minimale Dichte von 0,5x10⁶ sowie maximale Dichte von 4-6x10⁶ sollte nicht unter- oder überschritten werden. Je nach gewünschter Menge der Zellen wird eine sterile Zellkulturflasche zwischen 50ml und 550ml verwendet [102].

2.2.1.2 Adhärenz wachsende Zelllinien: HEK und LS

Diese Tumorzelllinien wachsen einschichtig adhärenz in den jeweils oben genannten Tumormedien. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 37° und 5%igem CO₂-Gehalt. Je nach gewünschter Menge wird eine sterile Zellkulturflasche zwischen 50ml und 550ml verwendet. Um die Zellschicht besser lösen zu können, werden im ersten Schritt ca. 10ml PBS mit einer sterilen Pipette in die Kulturflasche gegeben, vorsichtig geschwenkt und wieder verworfen. Die Pipette sollte nicht an der Zellschicht kratzen. Anschließend werden 2-5ml Trypsin/EDTA Lösung hinzugefügt. Die Zellen sollten vollständig mit einem leichten Film bedeckt sein. Nach wenigen Minuten Inkubation im Brutschrank lassen sich die polymorphen Zellen, eventuell durch vorsichtiges Beklopfen des Bodens der Kulturflasche, lösen. Mit dem Inversionsmikroskop lässt sich beurteilen, ob die Tumorzellen vollständig gelöst sind. Anschließend wird mindestens die doppelte Menge, die an Trypsin/EDTA Lösung verwendet wurde, an Tumormedium hinzugegeben. Die Ränder werden sorgfältig abgespült. Die Zellen können nun nach Färbung mit Trypanblau in der Neubauerzählkammer gezählt und die gewünschte Menge entnommen werden.

HEK-Zellen werden mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6/25\text{cm}^2$ in einer Zellkulturflasche ausgesät und alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:5 oder 1:6 gesplittet.

Die Aussaat der LS-Zellen (in Vorbereitung für den XCELLigence Real-Time Cell Analysis Assay) erfolgt mit einer Zelldichte von $0,44 \times 10^6$ in einer 75ml Zellkulturflasche in 15ml Tumormedium. Die Zellen werden durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt und für drei Tage inkubiert. Am dritten Tag sollte die Konfluenz der adhärennten Zellschicht zwischen 60 und 80% betragen [103, 104].

2.2.2 Isolierung von PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)

Die Trennung verschiedener Blutbestandteile basiert auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dabei segmentieren die unterschiedlichen Bestandteile von Vollblut dichteabhängig in verschiedenen Phasen. Dazu wurde *Biocoll Separation Solution* verwendet, eine Lösung bestehend aus dem wasserlöslichen, stark verzweigten, 400.000 Dalton schweren Copolymer Saccharose-Epichlorhydrin. Die Eigenschaft, die man sich zu Nutze macht, ist die hohe Dichte von 1,1g/ml [105].

Durchführung

Zur Isolation der PBMCs wird das zuvor abgenommene Vollblut heparinisiert und in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS gemischt. Anschließend wird ein 50ml Falcon zu 15ml mit der Biocoll-Trennlösung befüllt und 20ml des PBS-Blut-Gemisches vorsichtig aufgeschichtet.

Es folgt die Dichtegradientenzentrifugation für 30 Minuten (400g, RT). Danach wird die entstandene Plasmaphase oberhalb des milchigen Lymphozytenringes abgesaugt und verworfen.

Die Lymphozytenphase wird vollständig abgesaugt und in ein weiteres 50ml Falcon überführt. Dieses wird auf 50ml mit PBS aufgefüllt und das erste Mal für 10 Minuten gewaschen (400g, RT).

Nach Ablauf der Zentrifugationszeit wird der Überstand abgekippt und der eben beschriebenen Waschschrift unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Danach sind die gewonnenen peripheren mononukleären Zellen bereit für die gewünschten Experimente und werden nach Zählung üblicherweise in Medium aufgenommen.

2.2.3 Magnetische Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS)

Ziel dieser Methode ist es, eine gewünschte Zellpopulation aus einer Zelllösung herauszufiltern. Dabei wird die Zelllösung mit 50nm kleinen Magnetpartikeln, sog. *MicroBeads*, inkubiert. Diese sind an Antikörper gegen das Antigen der gewünschten Zellpopulation gekoppelt, dies ermöglicht die Bindung der *MicroBeads* an die Zielzellen. Danach wird die Lösung durch eine spezielle Säule geleitet, die ein starkes Magnetfeld umgibt. Durch den Eisenoxidanteil der Magnetpartikel bleibt die gewünschte Zellpopulation in der Säule haften, während die depletierte Negativselektion hindurchfließt. Durch kräftiges Durchspülen kann die Positivselektion in einem getrennten Gefäß aufgefangen werden (**Abb. 2.2**).

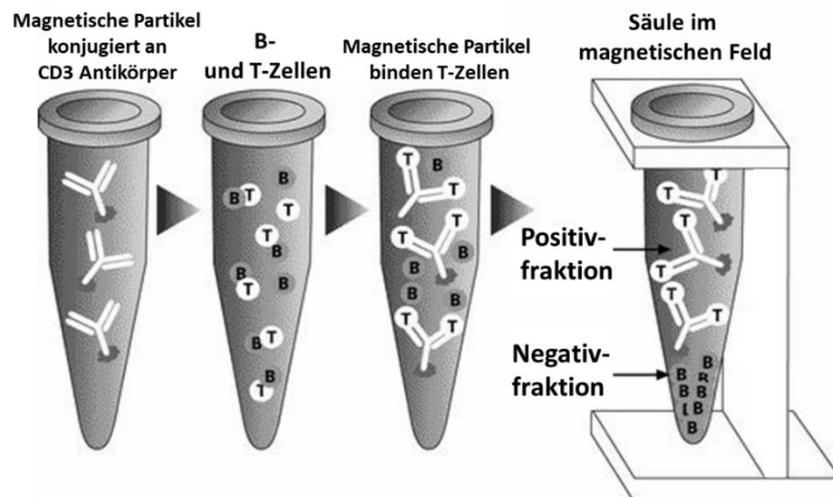


Abb. 2.2 Prinzip der magnetischen Zellseparation

Magnetpartikel binden durch gekoppelte Antikörper an der gewünschten Zellpopulation (hier T-Zellen), die im starken Magnetfeld der Säule haften bleibt (**adaptiert aus The Scientist 1999, Going Their Separate Ways: A Profile of Products for Cell Separation**) [106].

2.2.3.1 Magnetische Zellseparation von T-Zellen

Diese Methode erfolgt nach den Verfahren und Protokollen „*CD4 Microbeads human*“ und „*CD8 MicroBeads human*“ von Miltenyi Biotec [107, 108].

Zur Vorbereitung für die T-Zellseparation werden die zuvor gewonnenen PBMCs gesunder Spender gezählt und für 10 Minuten zentrifugiert (300g, RT). Der Überstand wird anschließend vorsichtig und vollständig abgenommen.

Pro 10^7 Zellen werden 160µl PBS hinzugefügt und das Zellpellet resuspendiert. Es folgt das Markieren der Zellen, indem pro 10^7 Zellen 20µl *CD4* und 20µl *CD8 MicroBeads* hinzugegeben werden. Nun wird durch vorsichtiges Resuspendieren gut gemischt und für 15 Minuten auf Eis (2-8°) inkubiert.

Um die Zellen anschließend zu waschen, werden 2ml PBS pro 10^7 Zellen hinzugefügt und für 10 Minuten zentrifugiert (300g, RT). Der Überstand wird vollständig mit einer sterilen Pipette abgenommen. Bis zu 10^8 Zellen werden in 500µl PBS Puffer aufgenommen.

Die Zellseparation erfolgt unter der Sterilbank. Zur Vorbereitung wird die LS Säule im magnetischen Feld des *MidiMACS™ Separators* platziert. Unter die Säule wird ein 50ml Falcon gestellt.

Zuerst wird sie mit Hilfe einer sterilen 5ml Pipette zu 3ml mit PBS befüllt. Kurz bevor die Flüssigkeit durchgetropft ist (wird durch Markierung angezeigt), wird die vorbereitete Zellflüssigkeit in die Säule gegeben. Je nach Menge der zu separierenden Suspension erfolgt dies in mehreren Schritten. Sobald sie vollständig durchgetropft ist, erfolgen drei Waschgänge. Die Säule wird dazu mit jeweils 3ml PBS durchgespült. Sobald das PBS nach dem letzten Waschgang vollständig durchgetropft ist, wird die Säule vorsichtig aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein 15ml Falcon gesetzt. Es werden 5ml PBS in die Säule gefüllt, der beiliegende Stempel auf die Säule platziert und kräftig durchgedrückt, sodass die Positivfraktion im Falcon aufgefangen wird.

Danach werden die Zellen gezählt und je nach gewünschten Experimenten zur Vorbereitung in Medium aufgenommen.

2.2.3.2 Magnetische Zellseparation von CAR-T-Zellen

Um die CAR T-Zellen zu separieren wird das „*MACSSelect Transfected Cell Selection*“ Protokoll von Miltenyi Biotec angewendet [109]. Die Separation erfolgt nach LNGFR.

Das Prinzip ähnelt dem der magnetischen Zellseparation von T-Zellen (siehe **Kap. 2.2.3.1**). Nachdem diese separiert und transduziert wurden, werden sie für 10 Minuten zentrifugiert (100-200g, RT). Das Zellpellet wird in 320µl PBS pro 4×10^7 Zellen resuspendiert. Für die magnetische Markierung werden sie mit 80µl *MACSSelect LNGFR MicroBeads* sorgfältig vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert (2-8°). Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Gemisch mit PBS auf 2ml pro 4×10^7 Zellen aufgefüllt. Die Vorbereitung der Zellen für die Zellseparation ist beendet.

Die LS Säule wird unter sterilen Bedingungen im magnetischen Feld des *MidiMACS™ Separators* platziert. 3ml PBS werden zum Durchspülen verwendet und in einem 50ml Falcon aufgefangen. Nachdem die Flüssigkeit fast durchgetropft ist, wird die Zellsuspension in die Säule gegeben. Es folgen vier Waschschriffe mit jeweils 3ml PBS. Die aufgefangene Zellsuspension ist die depletierte Negativselektion. Die LS Säule wird vom Zellseparator entfernt und auf ein 15ml Falcon gesetzt. Durch kräftiges Durchdrücken des beiliegenden Stempels kann die gewünschte LNGFR positive CAR-T-Zell Fraktion aufgefangen werden.

2.2.4 T-Zell Aktivierung

2.2.4.1 Aktivierung und Expansion angereicherter T-Zellen

Die Aktivierung und Expansion der T-Zellen erfolgt nach dem Protokoll und dem zugehörigen Kit „*T cell Activation/Expansion Kit human*“ von Miltenyi Biotec [110]. Das Prinzip der Methode basiert auf Nachahmung von antigenpräsentierenden Zellen, um eine Aktivierung der T-Zellen zu erzielen. Dafür werden *anti-Biotin Stimulationsbeads* verwendet, die mit biotinylierten Antikörpern gegen humanes CD2, CD3 und CD28 beladen werden.

Durchführung

Die stimulierenden Antikörper werden zunächst angesetzt. Dazu werden 100µl CD3-biotin, 100µl CD28-biotin und 100µl CD2-biotin Antikörper entnommen und vermischt. Zu der Antikörperlösung werden 500µl *Anti-Biotin MACSiBead Particles™* hinzugefügt und mit 200µl PBS auf ein Endvolumen von 1ml aufgefüllt. Die Lösung wird sorgfältig vermischt und für zwei Stunden im Kühlschrank drehend im *MACSmix™ Tube Rotator* inkubiert (4rpm, 2-8°). Anschließend werden 25µl der beladenen Stimulationsbeads pro 5×10^6 zu stimulierender T-Zellen entnommen und mit 200µl CAR-Medium vermischt und zentrifugiert (5 Min., 300g, RT). Nach Ablauf der Zentrifugationszeit wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und die Stimulationsbeads sorgfältig in 100µl frischem CAR-Medium resuspendiert. Die separierten T-Zellen werden mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 900µl CAR-Medium aufgenommen, mit den vorbereiteten Stimulationspartikeln vermischt und gründlich resuspendiert. Mit einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml/cm² werden die T-Zellen kultiviert.

Der Effekt der Stimulation kann je nach Differenzierungsgrad der T-Zellen variieren. Die Dichte wird täglich unter dem Inversionsmikroskop beurteilt. Die stimulierten Zellen werden im Laufe der folgenden Tage entsprechend in größere Platten bzw. Zellkulturflaschen aufgenommen.

2.2.4.2 Aktivierung und Expansion angereicherter CAR-T-Zellen

Die durch LNGFR MACS gewonnenen CAR-T-Zellen werden nach dem Prinzip untransduzierter T-Zellen aktiviert (siehe **Kap. 2.2.4.1**).

Die Expansion erfolgt in mit IL-7, IL-15 und Humanserum versetztem CAR-Medium. Täglich werden die verschiedenen Konstrukte sehr vorsichtig auf- und abpipettiert, um Dichte und Morphologie im Anschluss unter dem Mikroskop zu beurteilen. Zusätzlich wird circa alle zwei Tage ein Laktatwert jedes CAR-Konstruktes gemessen. Er sollte optimalerweise einen Bereich von 10 mmol/l nicht überschreiten. Er stellt einen guten Parameter zur Einschätzung der CAR-T-Zell-Expansion dar. Ein schnell steigender Laktatwert deutet auf eine rasch

fortschreitende Expansion der Zellen hin, geht daher mit einer täglichen Zugabe an CAR-Medium einher. Bei einer Laktatwertmessung von über 10mmol/l sollte das CAR-Medium mindestens verdoppelt werden.

Je nach Expansion werden die verschiedenen Konstrukte in größere geeignete Platten oder Zellkulturflaschen aufgenommen. Ist die Expansion nach einigen Tagen fortgeschritten, werden kleine Mengen jeder Zellpopulation zur Messung am ABX Blutanalysegerät entnommen. Es wird eine optimale Dichte von 1×10^6 Zellen/ml angestrebt. Nach circa einer Woche sorgfältiger Zellpflege ist die Expansion der CAR-T-Zellen so weit fortgeschritten, dass die funktionellen Analysen begonnen werden können.

2.2.5 Transfektion und Transduktion

Dieses Verfahren dient der Expression der chimären Antigenrezeptoren auf den T-Zellen und wird in Kürze dargestellt (**Abb. 2.3**).

Zur Transfektion wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, transformiert mit Adenovirus Typ5, herangezogen. Die Zellen wurden ein Tag vor der Transfektion in HEK-Medium in einer Zellkulturflasche ausgesät. Nach Erreichen einer 75-90%igen Konfluenz wurden die Zellen mit einer DNA-Lösung aus Opti-MEM, Lipofectamin und den Plasmiden VSV-G, *gag/pol* und Transvektorplasmid versehen. Nach zwei und drei Tagen wurden die Viren geerntet und bis zum Tag der Transduktion bei -80° kryokonserviert. Diese erfolgte am Tag 2 des Arbeitsplans (**Abb. 2.1**). Dazu wurden 10 μ l des Überstandes der viralen Vektoren auf die zuvor separierten, aktivierten und expandierten T-Zellen gegeben und für 30 Minuten zentrifugiert.

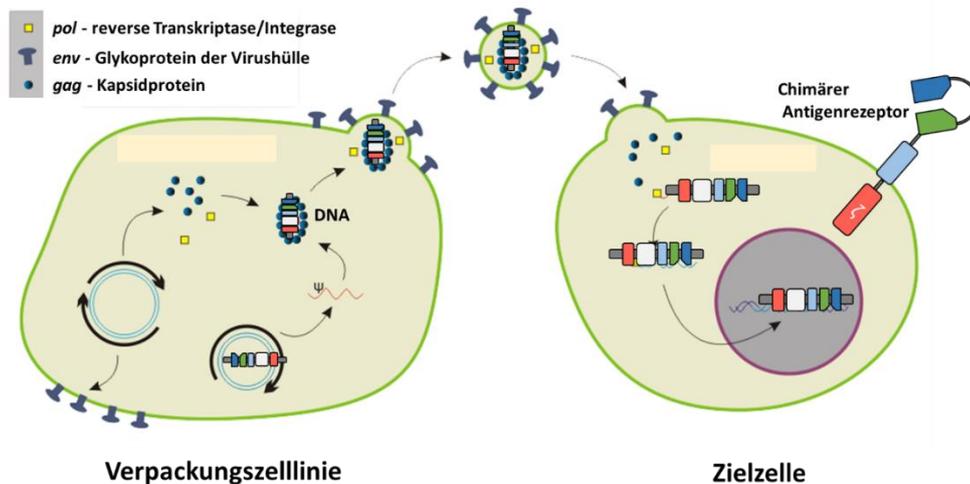


Abb. 2.3 Transfektion und Transduktion mit Lentiviren

Im Schaubild ist die stabile Transfektion einer Zelle mit Vektorplasmiden und anschließende Transduktion der stimulierten T-Zelle mit einem chimären Antigenrezeptor dargestellt (**adaptiert von Wikiwand, Viraler Vektor**) [111].

2.2.6 Molekularer Aufbau der AdCAR-T Konstrukte

Die AdCAR-Ts setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Für den extrazellulären Teil wurde ein spezifischer anti-LLE scFv-Teil über einen in der Länge variierenden Platzhalter, der von einem IgG4 Molekül abstammt, an die CD8 Transdomäne einer T-Zelle konjugiert. Intrazellulär wurde zusätzlich zur CD3ζ -Signaldomäne eine co-stimulierende 4-1BB Domäne zwischengeschaltet, weshalb das hier eingesetzte AdCAR-Konstrukt per Definition ein CAR der zweiten Generation ist (**Abb. 2.4**). Dieser intrazelluläre Teil ist für die Signaltransduktion verantwortlich. Um eine einfache und zuverlässige Detektion, Selektion sowie Anreicherung der AdCAR-Ts für die nachfolgenden Experimente zu gewährleisten, wurden die einzelnen Konstrukte mit trunkiertem LNGFR (LNGFRt) ausgestattet, welches mittels einer F2A site (ribosomal skip) gemeinsam mit dem CAR auf der T-Zelle exprimiert wird.

Insgesamt wurden fünf verschiedene AdCAR-T Konstrukte dieser Art hergestellt. Der Unterschied der Konstrukte liegt in der Variation der Spacerlänge. Die fünf

getesteten Konstrukte umfassen Verbindungslängen zwischen 5,5 und 16,5nm. Als Spacer dienten: IgG4 hinge (IgG4 XS), IgG4 hinge-CH3 (IgG4 M), IgG4 hinge-CH2-CH3 (IgG4 L), IgG4 CH1-hinge-CH2-CH3 (IgG4 XL) sowie ein von CD8 abstammender Verbindungsteil (CD8 S). Letzterer verbessert die Eigenschaft durch erhöhte Stabilität im Konstrukt.

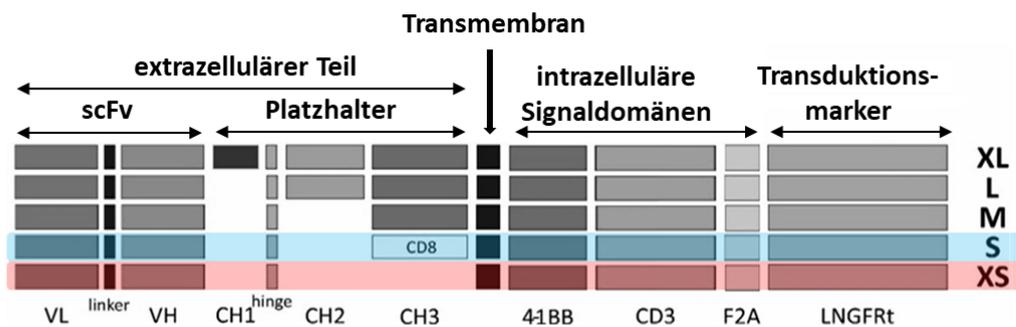


Abb. 2.4 Aufbau der AdCAR-T der zweiten Generation

Dargestellt ist der molekulare Aufbau der verschiedenen AdCAR-T Varianten in einem modularen System. Es wurden verschiedene Platzhalter verwendet, um den optimalen Abstand zwischen Effektor- zu Zielzelle systematisch zu ermitteln (adaptiert aus Seitz, Mittelstätt, Hau et al. 2020, *Adapter CARTM T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*) [101].

2.2.7 Generierung von Adaptermolekülen mittels Biotinylierung

Mittels Biotinylierung wurden aus Antikörpern funktionsfähige Adaptermoleküle für das AdCAR-System generiert. Ein Adaptermolekül besteht aus einem Antigenerkennungsteil, Verbindungssteil (Linker) und Markierungsteil (Label, hier Biotin) (**Abb. 2.5**). Der Verbindungs- und Markierungsteil wird zusammen als „Linker/Label Epitop“ (LLE) bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden die therapeutischen CD19 Antikörper 4G7SDIE-biotin (nachfolgend b-4G7SDIE genannt) und der GD2 Antikörper ch14.18-biotin (nachfolgend b-ch14.18 genannt) als Adaptermoleküle verwendet.

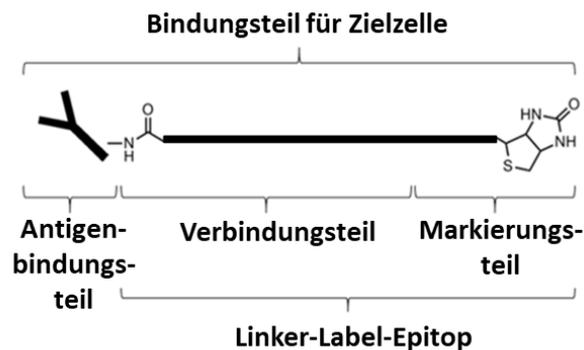


Abb. 2.5 Adaptermolekül mit Linker/Label Epitop (LLE)

Die Adaptermoleküle setzen sich aus drei Haupteinheiten zusammen. Die Markierung/Biotinylierung wird als Linker-Label-Epitop bezeichnet.

2.2.8 Expressionsfärbungen

Im Laufe der Vorbereitung der Versuche werden zwei Expressionsfärbungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigt.

Zunächst wird die Transduktion überprüft. Der darauffolgende Schritt der CAR-T-Zellseparation nach LNGFR ist nur sinnvoll, wenn bestätigt wird, dass die chimären Antigenrezeptoren nach erfolgreicher Transduktion auf den separierten T-Zellen exprimiert werden.

Die zweite Expressionsfärbung wird nach der LNGFR Anreicherung angefertigt, um zu bestätigen, dass die Zellpopulationen der verschiedenen Konstrukte und eine hohe LNGFR- und damit CAR-Expression aufweisen (**Abb. 3.1 und 3.2**). Nur mit einer möglichst reinen CAR-T-Zellkultur sind die funktionellen Analysen sinnvoll und repräsentativ.

Durchführung

Im ersten Schritt werden alle Zellen gezählt. Um später ein gutes Ergebnis in der FACS-Analyse zu erzielen, eignet sich pro Population eine repräsentative Zellzahl von mindestens $0,5 \times 10^6$. Die zu untersuchenden Zellen werden jeweils in ein FACS Tube pipettiert.

Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 5 Minuten (300g, RT). In dieser Zeit werden die austitrierten AK vorbereitet. Für die Expressionsfärbung wurde folgender AK Mastermix verwendet:

2,5µl CD8PE, 3,5µl CD4BUV395 und 5µl LNGFR APC. Zusätzlich werden 39µl FACS Puffer hinzugegeben, um ein Endvolumen von 50µl im Tube zu erreichen. Es werden 2µl des AK Mastermixes in die jeweiligen FACS Tubes der Zellen gegeben. Optional kann 1ml FACS Puffer dazugegeben werden.

Zur Vermischung der Zellen mit den empfindlichen AK werden die FACS Tubes vorsichtig beklopft. Nun erfolgt eine 10-15minütige Inkubation im Dunkeln bei RT. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen, indem sie bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert werden um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen sind nun fertig vorbereitet für die FACS-Analyse. Gegebenenfalls werden sie in 0,5% PFA bis zur Messung fixiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.9 Luciferase Zytotoxizitäts Assay

Biolumineszenz ist ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Sowohl Glühwürmchen als auch Pflanzen, Pilze und andere Organismen machen sich dieses Prinzip zu nutze.

Biolumineszenz ist das Ergebnis einer Oxidationsreaktion, vermittelt durch das 60kDa schwere Enzym Firefly Luciferase, das in der Lage ist, biolumineszenzfähige Organismen „zum Leuchten“ zu bringen. In Anwesenheit des zugehörigen Substrates D-Luciferin sowie den Cofaktoren Sauerstoff und ATP beginnt die katalytische Reaktion, bei der Energie in Form von messbarem Licht freigesetzt wird [112, 113].

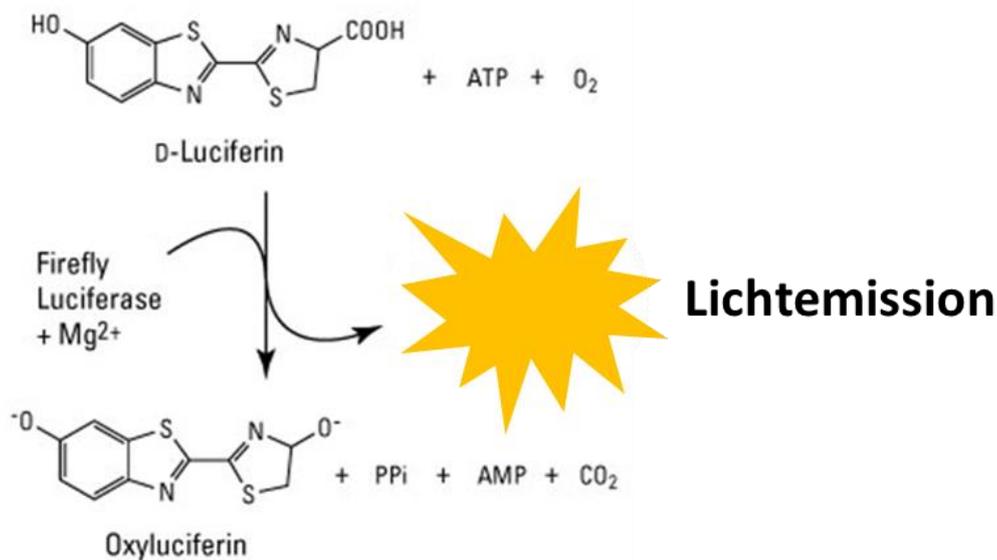


Abb. 2.6 Prinzip der Luciferase-Reaktion

Luciferase katalysiert sein Substrat D-Luciferin in Anwesenheit von Sauerstoff und ATP zu Oxyluciferin. Dabei wird Energie frei, messbar in Form von Licht (**adaptiert von Thermofisher Scientific, *Firefly Luciferase Assays and Vectors***) [113].

Anders als beim verbreiteten Versuchsansatz Luciferase als Reporter gen einzusetzen, um Proteine erkenntlich und messbar zu machen, kann hier durch stabile Transduktion der Tumorzelllinie *Nalm6* mit daraus folgender Generierung eines Leuchtsignals auf die Viabilität der Targets bzw. die Effektorfunktion der CAR-T-Zellen geschlossen werden. Während viable Zellen in der Lage sind das D-Luciferin umzusetzen, geht diese Funktion nach Absterben der Zelle verloren. Somit stellt dieser Zytotoxizitätsassay eine gute Möglichkeit dar, die Lyse von Tumorzellen in Suspension zu messen.

Durchführung

Die Tumorzellen *Nalm6LucMcherry* und die CAR-Effektorzellen werden unter oben genannten Bedingungen kultiviert und zur Vorbereitung auf das Experiment auf $0,1 \times 10^6$ /Well eingestellt. Es wird eine durchsichtige 96-well Flachbodenplatte verwendet. Die Target- und Effektorzellen werden in ein Volumen von jeweils 50µl/Well aufgenommen. Je nach Fragestellung werden weitere Reagenzien

vorbereitet und hinzu pipettiert. Spezifisch für diesen Versuch ist D-Luciferin, das Substrat der Firefly Luciferase. Es wird in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ in Tumormedium aufgenommen und bis zum Gebrauch im Dunkeln gelagert. Nach gründlichem Vortexen wird jedes Well mithilfe einer Mehrkanalpipette sorgfältig in $50\mu\text{l}$ D-Luciferin resuspendiert. Endvolumen pro Well sind $200\mu\text{l}$. Die Platten werden sofort in den Brutschrank gestellt und bei 37° und 5%igem CO_2 -Gehalt inkubiert.

Die Messungen am Victor 1420 Multilabel Counter werden nach 6, 12 und 24 stündiger Inkubationszeit durchgeführt. Da Temperaturunterschiede zu starken Schwankungen der gemessenen Werte führen können, werden die Platten im vorgeheizten Luminometer bei exakt 37° gemessen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in Excel mithilfe eines definierten Templates. Da die Wells der 96-well Platte nicht alle zeitgleich gemessen werden können, kommt es trotz gleichbleibender Temperatur zu Schwankungen der gemessenen Biolumineszenzwerte. Mit Hilfe einer Korrekturformel wird diese Abweichung korrigiert. Dazu wird auf jeder gemessenen Platte eine abfallende Standardreihe von $0,1 \times 10^6$ über $0,075 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$, $0,025 \times 10^6$ und $0,01 \times 10^6$ Tumorzellen pro Well angefertigt. Mit den korrigierten Biolumineszenzwerten lassen sich die Viabilität der Tumorzellen bzw. die Tumorlyse berechnen.

2.2.10 xCELLigence (Real-Time Cytotoxicity Assay, RTCA)

Die durchgehende, nichtinvasive Echtzeit-Messung adhärent wachsender Zellen basiert auf elektrischer Impedanz. Am Boden der speziellen E-Platten befinden sich Mikroelektroden aus Gold. Die Impedanz steigt an je stärker die Zellen adhären. Die Stärke der Adhärenz der Tumorzellen hängt von vielen Faktoren wie Zelltyp, Zellviabilität, Proliferation oder Migration ab. Die Unterscheidung zwischen Zelltod, Seneszenz und Zellzyklusarrest ist möglich. Über den Zellindex wird die Zellviabilität angegeben und abgelesen. Die Zeitintervalle können beliebig gewählt werden [114, 115].

Durchführung

Tag 1: Das Experiment wird in der RTCA Software angelegt. Dazu wird je nach Fragestellung das Pipettierschema übertragen. Es wird festgelegt, in welchem Zeitintervall gemessen werden soll und wie lange die komplette Messungsdauer beträgt. Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein Zeitintervall von 15 Minuten gewählt sowie eine Gesamtdauer von 3 Tagen.

Eine vorausschauende sorgfältige Kultivierung der verwendeten adhärenen Zelllinie *LS* optimiert das Wachstumsverhalten und somit die Qualität und Vergleichbarkeit des Experimentes (siehe **Kap. 2.2.1.2**).

Die *LS* Tumorzellen werden in 10ml Tumormedium aufgenommen. Nach Färbung mit Trypanblau wird in der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und auf das Experiment eingestellt.

Pro Well werden für das Experiment $0,03 \times 10^6$ Tumorzellen eingestellt.

In die spezielle 96-well E-Platte werden 50µl Tumormedium pro Well vorgelegt und eine einmalige Messung zur Kalibrierung durchgeführt. Anschließend werden die Targets ausgesät. Zusätzliche 100µl/Well Tumormedium optimieren das Wachstum. Die Platte wird in das RTCA Gerät zurückgestellt und die Messung gestartet. Es folgt die Anwachsphase der Tumorzellen, die in einem selbst definierten Zeitintervall von 15 Minuten gemessen und aufgezeichnet wird. Der Brutschrank darf bis zum Ende der Anwachsphase nicht geöffnet werden.

Tag 2: Circa 24-30 Stunden später sollte der Zellindex mindestens 1 betragen. Die Messung wird gestoppt und die Platte entnommen. Es wird je nach Fragestellung pipettiert. Die Platte wird wieder im Gerät platziert und die Messung fortgesetzt. Innerhalb der nächsten Stunden bis Tage kann das Ergebnis des Zytotoxizitätsassays abgelesen werden.

Die Auswertung erfolgt in Excel. Dazu wird der Zellindex bei Effektorenzugabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert. Zur grafischen Darstellung wird GraphPad Prism5 verwendet.

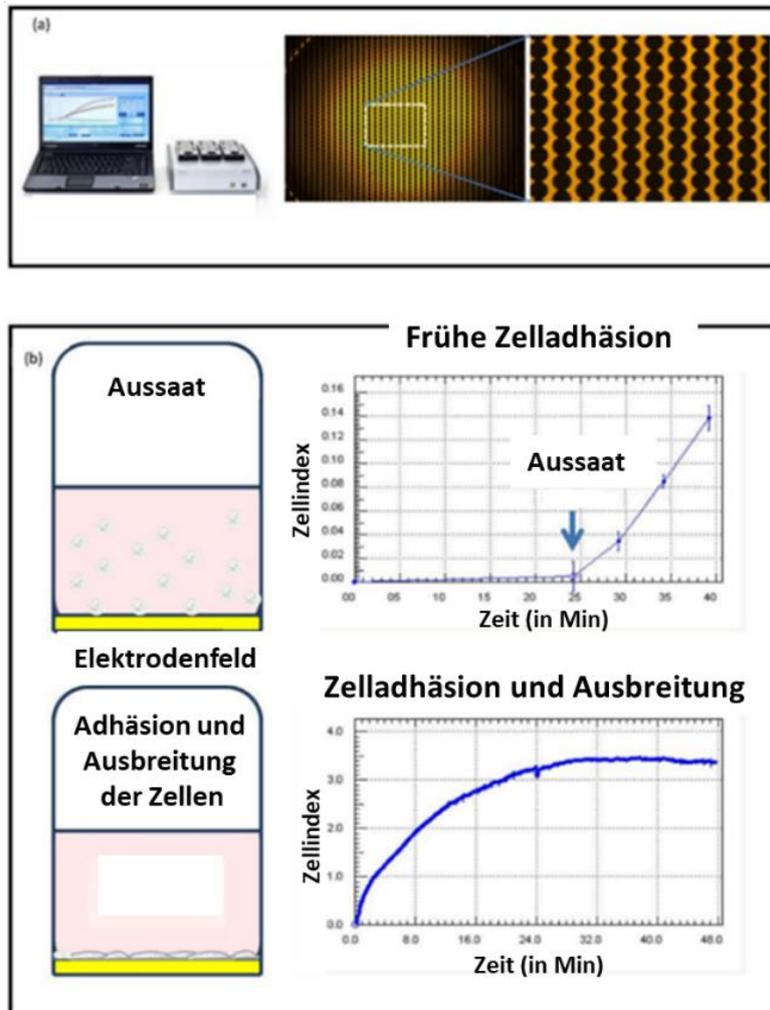


Abb. 2.7 Messprinzip xCELLigence

a) Dichtes Feld aus Goldelektroden zur Impedanzmessung

b) Nach der Aussaat der Zielzellen beginnt die Anwachphase. Die Impedanz steigt mit zunehmender Adhärenz. Diese Veränderung ist ablesbar am dimensionslosen Zellindex (adaptiert aus Kho, D. et al. 2015, *Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time*, Biosensors (Basel)) [115].

2.2.11 Intrazelluläre Färbung (Intracellular Staining, ICS)

Die Effektorfunktion der CAR-T-Zellen kann durch Nachweis von Produktion intrazellulärer Zytokine nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Akkumulation von TNF α untersucht.

Durchführung

Tag 1: Zur Vorbereitung der intrazellulären Färbung werden die Targetzellen sowie Effektoren in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ pro Well eingestellt. Brefeldin A (1:125) und GolgiStop (1:375) werden vorbereitet, damit die produzierten Zytokine später nicht sezerniert werden. Als Positivkontrolle werden PMA (1:400) und Ionomycin (1:200) zur maximalen Stimulation verwendet. Die Konzentrationen sind auf ein Endvolumen von 200 μ l/Well bezogen. Je nach Fragestellung wird pipettiert. Danach erfolgt die Inkubation im Brutschrank bei 37° und 5%igem CO₂-Gehalt für 16h.

Tag 2: Vor Beginn der Färbung sollte die Zentrifuge ca. 30 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit auf 4° heruntergekühlt werden. PBSE, FACS-Puffer und PermWash sowie eine Eisbox zum Kühlen der Platten werden vorbereitet. Die LIVE/DEAD Lösung wird mit einer 1:4000 Konzentration angesetzt. Nachdem die Inkubationszeit abgelaufen ist, werden die Platten zentrifugiert (1800rpm, 2Min., 4°) und zweimal mit PBSE gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgt eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Anschließend werden die Platten in 50 μ l/Well LIVE/DEAD Lösung resuspendiert. Die Negativkontrolle beinhaltet Zellen, die von sämtlichen Färbungen ausgespart bleibt. Es folgt eine 20minütige Inkubation bei 4° im dunklen Kühlschrank. Während der Inkubationszeit wird die Extrazellulärfärbung zur Analyse der Zellpopulation vorbereitet. In dieser Arbeit wurden CD8FITC (1:100), CD4PE (1:100), CD10PerCP (1:50) und CAR LNGFR APC (1:11) als Mastermix, verdünnt mit FACS-Puffer, verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Platten mit FACS-Puffer aufgefüllt und zweimal gewaschen (1800rpm, 2Min., 4°). Anschließend wird mit jeweils 50 μ l/Well extrazellulär gefärbt und wieder für 20 Minuten bei 4° im Kühlschrank inkubiert. Danach werden die Platten zweimal unter gleichen Bedingungen mit FACS-Puffer gewaschen. Um im nächsten Schritt eine intrazelluläre Färbung erreichen

zu können, werden 100µl Cytofix/Cytoperm zur Fixation und Permeabilisierung der Zellmembran in die Wells gegeben und eine 20minütige Inkubation im Kühlschrank durchgeführt. In dieser Zeit wird die Intrazellulärfärbung mit TNF α PB (1:200) in saponinhaltigem PermWash angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgen zwei Waschschrte mit PermWash. Anschließend werden die Platten mit 50µl/Well intrazellulär angefärbt und resuspendiert. Wieder erfolgt eine Inkubationszeit von 20 Minuten im Kühlschrank. Die Zellen sind danach bereit zur FACS-Analyse. Falls diese nicht unmittelbar nach Beendigung der Färbung stattfindet, wird zum Fixieren der Zellen eine PFA-Lösung (FACS-Puffer mit 1% PFA (Stock 36%)) angesetzt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen zweimal mit PermWash gewaschen und in 70µl/Well PFA-Lösung resuspendiert. Die Platten werden bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.12 Durchflusszytometrische Analyse und Zellsortierung (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS)

Bei dieser Methode können einzelne Zellen nach ihren speziellen Eigenschaften simultan analysiert und sortiert werden.

Die Zellflüssigkeit wird ins FACS-Gerät eingesaugt und stark beschleunigt. Durch hydrodynamische Fokussierung passieren die Zellen einzeln nacheinander den Messbereich eines Laserstrahles passender Wellenlänge.

Bei diesem Vorgang entsteht Streulicht. Es stellt die erste Möglichkeit zur Zellanalyse dar. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FSC*) wird durch Detektoren im gleichen Winkel wie das einfallende Licht registriert und lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zu. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter, SSC*) variiert je nach Granularität der Zellen. Diese Messung erfolgt im rechten Winkel zur Achse des einfallenden Lichtes. Beispielsweise unterscheiden sich Granulozyten in ihrem Streuverhalten durch eine rauere Oberflächenbeschaffenheit stark von T-Zellen mit glatter Oberfläche.

Die zweite Möglichkeit zur Zellanalyse stellt die Fluoreszenzmessung dar. Die Zellen sind an Antikörper gekoppelt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Die Fluorochrome werden durch Anstrahlung des Lasers einer

bestimmten Wellenlänge angeregt. Die Konzentration der emittierten Photonen wird während des Messvorganges bestimmt und korreliert mit der Menge der gekoppelten Antikörper. Die Messungen werden im Gerät in elektronische Spannungsimpulse umgewandelt, digitalisiert und am Computer grafisch dargestellt. Jedes Fluorochrom hat sein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum. Bei Überlappungen muss mittels Kompensation korrigiert werden [116].

Zur Auftrennung und Sortierung der Zellen in ihre jeweilige Population wird die Zellflüssigkeit in geladene Tröpfchen unterteilt nachdem sie den Messbereich des Laserstrahles passiert hat. Die einzelnen Zellen werden mithilfe zweier unterschiedlich geladener Platten, zwischen denen ein elektrisches Feld herrscht, in unterschiedliche Reagenzgläser ausgelenkt. Durch Auswertung mittels eines Detektors kann jede Zelle einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden [117].

Die Messung erfolgt mit dem *BD™ LSR II Flow Cytometer*. Im ersten Schritt wird ein neues Experiment erstellt und Parameter sowie die verwendeten Fluorochrome ausgewählt. Die Konditionen des zu messenden Versuches werden im neuen Experiment eingegeben. Vor Beginn der Messungen wird eine Kompensationsautomatik ausgewählt und gestartet. Dort enthalten ist eine ungefärbte Probe als Negativkontrolle sowie alle Einzelfärbungen, die zuvor ausgewählt wurden. Anhand der Negativkontrolle („Unstained control“) werden die Grundspannungen der einzelnen Fluoreszenzen im Fenster FSC/SSC eingestellt. Die Lymphozyten sollten als Population eindeutig abzugrenzen sein (Region P1). Anschließend werden die Einzelfärbungen gemessen und abgespeichert. Eine Veränderung der Spannungen darf nicht mehr erfolgen.

Nun werden die verschiedenen Messbedingungen ausgewählt, beispielsweise die maximale Aufnahme der Zellen pro Messung oder die Festlegung der Flussrate. Die einzelnen Proben können gemessen werden.

Die Auswertung erfolgt im *BD FACSDiva™* Programm. Im ersten Diagramm werden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen und das Lymphozytengate ausgewählt. Innerhalb dieser Population werden die einzelnen und lebenden

Zellen bestimmt. Nun können je nach Fragestellung durch Entgegensetzen zweier Kanäle weitere Auswertungen vorgenommen werden.

2.2.13 Statistik

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit biologisch unterschiedlichen Spendern durchgeführt. In den Einzelexperimenten wurden jeweils mindestens drei technische Replikate verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism5 von Statcon.

In einigen Experimenten wurden zwei Gruppen miteinander verglichen (z.B. die Effektorfunktion mit und ohne Antikörperzugabe). Dazu wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mit dem OneWay ANOVA (*analysis of variance*) und dem post-hoc Test Tukey's Comparison Multiple Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit < 5% und darunter wurde als signifikant gewertet.

Folgende Signifikanzniveaus wurden in den Schaubildern verwendet:

$p \leq 0,05$	=	*
$p \leq 0,01$	=	**
$p \leq 0,001$	=	***
$p \leq 0,0001$	=	****

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die neue AdCAR-T Technologie in verschiedenen Versuchsreihen untersucht. Dazu wurden die fünf Adapter-CAR-T Konstrukte mit den Adaptermolekülen b-4G7SDIE gegen CD19⁺ sowie b-ch14.18 gegen GD2⁺ Tumorzellen (Nalm6 und LS) gegeneinander getestet. Die funktionelle Aktivität wurde im Hinblick auf das Verhältnis von CAR-T Zellen zu Tumorzellen als auch im Hinblick auf die Adaptermolekülkonzentration und deren Spezifität untersucht. Ziel ist, die bisherige Therapie mit CAR-T Zellen um die Aspekte Sicherheit, Kontrollierbarkeit, Flexibilität und Universalität zu verbessern.

3.1 Expression chimärer Antigenrezeptoren

Vor Beginn der Reihe funktioneller Analysen musste nachgewiesen werden, dass die T-Zellen die zuvor lentiviral transduzierten chimären Antigenrezeptoren (siehe **Kap. 2.2.5**) tatsächlich in ausreichender Anzahl auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Detektion der AdCAR-Ts erfolgte mit Hilfe des Transduktionsmarkers LNGFR, der mittels F2A Teil auf der Oberfläche der aktivierten T-Zellen zusammen mit den chimären Antigenrezeptoren co-exprimiert wird. Der Marker kann durch anti-LNGFR Färbung sichtbar gemacht werden. Nachdem die AdCAR-Ts am Tag 7 des Arbeitsplans nach LNGFR MACS angereichert und expandiert wurden (siehe **Kap. 2.2.4**), wurde die Expression der chimären Antigenrezeptoren über die LNGFR Färbung am darauffolgenden Tag per FACS-Analyse untersucht und bestätigt (siehe **Kap. 2.2.8**). Es konnte eine hohe Expressionsrate für jedes einzelne der fünf transduzierten AdCAR-T Konstrukte XS-XL nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde die untransduzierte Zellpopulation Mock herangezogen, die eine LNGFR Expression von 0% aufwies. Weiterhin belegte die Untersuchung eine ausgeglichene CD4 und CD8 Verteilung von Mock und den fünf AdCAR-T Konstrukten (**Abb. 3.1**). Ein Vergleich der LNGFR-Expressionsraten der Spender ist in **Abb. 3.2** dargestellt. Sie unterschieden sich nicht signifikant untereinander.

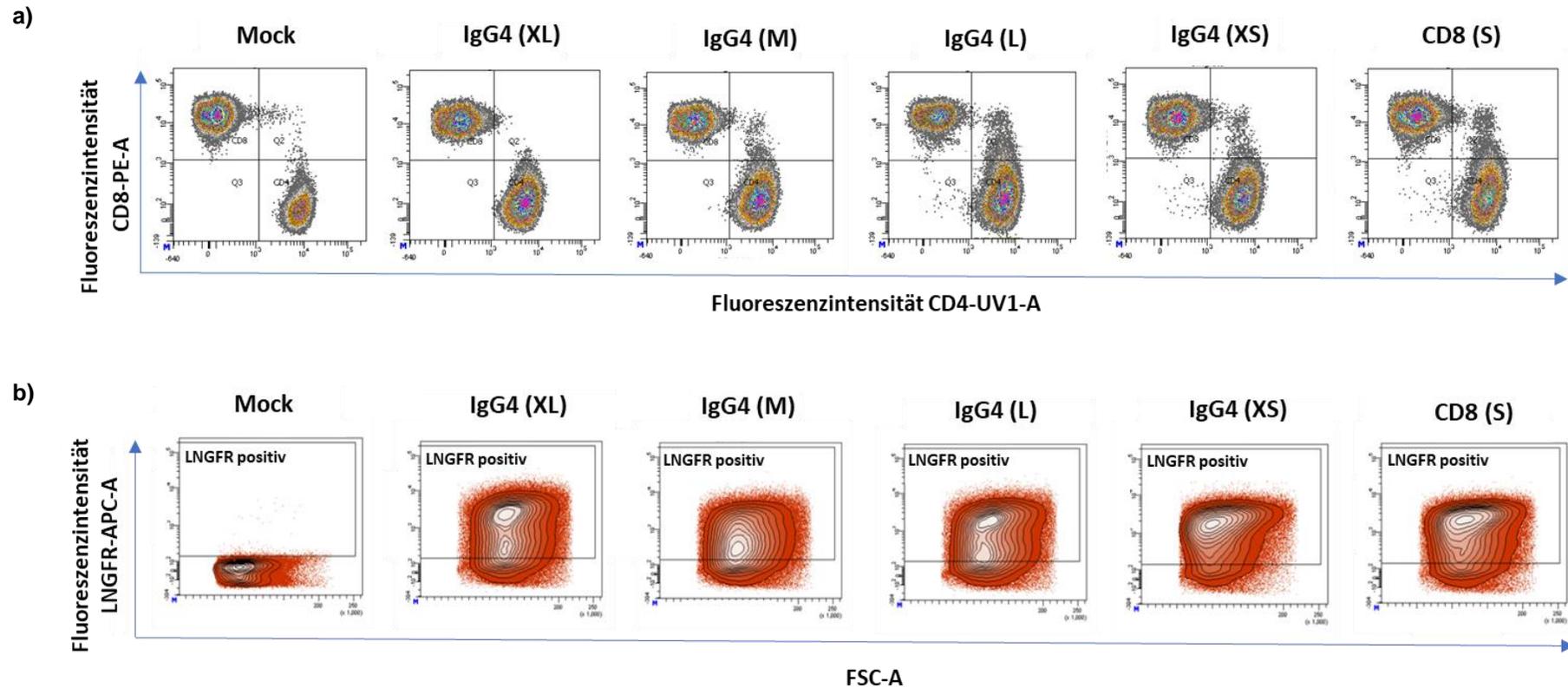
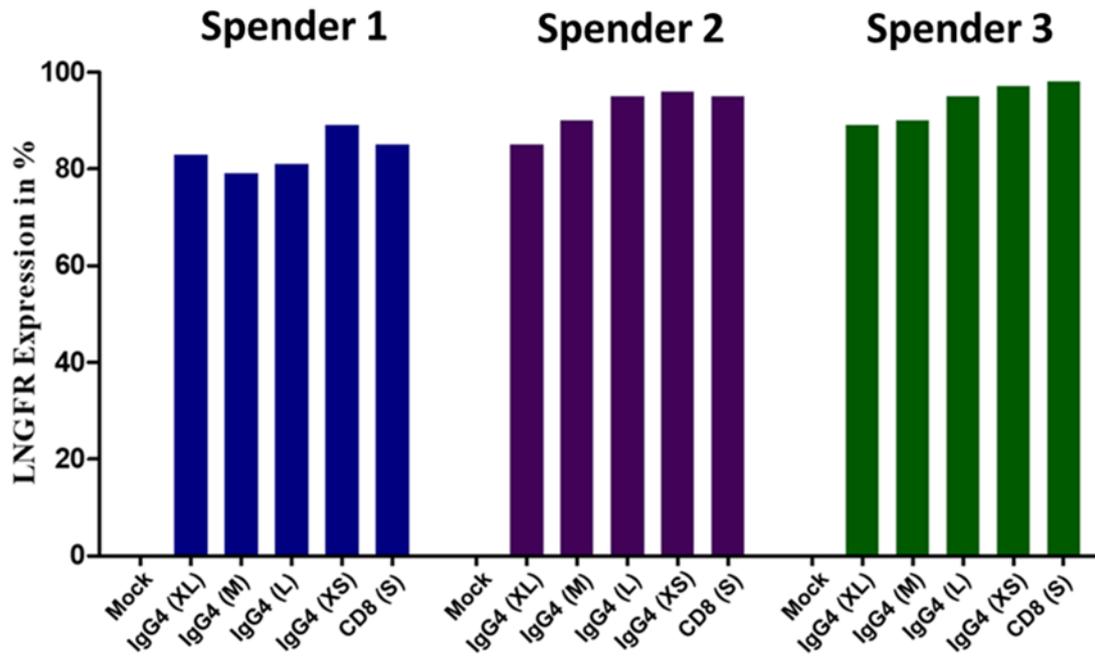


Abb. 3.1 CD4- und CD8-Verteilung und Expressionsfärbung nach LNGFR der AdCAR-T Konstrukte (am Beispiel Spender 1 gezeigt)

a) Das Schaubild zeigt die CD4- und CD8- Verteilung bei der untransduzierten Negativkontrolle Mock sowie den fünf AdCAR-T Konstrukten. Der Nachweis erfolgte per FACS-Analyse.

b) Das Schaubild zeigt die Expressionsrate der chimären Antigenrezeptoren, detektiert durch den Transduktionsmarker LNGFR auf der y-Achse, bei der untransduzierten Negativkontrolle Mock und den fünf AdCAR-T Konstrukten nach Anreicherung durch die LNGFR-Zellseparation. Der Nachweis erfolgte per FACS-Analyse.

a)



b)

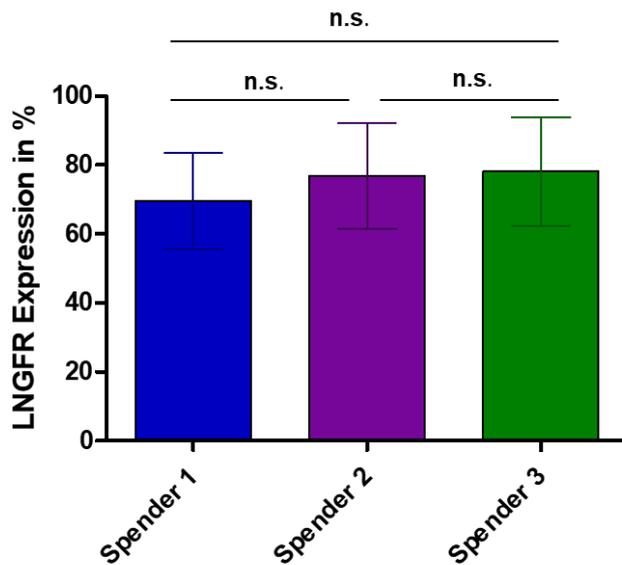


Abb. 3.2 Expression chimärer Antigenrezeptoren

a) Das Schaubild zeigt die AdCAR-T Expressionsrate der fünf Konstrukte von Spender 1-3, detektiert über den co-exprimierten Transduktionsmarker LNGFR per FACS-Analyse. Negativkontrolle: untransduzierte Zellpopulation Mock.

b) LNGFR Expression in %. Für jeden Spender ist der Mittelwert mit SD dargestellt. Ausgewertet mit One-Way ANOVA ($p = 0,9091$).

3.2 Vergleich der AdCAR-T Konstrukte unterschiedlicher Spacerlänge [IgG4 (XS), CD8 (S), IgG4 (M), IgG4 (L) und IgG4 (XL)]

Nachdem die Expression der chimären Antigenrezeptoren auf den aktivierten T-Zellen erfolgreich in ausreichender Zahl nachgewiesen wurde, konnte die Effektivität der verschiedenen AdCAR-T Konstrukte in Kombination mit den spezifischen biotinylierten Antikörpern in funktionellen Assays geprüft werden. Die erste Fragestellung war, ob ein signifikanter Unterschied der Effektorfunktion gegen spezifische Tumorantigene zwischen den verschiedenen AdCAR-T Konstrukten unterschiedlicher Spacerlänge besteht. Der ausschlaggebende Einfluss der Länge, Zusammensetzung und Abstammung der extrazellulären Domäne auf die Antitumoraktivität und intrazelluläre Signaltransduktion der CARs wurde schon in diversen Studien hervorgehoben [47, 48, 50, 51, 118]. Das Spektrum der Spacerlängen variierte von 5,5nm bis 16,5nm. Die Aktivierung der AdCAR-Ts sowie die Tumorzelllyse wurden in der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence (siehe **Kap. 2.2.10**) gegen das Zielantigen GD2 der Neuroblastomzelllinie LS mit und ohne 10ng/ml b-ch14.18 überprüft (**Abb. 3.3**).

Hier zeigte sich in Anwesenheit des biotinylierten Antikörpers eine signifikante Tumorzelllyse gegenüber dem Antigen GD2 der adhärent wachsenden Zellen durch das AdCAR-T Konstrukt IgG4 hinge only (XS) mit der kürzesten Spacerlänge von 5,5nm und nachfolgend des AdCAR-T Konstrukts CD8 (S) im Vergleich zur Negativkontrolle Mock (jeweils $p \leq 0,001$). Die Resultate der langen Spacerlängen IgG4 hinge-CH2-CH3 (IgG4 L) und IgG4 CH1-hinge-CH2-CH3 (IgG4 XL) fielen vergleichbar zu den Negativkontrollen aus ($p > 0,05$). Ohne die Zugabe des Antikörpers zeigten die AdCAR-Ts keinen signifikanten Unterschied zu den Negativkontrollen. Der Unterschied in An- und Abwesenheit von b-ch14.18 ist beispielhaft an IgG4 (XS) in **Abb. 3.3 c)** dargestellt ($p \leq 0,0001$).

Zusammen mit dem b-4G7SDIE wurden weiterhin im Luciferase Kill Assay die Aktivierung und Tumorzelllysefunktion der fünf Konstrukte gegen das Zielantigen CD19 der löslichen B-ALL Vorläufer Zelllinie Nalm6 untersucht (siehe **Kap.**

2.2.9). Die Konzentration des biotinylierten Antikörpers betrug in allen Experimenten 10ng/ml (siehe **Kap. 3.4**).

Zur Negativkontrolle wurde die untransduzierte T-Zell-Population Mock herangezogen. Die erste Messung erfolgte nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank. Es zeigte sich eine >50%ige Tumorzelllyse durch das konventionelle anti-CD19 CAR-T. Das AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) zeigte im Vergleich dazu als einziges Konstrukt schon bei der ersten Messung eine signifikante Lyse von 34% ($p=0,1573$) (**Abb. 3.4 a**)).

Nach 12 Stunden Inkubation betrug die Tumorzelllyse des konventionellen anti-CD19 CARs 97%. Das AdCAR-T (XS) zeigte eine Lyse von 77% ($p \leq 0,01$). Stark gestiegen war auch die spezifische Lyse durch AdCAR-T Konstrukt CD8 (S) mit 58%, gefolgt von AdCAR-T IgG4 (M) (32%) (**Abb. 3.4 b**)).

Nach 24 Stunden Inkubation zeigte das AdCAR-T (XS) im Gegensatz zur Kondition ohne Antikörperzugabe eine spezifische Lyse von 94% ($p \leq 0,0001$). Es war vergleichbar mit der Effektorfunktion des konventionellen anti-CD19 CAR-T, die Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant. Auch die Effektorfunktion der Konstrukte CD8 (S) und IgG4 hinge-CH3 (M) nahm weiter auf 73% bzw. 58% zu. AdCAR-T IgG4 (L) wies eine Tumorzelllyse von 21% auf, während das AdCAR-T IgG4 (XL) mit dem längsten Spacer keine Reduktion der Tumorzellen bewirkte. Auch die Lyse verglichen mit keiner Antikörperzugabe zeigte bei AdCAR-T (XS), (S) und (M) einen signifikanten Unterschied (**Abb. 3.4 c**)).

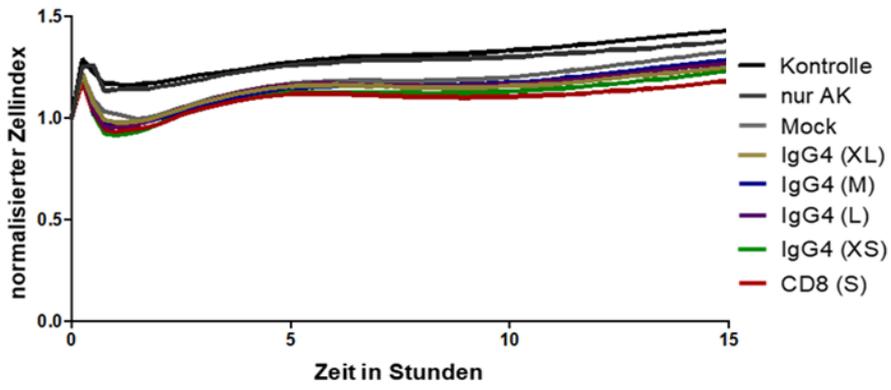
Die unterschiedliche Effektorfunktion der fünf AdCAR-Ts wurde in einem weiteren Versuch durch den Nachweis intrazellulär produzierter Zytokine, genauer die Akkumulation von $TNF\alpha$, untersucht (siehe **Kap. 2.2.11**).

Die Tumorzellen Nalm6 und die fünf Effektoren wurden in einem E:T Verhältnis von 1:1 mit 10ng/ml b-4G7SDIE und ohne Antikörperzugabe eingestellt. Nach Permeabilisierung der Zellwand erfolgte die Intrazellulärfärbung mit $TNF\alpha$. PMA wurde als Positivkontrolle verwendet. Nach 16 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die in **Abb. 3.5** dargestellten Ergebnisse gemessen und per FACS analysiert. Es zeigte sich ähnlich zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen des Konstruktvergleichs eine deutliche Überlegenheit des AdCAR-T (XS) mit

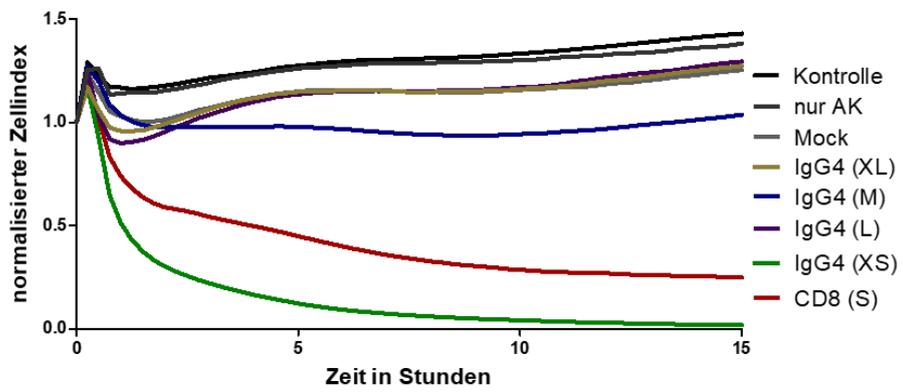
einer Produktion von 43% TNF α positiver Zellen in Kombination mit dem biotinylierten 4G7SDIE (10ng/ml). Das Ergebnis war signifikant besser im Vergleich zu den anderen Konstrukten und zu den untransduzierten T-Zellen Mock (jeweils $p \leq 0,001$). Das AdCAR-T CD8 (S) mit b-4G7SDIE zeigte eine Produktion von 14%, das AdCAR-T (M) von 18% TNF α positiver Zellen. Keine signifikante TNF α Akkumulation wurde bei den Konstrukten AdCAR-T (L) und (XL) gemessen (jeweils 2%), sowie bei allen Konstrukten ohne Antikörperzugabe (Daten nicht gezeigt). Die Positivkontrolle durch PMA-Zugabe ergab eine Produktion von 59% TNF α positiver Zellen.

Die durchgeführten Versuche gegen die Tumorantigene GD2 und CD19 sowie die Messung des intrazellulären Zytokins TNF α zeigten eindrücklich die Überlegenheit des AdCAR-T Konstruktes IgG4 hinge only (XS) mit der kürzesten Spacerlänge von 5,5nm. Die Resultate der langen Spacerlängen fielen vergleichbar zu den Negativkontrollen aus. Folglich wurde das AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) repräsentativ als stärkster Effektor des AdapterCAR-Systems für die weiteren Versuchsreihen ausgewählt.

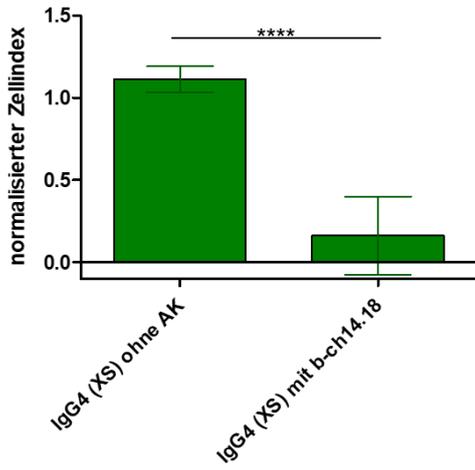
a)



b)



c)



d)

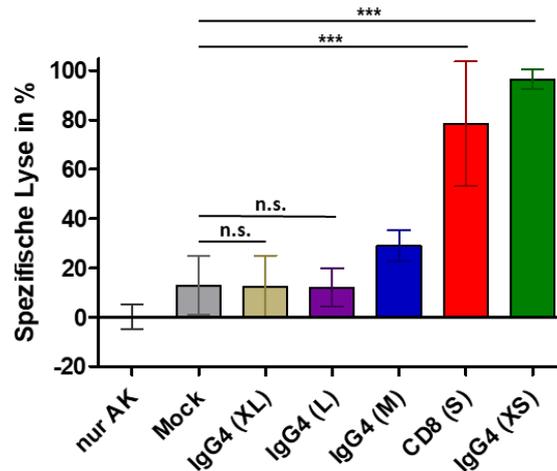


Abb. 3.3 Konstruktvergleich: Spezifische Lyse von GD2⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch die fünf AdCAR-T Konstrukte

Impedanz basierte Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence:

In **a)** und **b)** sind exemplarische repräsentative Zellindexkurven dargestellt. Der Zellindex ist auf der y-Achse aufgetragen, dieser wird bei Effektorenzugabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert. Dargestellt ist der Vergleich der Effektorfunktion der fünf AdCAR-T Konstrukte IgG4 (XS, M, L, XL) und CD8 (S) ohne Antikörperzugabe (**a)** und mit 10ng/ml b-ch14.18 (**b)**). Negativkontrollen: Tumorzellen ohne weitere Zugabe (Kontrolle, schwarze Linie), untransduzierte T-Zellen Mock (hellgraue Linie), Antikörper ohne Effektoren (nur AK, dunkelgraue Linie). Die E:T ratio beträgt 1:1.

c) Statistische Auswertung der Effektorfunktion am Beispiel IgG4 (XS) ohne Antikörper und mit Antikörper. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit Mann-Whitney Test, $p \leq 0,0001$.

d) Spezifische Lyse in % zum Zeitpunkt 10 Stunden. Vergleich der fünf Konstrukte. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

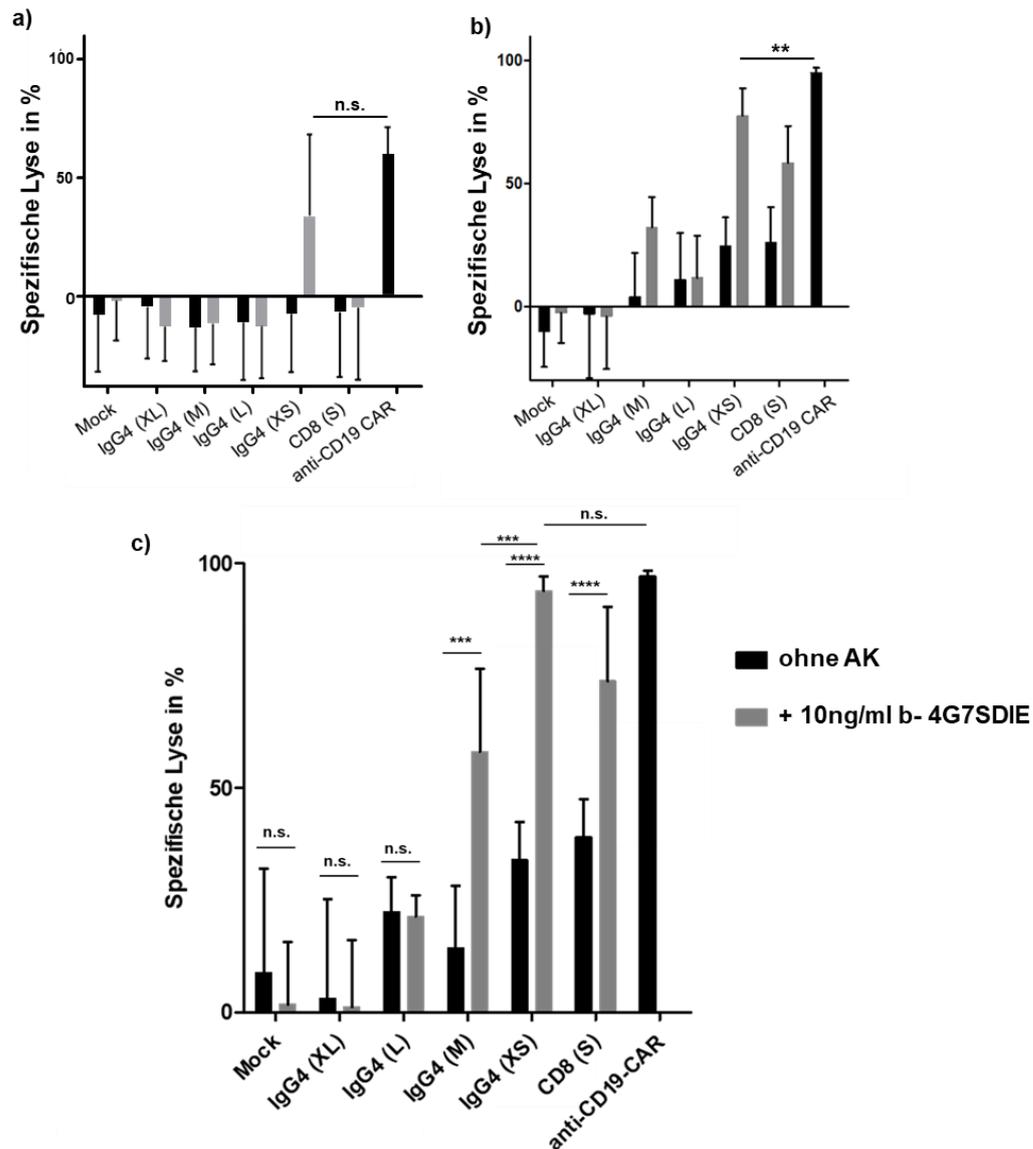


Abb. 3.4 Konstruktvergleich: Spezifische Lyse von CD19⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch die fünf AdCAR-T Konstrukte

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

Auf der y-Achse ist die spezifische Tumorzelllyse in % aufgetragen. Dargestellt ist die Effektorfunktion der fünf AdCAR-T Konstrukte mit und ohne Zugabe von 10 ng/ml b-4G7SDIE. Die Messungen erfolgten nach einer Inkubationszeit von 6 **(a)**, 12 **(b)** und 24 **(c)** Stunden. Negativkontrolle: untransduzierte Zellpopulation Mock. Positivkontrolle: konventionelles anti-CD19 CAR-T. E:T beträgt 1:1. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit Mann-Whitney Test und One-Way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

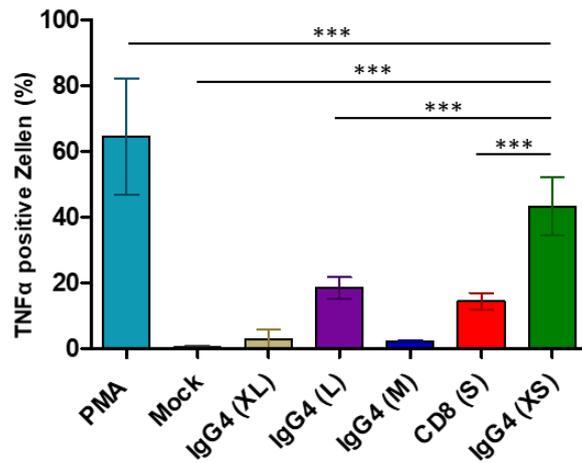


Abb. 3.5 Konstruktvergleich: Akkumulation von TNF α nach Aktivierung durch die fünf AdCAR-T Konstrukte

Messung der Akkumulation von TNF α durch intrazelluläre Färbung.

Es wurden die die fünf AdCAR-T Konstrukte (x-Achse) mit 10ng/ml b-4G7SDIE sowie die Tumorzellen der B-ALL Zelllinie Nalm6 in einer E:T ratio von 1:1 eingestellt. Dargestellt ist die Anzahl TNF α positiver Zellen in % auf der y-Achse. Negativkontrolle: untransduzierte Zellpopulation Mock. Positivkontrolle: PMA-Zugabe. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

3.3 AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse unter verschiedenen E:T Verhältnissen

In den folgenden Experimenten wurde die Aktivierung des AdapterCAR Systems und Tumorzelllyse in unterschiedlichen Effektor – Target Verhältnissen getestet. Als Effektor wurde das zuvor ermittelte stärkste AdCAR-T Konstrukt IgG4 hinge only (XS) verwendet. Die getesteten E:T Verhältnisse umfassten in beiden Versuchsaufbauten einen breiten Bereich von 5:1, 2,5:1, 1,25:1, 0,625:1, 0,3125:1 bis zu 0,15625:1.

Im ersten Versuchsaufbau, der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung gegen die adhärent wachsenden LS Tumorzellen, wurde das AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-ch14.18 als Effektor gegen GD2 getestet. Als Negativkontrollen dienten die Tumorzellen ohne Effektorenzugabe sowie 10ng/ml des biotinylierten monoklonalen Antikörpers b-ch14.18 ohne Effektorenzugabe.

Die Lyse betrug bei einem Effektor – Target Verhältnis von 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 >97%. Auch bei einem E:T Verhältnis von 0,625:1 lysierten die AdCAR-Ts >95% der Zielzellen. Nachfolgend nahm die Effektorfunktion schrittweise ab. Auch im kleinsten E:T Verhältnis von 0,15625:1 zeigte sich noch eine signifikante Reduktion der Zielzellen im Vergleich zur Negativkontrolle (nur Antikörperzugabe, $p \leq 0,001$). Die Impedanz wurde über 10 Stunden gemessen (**Abb.3.6**).

Im Luciferase Kill Assay wurde die Effektorfunktion von AdCAR-T (XS) gegen das lösliche Antigen CD19 der B-ALL Vorläuferzelllinie Nalm6 mit 10ng/ml b-4G7SDIE und ohne Antikörperzugabe untersucht. Die Messung erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten (6, 12 und 24 Stunden). Im höchsten E:T Verhältnis 5:1 betrug die Lyse nach 6 Stunden in Kombination mit dem biotinylierten Antikörper 93% und zeigte sich damit signifikant höher als die Kondition ohne Antikörperzugabe ($p \leq 0,0001$) (**Abb. 3.7 a**).

Nach 12 Stunden Inkubation stieg die Lyse durch AdCAR-T (XS) mit b-4G7SDIE bei einer E:T von 5:1 auf 96%. Auch in den kleineren E:T Bereichen war nun ein Anstieg der Lyse zu verzeichnen. Bei einer E:T von 2,5:1 betrug sie bei dieser zweiten Messung 93%. Bei der E:T ratio 0,15625:1 stieg sie von 0% (nach 6

Stunden Inkubation) auf 43% nach 12 Stunden an. Hier zeigte sich eine Abhängigkeit der Lyse von der E:T ratio. Die Lyse der 5:1 Kondition war signifikant besser als die Kondition 0,15625:1 ($p \leq 0,0001$) (**Abb. 3.7 b**).

Die letzte Messung erfolgte nach 24 Stunden Inkubation. Die Lyse glich sich nach dieser Inkubationszeit innerhalb der verschiedenen E:T Bereiche weiter an. Hier zeigte sich schrittweise von der größten bis zur kleinsten E:T ratio abnehmend eine Tumorzellyse von 97%, 96%, 95%, 93%, 87% und 74% durch das AdCAR-T (XS) mit b-4G7SDIE. Der Unterschied zwischen größtem und kleinsten E:T Bereich war signifikant ($p \leq 0,0001$) (**Abb. 3.7 c**). Deutlich wird in allen drei Schaubildern die Überlegenheit des AdCAR-T Systems mit biotinyliertem Antikörper im Gegensatz zu den AdCAR-Ts ohne Antikörperzugabe. Bei höherer E:T ratio und längerer Inkubationszeit stieg auch die unspezifische Lyse an, unterschied sich jedoch auch im 5:1 Bereich signifikant von der Lyse mit biotinyliertem Antikörper ($p \leq 0,001$).

Weiterhin wurde das direkte anti-CD19 CAR-T sowie AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml gegen das Zielantigen CD19 der B-ALL Vorläuferzelllinie Nalm6 in unterschiedlichen Effektor – Target Verhältnissen (gleicher Bereich wie oben beschrieben) getestet und verglichen. Auch hier wurde nach 6, 12 und 24 Stunden eine Messung durchgeführt. Nach 6 Stunden Inkubation zeigte sich durch das anti-CD19 CAR-T eine spezifische Lyse von 100% im höchsten E:T Verhältnis. Die Lyse durch das AdCAR-T (XS) betrug 87%, der Unterschied war signifikant ($p \leq 0,01$) (**Abb. 3.8 a**).

Nach 12 Stunden Inkubation zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit vom E:T Verhältnis. Das anti-CD19 CAR wies weiterhin ab einem E:T Verhältnis von 1,25:1 eine signifikant bessere Lyse als das AdCAR-T (XS) auf ($p \leq 0,01$), in den höheren Verhältnissen war kein signifikanter Unterschied messbar (**Abb. 3.8 b**). Bei der letzten Messung nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank zeigte das anti-CD19 CAR-T eine Lyse von > 95%, das AdCAR-T von > 85 % bei einem E:T Verhältnis von 0,3125. Ein Absinken der Effektorfunktion durch kleinere E:T Verhältnisse war zu verzeichnen, die Lyse glich sich mit längerer Inkubationszeit jedoch weiter an. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden verglichenen Effektoren zeigte sich lediglich in der kleinsten E:T ratio ($p \leq 0,05$). Der

Unterschied zwischen 5:1 und 0,15625:1 zeigte sich in beiden Konditionen signifikant (jeweils $p \leq 0,01$, nicht im Schaubild dargestellt) (**Abb. 3.8 c**).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigten zum einen eine signifikante Abhängigkeit der Aktivierung des AdapterCAR Systems durch AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) kombiniert mit den spezifischen biotinylierten monoklonalen Antikörpern b-ch14.18 bzw. b-4G7SDIE. Die spezifische Tumorzellyse war nach 6 und 12 Stunden Inkubation vom Verhältnis der Effektoren zu den Zielzellen abhängig. Sie verlief bei höheren E:T Verhältnissen schneller und effektiver. Nach 24 Stunden Inkubation glich sich die Lyse zwischen den verschiedenen E:T Verhältnissen zunehmend an. Einen Unterschied in der Lyse der beiden Zelllinien LS und Nalm6 zeigte sich nicht.

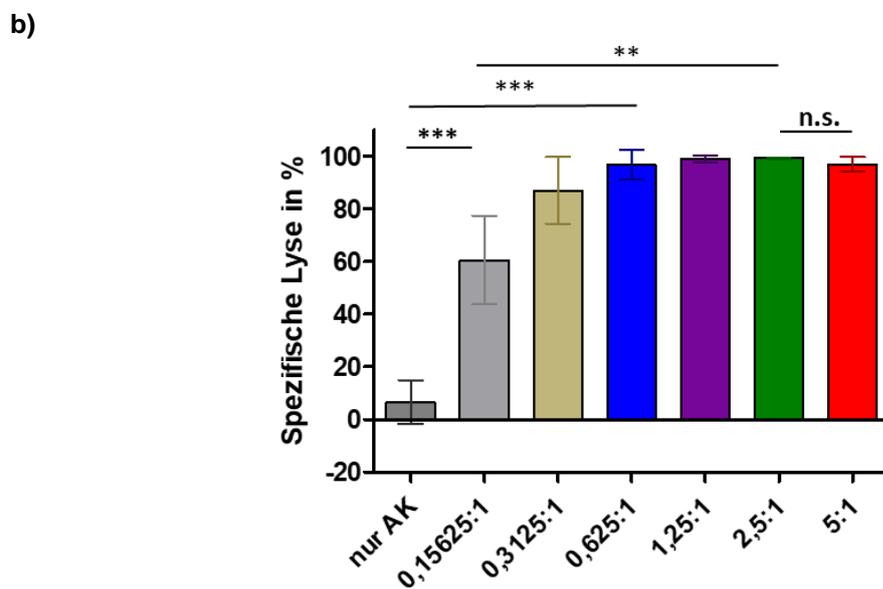
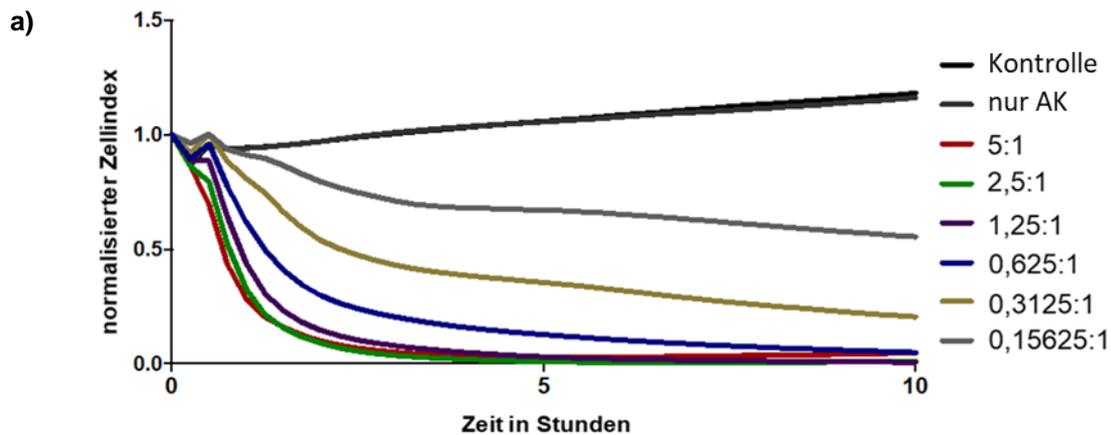


Abb. 3.6 E:T Abhängigkeit: Spezifische Lyse von GD2⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)

Impedanz basierte Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence:

a) Es sind exemplarische repräsentative Zellindexkurven dargestellt. Der Zellindex ist auf der y-Achse aufgetragen, dieser wird bei Effektorengabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-ch14.18 von verschiedenen E:T Verhältnissen. Negativkontrollen: Tumorzellen ohne weitere Zugabe (Kontrolle, schwarze Linie) und b-ch14.18 ohne Effektoren (nur AK, dunkelgraue Linie).

b) Spezifische Lyse in % zum Zeitpunkt 10 Stunden. Vergleich der E:T Abhängigkeit. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

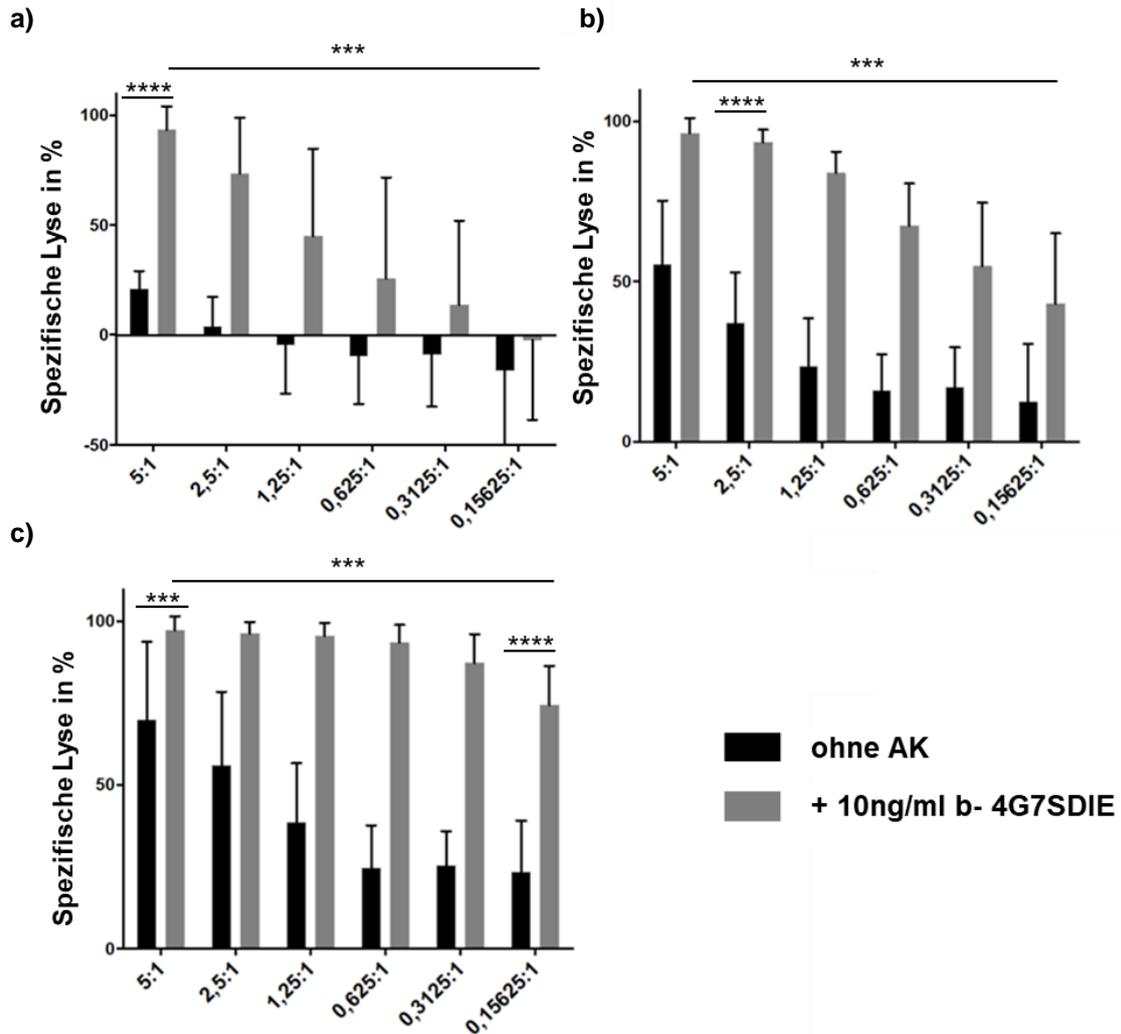


Abb. 3.7 E:T Abhängigkeit: Spezifische Lyse von CD19⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

Auf der y-Achse ist die spezifische Tumorzelllyse in % aufgetragen. Dargestellt ist die Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) mit und ohne Zugabe von 10 ng/ml b-4G7SDIE unter verschiedenen E:T Verhältnissen (x-Achse). Die Messungen erfolgten nach einer Inkubationszeit von 6 **(a)**, 12 **(b)** und 24 **(c)** Stunden. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit Mann-Whitney Test und One-Way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test.

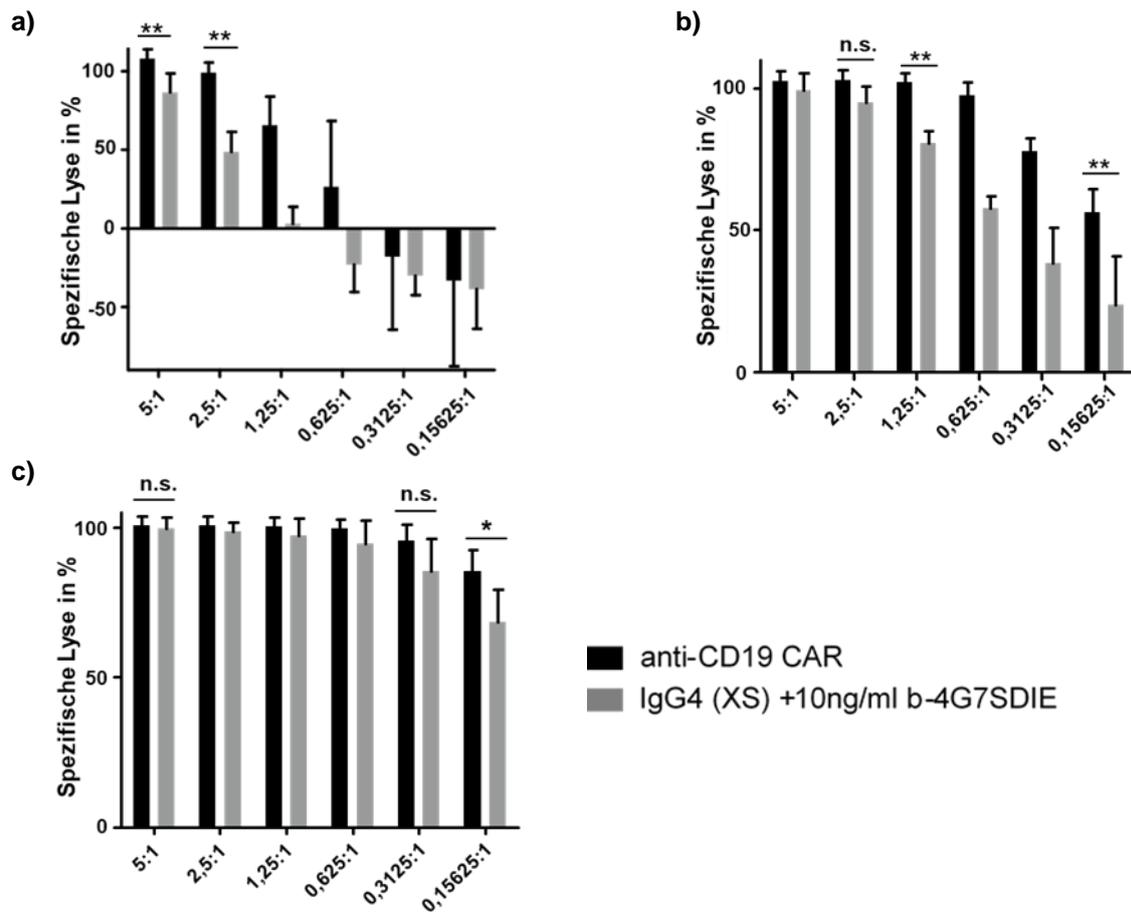


Abb. 3.8 Vergleich mit anti-CD19 CAR-T: Spezifische Lyse CD19⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

Auf der y-Achse ist die spezifische Tumorzellyse in % aufgetragen. Dargestellt ist die Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-4G7SDIE verglichen mit konventionellen anti-CD19 CAR-T Zellen unter verschiedenen E:T Verhältnissen (x-Achse). Die Messungen erfolgten nach 6 (a), 12 (b) und 24 (c) Stunden Inkubationszeit. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit Mann-Whitney Test.

3.4 AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse unter verschiedenen Antikörperdosierungen

Um den Bereich bestmöglicher Effektorfunktion im AdapterCAR System herauszufinden, wurden die Adaptermoleküle b-4G7SDIE und b-ch14.18 in verschiedenen Konzentrationen austitriert. Dieser Bereich der Antikörperkonzentrationen umfasste 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 100pg/ml und 10pg/ml. Für alle Experimente wurde das AdCAR-T Konstrukt IgG4 hinge only (XS) als Effektor gegen Tumorantigen GD2 in der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung xCELLigence sowie gegen CD19 im Luciferase Kill Assay verwendet.

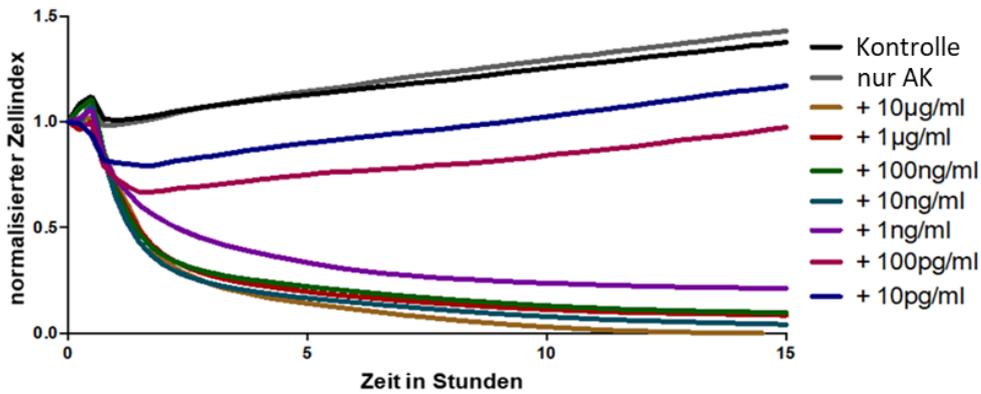
In der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung zeigte sich eine signifikante Lyse durch das AdCAR-T (XS) mit b-ch14.18 in einem Konzentrationsbereich von 10µg/ml bis 1ng/ml zwischen 81% und 97% nach regelmäßiger Impedanzmessung über 15 Stunden (**Abb. 3.9 a**). Die Lyse der Kondition 10µg Antikörper im Vergleich zur Negativkontrolle (nur AK) beispielsweise war signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,001$). Im Spektrum 10µg/ml – 1ng/ml unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant voneinander. Eine Verschlechterung der Lyse wurde ab 100pg/ml b-ch14.18 deutlich (**Abb. 3.9 b**).

Im Luciferase Kill Assay gegen Tumorantigen CD19 stellte sich die stärkste Effektorfunktion des AdCAR-Ts IgG4 hinge only (XS) in Kombination mit b-4G7SDIE in einem Antikörperkonzentrationsbereich von 1ng/ml bis 100ng/ml dar. Die spezifische Lyse wurde nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation im Brutschrank gemessen. Nach 6 Stunden zeichnete sich bereits die effektivste AdCAR-T Aktivierung anhand der spezifischen Lyse der B-ALL Zellen im Antikörperbereich von 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml ab. Dieses Ergebnis zeigte sich auch nach 12 und 24 Stunden Inkubation (glockenförmiger Verlauf, **Abb. 3.10 a**). Bei der letzten Messung nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank betrug die Lyse des AdCAR-T (XS) 94% (mit 1ng/ml b-4G7SDIE), 99% (mit 10ng/ml b-4G7SDIE) und 98 % (mit 100ng/ml 4G7SDIE). Diese drei Konditionen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Signifikant schlechter zeigte sich hingegen die Lyse ohne Antikörperzugabe, beispielsweise im Vergleich zur Antikörperzugabe von 10ng/ml ($p \leq 0,001$). Weiterhin zeigte sich auch eine

Verschlechterung der Lyse mit höheren Antikörperkonzentrationen als 100ng/ml. Der Unterschied zwischen 10ng/ml b-ch1.18 und 10µg/ml b-ch14.18 war signifikant nachweisbar ($p \leq 0,05$) (**Abb. 3.10 b**).

Die Ergebnisse der Titrationsexperimente zeigten, dass die AdCAR-T Aktivierung und Zelllyse von der zugegebenen Konzentration der jeweiligen spezifischen biotinylierten Antikörper abhängen. In der Zytotoxizitätsmessung zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der Lyse bei 100pg/ml Antikörperzugabe und weniger. Beim Luciferase Kill Assay stellte sich die beste Lysefunktion im Bereich von 1-100ng/ml ein. Die Antikörperdosis von 10ng/ml wurde für die weiteren Experimente mit b-ch14.18 und b-4G7SDIE im AdCAR-T System ausgewählt.

a)



b)

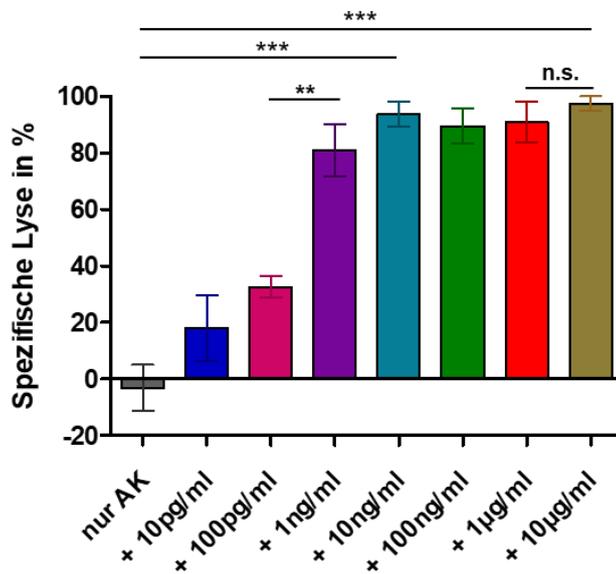


Abb. 3.9 Antikörpertitration: Spezifische Lyse von GD2⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)

Impedanz basierte Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence:

a) Es sind exemplarische repräsentative Zellindexkurven dargestellt. Der Zellindex ist auf der y-Achse aufgetragen, dieser wird bei Effektorenzugabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert.

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) von verschiedenen Antikörperdosierungen (b-ch14.18). Negativkontrollen: Tumorzellen ohne weitere Zugabe (Kontrolle, schwarze Linie) und b-ch14.18 ohne Effektoren (nur AK, dunkelgraue Linie). Die E:T beträgt 1:1.

b) Spezifische Lyse in % zum Zeitpunkt 10 Stunden. Vergleich der verschiedenen Antikörperdosierungen. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

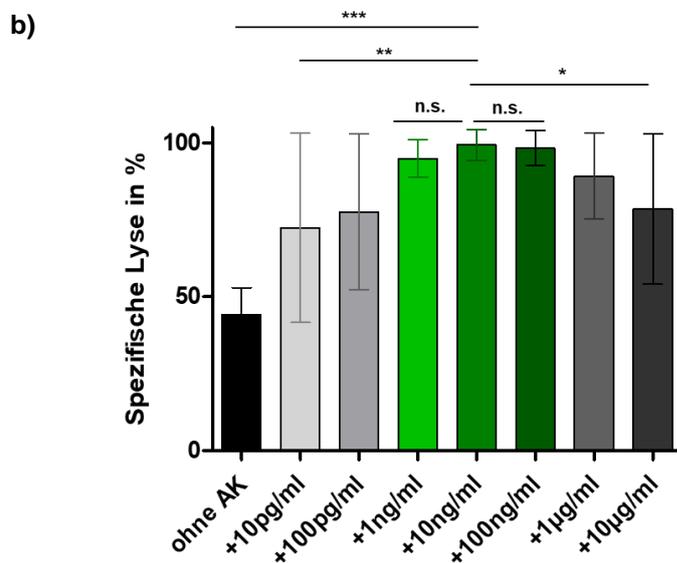
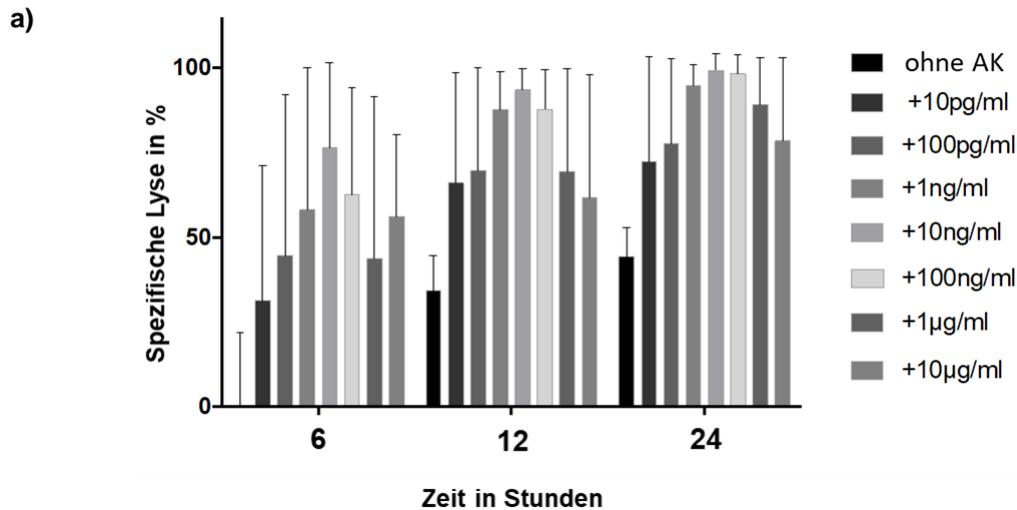


Abb. 3.10 Antikörpertitration: Spezifische Lyse von CD19⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

a) Auf der y-Achse ist die spezifische Tumorzelllyse in % aufgetragen. Dargestellt ist die Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) mit verschiedenen Antikörperdosierungen von b-4G7SDIE (Balken in verschiedenen Grautönen) und ohne Antikörperzugabe (schwarze Balken). Gemessen wurde nach einer Inkubationszeit von 6 (links), 12 (Mitte) und 24 Stunden (rechts). Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3).

b) Auswertung nach 24 Stunden (rechter Block aus Schaubild a)): Spezifische Lyse in % der Effektorfunktion von AdCAR-T (XS) mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,01$.

3.5 AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzellyse mit unbiotinyliertem Antikörper oder Antikörper irrelevanter Spezifität

Eine ausschlaggebende Voraussetzung für die Kontrollier- und Steuerbarkeit der AdCAR Technologie ist, dass die AdCAR-Ts lediglich in Anwesenheit von antigenspezifischen *und* biotinylierten Adaptermolekülen (monoklonalen Antikörpern) sowie den antigenpräsentierenden Tumorzellen aktiviert werden. Diese Konditionen wurden in den folgenden Experimenten untersucht.

Dazu wurde die Effektorfunktion des AdCAR-Ts IgG4 hinge only (XS) in der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung xCELLigence gegen das Tumorantigen GD2 unter verschiedenen Konditionen getestet. Um die Biotinspezifität des Systems nachzuweisen, wurde das AdCAR-T (XS) in Kombination mit dem „regelrechten“ spezifischen b-ch14.18 sowie dem unbiotinylierten GD2 Antikörper ch14.18 verglichen. Außerdem wurde der gegen das „fremde“ Tumorantigen CD19 gerichtete biotinylierte 4G7SDIE zusammen mit dem AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) im gleichen Experiment verwendet, um die Antikörperspezifität nachzuweisen. Alle verwendeten Antikörper wurden in einer, nach den Antikörpertitrationsexperimenten günstigen, Konzentration von 10ng/ml verwendet (siehe **Kap. 3.4**). Die Zellen wurden in einer E:T von 1:1 eingestellt. Das Ergebnis des Versuchs zeigte eine signifikante Lyse der Neuroblastomzellen durch das AdCAR-T (XS) in Kombination mit dem b-ch14.18. Sie betrug nach 15 stündiger Inkubation im Brutschrank 88%. Damit unterscheidet sich das Ergebnis signifikant von den beiden Kontrollkonditionen mit dem spezifischen GD2 Antikörper ch14.18 ohne Biotinylierung sowie mit dem b-4G7SDIE „fremder“ Spezifität (im Vergleich zum b-ch14.18 jeweils $p \leq 0,001$). Diese wiesen eine wesentlich geringere Lyse auf und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (**Abb. 3.11**).

Im Luciferase Kill Assay gegen Tumorantigen CD19 wurden entsprechende Bedingungen geschaffen: Die Effektorfunktion des AdCAR-T IgG 4 hinge only (XS) wurde in Anwesenheit des CD19 Antikörpers 4G7SDIE mit und ohne Biotin als auch des b-ch14.18 „fremder“ Spezifität verglichen. Die Zellen wurden in einem E:T Verhältnis von 1:1 eingestellt. Die Dosis der Antikörper betrug jeweils

10ng/ml. Die Messung erfolgte nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank. Die spezifische Lyse der B-ALL Tumorzellen durch AdCAR-T (XS) mit b-4G7SDIE zeigte mit 93% eine signifikant bessere Lyse als die anderen beiden getesteten Antikörper (jeweils $p \leq 0,001$). Diese unterschieden sich in ihrer Effektorfunktion nicht signifikant voneinander (**Abb. 3.12**).

Die Ergebnisse der Versuchsreihen gegen beide Tumorantigene zeigten eine signifikante Lyse der Zielzellen durch den Effektor AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) in Kombination mit dem spezifisch gegen das Tumorantigen gerichteten biotinylierten Antikörper. Weder der biotinylierte Antikörper jeweils „fremder“ Spezifität noch der spezifisch gegen das Zielantigen gerichtete Antikörper ohne Biotin zeigten eine vergleichbare Aktivierung des AdCAR-T (XS) und Tumorzelllyse. Die Ergebnisse der Versuchsreihe schließen eine vergleichbare Lyse durch eigentoxische Wirkungen des GD2 Antikörpers ch14.18 und CD19 Antikörpers 4G7SDIE aus.

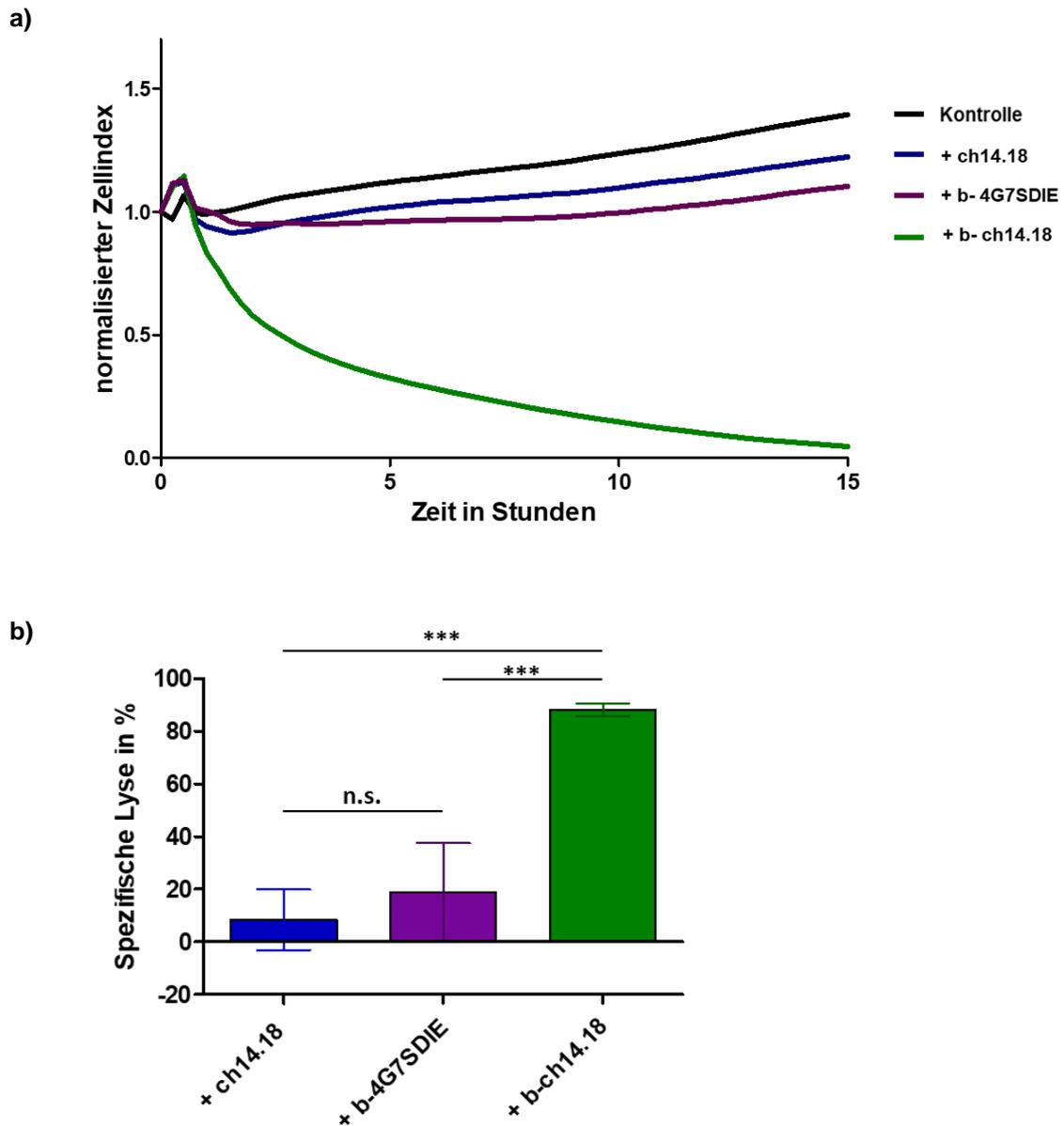


Abb. 3.11 Spezifität: Lyse von GD2⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)

Impedanz basierte Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence:

a) Es sind exemplarische repräsentative Zellindexkurven dargestellt. Der Zellindex ist auf der y-Achse aufgetragen, dieser wird bei Effektorengabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert. Dargestellt ist die Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) mit jeweils 10ng/ml b-ch14.18 (grün), dem unbiotinylierten ch14.18 (blau) und dem biotinylierten CD19 Antikörper b-4G7SDIE (lila). Negativkontrolle: Tumorzellen ohne weitere Zugabe (schwarz). Die E:T beträgt 1:1.

b) Spezifische Lyse in % zum Zeitpunkt 10 Stunden. Vergleich der verschiedenen Antikörper. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

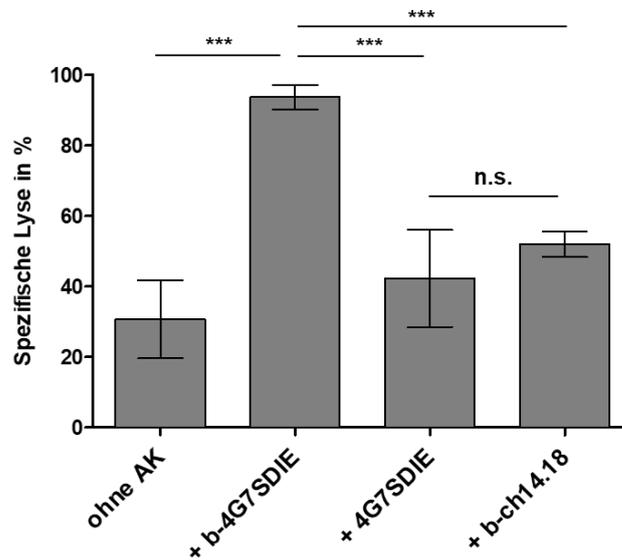


Abb. 3.12 Spezifität: Lyse von CD19⁺ B-ALL Zellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

Auf der y-Achse ist die spezifische Lyse in % dargestellt. Verglichen wurde die Effektorfunktion von AdCAR-T (XS) ohne Antikörper, mit jeweils 10ng/ml b-4G7SDIE, dem unbiotinylierten 4G7SDIE sowie b-ch14.18 (Balken von links nach rechts). Die E:T beträgt 1:1. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

3.6 AdCAR-T-Aktivierung und Tumorzelllyse mit freiem Biotin und Humanserum

Biotin ist ein natürliches Vitamin, das physiologischerweise im menschlichen Blut in einer Konzentration von 0,4 - 1,2 µg/l vorkommt (siehe **Kap. 1.8**).

Um mögliche Interferenzen *in vivo* frühzeitig zu erkennen, wurde das AdCAR-T System in der letzten Versuchsreihe in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an freiem Biotin untersucht. Hierzu wurde die Menge um ein Vielfaches der physiologischen Konzentration erhöht, um eine Beeinträchtigung oder Interferenz des AdCAR Systems durch freies Biotin detektieren zu können. Der getestete Konzentrationsbereich umfasste freie Biotinkonzentrationen von 3 mmol/l, 300 mmol/l und 30000 mmol/l.

Im Versuchsaufbau wurde das AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) in der Echtzeit Zytotoxizitätsmessung xCELLigence gegen die Neuroblastomzelllinie LS in Anwesenheit von 10ng/ml b-ch14.18 unter Zugabe der drei verschiedenen freien Biotinkonzentrationen getestet. Die Effektor- und Zielzellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 eingestellt. Als Positivkontrolle wurden die Effektoren mit b-ch14.18 ohne freies Biotin verwendet, als Negativkontrolle die Neuroblastomzellen ohne weitere Zugabe (Kontrolle). Das Ergebnis nach 15 stündiger Inkubation zeigte eine Lyse von 94% durch das AdCAR-T (XS) mit biotinyliertem Antikörper ohne freies Biotin. Unter Zugabe der drei supraphysiologisch hohen Biotinmengen betrug die Lyse weiterhin 94% (+3 mmol/l Biotin), 93% (+300 mmol/l Biotin) sowie 91% (+30000 mmol/l Biotin). Diese drei Konditionen unterschieden sich, auch im Vergleich ohne Biotinzugabe, nicht signifikant voneinander. Die Effektorzellen ohne Antikörperzugabe führten im Vergleich zu den Konditionen mit Antikörper zu einer signifikant schlechteren Lyse ($p \leq 0,001$) (**Abb. 3.13**).

Entsprechende Bedingungen wurden im Luciferase Kill Assay gegen das Zielantigen CD19 der Zelllinie Nalm6 geschaffen und verglichen. Das AdCAR-T (XS) wurde mit 10ng/ml b-4G7SDIE bzw. ohne Antikörperzugabe mit 3 mmol/l, 300 mmol/l und 30000 mmol/l freiem Biotin sowie ohne Biotinzugabe untersucht. Die E:T betrug 1:1. Als weitere Kondition wurden das AdCAR-T (XS)

und 10ng/ml b-4G7SDIE mit 50% Humanserum versehen. Das Schaubild **3.14** zeigt das Ergebnis nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank. Das AdCAR-T (XS) ergab mit Antikörperzugabe ohne zusätzliches Biotin eine Lyse von 93% der Zielzellen. Auch die Lyse unter Zugabe von freiem Biotin zeigte sich als nicht beeinträchtigt (96% mit 3 mmol/l Biotin, 95% mit 300 mmol/l Biotin und 96% mit 30000 mmol/l Biotin). Die vier Konditionen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (im Schaubild beispielhaft dargestellt). Die Zugabe von 50% Humanserum ergab eine Lyse von 92%. Ein signifikanter Unterschied zur Kondition ohne Biotin zeigte sich nicht (**Abb. 3.14 b**).

Die Lyse ohne Antikörperzugabe verlief signifikant geringer (**Abb. 3.14 a**).

Die Ergebnisse beider Experimente gegen die beiden verschiedenen Tumorantigene zeigten signifikant eine gleichsam starke Aktivierung des AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) in Anwesenheit des jeweiligen spezifischen biotinylierten Antikörpers mit folgender Tumorzelllyse auch in Anwesenheit aller getesteten Biotinkonzentrationen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ohne Zugabe freien Biotins und Anwesenheit höchster supraphysiologischer Konzentrationen gegen beide Tumorantigene.

Ebenfalls wurde die Effektivität des AdapterCAR Systems durch Zugabe von 50% Humanserum im Luciferase Kill Assay nicht beeinflusst. Vergleichbar zum Ergebnis der Positivkontrolle ohne zugegebenes Humanserum (Lyse von 94%) betrug die Tumorzelllyse hier 92%. Eine negative Beeinflussung wie eine abgeschwächte Effektorfunktion im AdCAR-T System durch das im menschlichen Organismus vorkommende freie Biotin oder Humanserum ist nach Auswertung dieser Experimente nicht zu erwarten.

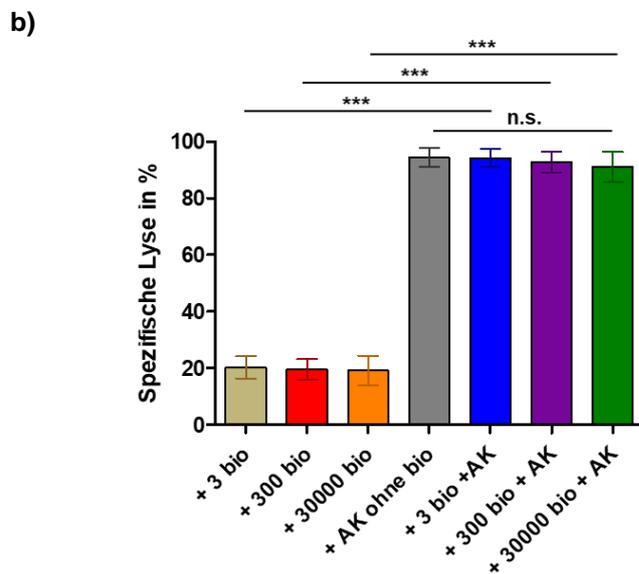
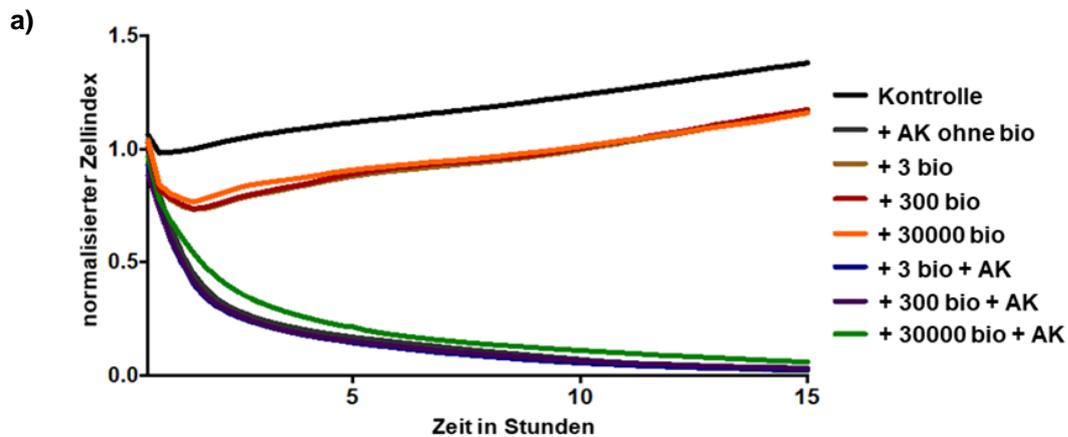


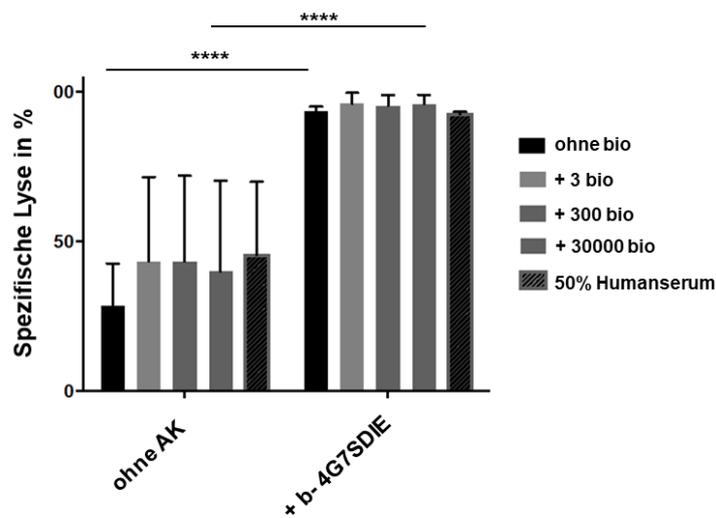
Abb. 3.13 Freies Biotin: Spezifische Lyse von GD2⁺ Tumorzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)

Impedanz basierte Echtzeit Zytotoxizitätsmessung (RTCA) xCELLigence:

a) Es sind exemplarische repräsentative Zellindexkurven dargestellt. Der Zellindex ist auf der y-Achse aufgetragen, dieser wird bei Effektorenzugabe zum Zeitpunkt 0 auf 1 normalisiert. Dargestellt ist der Vergleich der Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) unter Zugabe unterschiedlicher supraphysiologischer Mengen Biotin (im Schaubild bio genannt, 3 mmol/l, 300 mmol/l und 30000 mmol/l) mit 10ng/ml b-ch14.18 (blaue, lila, grüne Linie) und ohne Antikörperzugabe (hellbraune, rote, orangene Linie). Negativkontrolle: Tumorzellen ohne weitere Zugabe (Kontrolle, schwarze Linie). Positivkontrolle: AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-ch14.18 ohne freies Biotin (graue Linie). Die E:T beträgt 1:1.

b) Spezifische Lyse in % zum Zeitpunkt 10 Stunden. Vergleich der Zugabe freien Biotins. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,0001$.

a)



b)

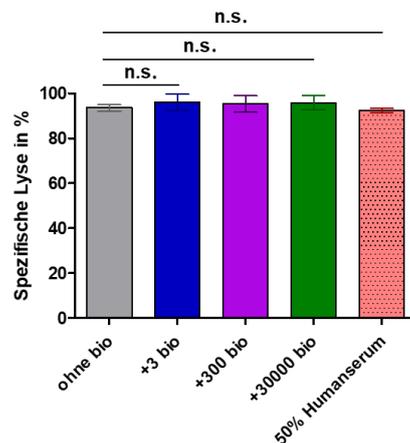


Abb. 3.14 Freies Biotin und Humanserum: Spezifische Lyse CD19⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)

Luciferase Zytotoxizitäts Assay:

a) Auf der y-Achse ist die spezifische Tumorzelllyse in % aufgetragen. Dargestellt ist die Effektorfunktion des AdCAR-T (XS) unter Zugabe unterschiedlicher supraphysiologischer Mengen Biotin (im Schaubild bio genannt, 3 mmol/l, 300 mmol/l und 30000 mmol/l, Balken in verschiedenen Grautönen), ohne Antikörperzugabe (linke Seite der x-Achse) und mit 10ng/ml b-4G7SDIE (rechte Seite der x-Achse). Der jeweils rechte schraffierte Balken stellt das AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-4G7SDIE und Zusatz von 50% Humanserum dar. Ausgewertet mit Mann-Whitney Test.

b) Spezifische Lyse in % der Effektorfunktion von AdCAR-T (XS) mit 10ng/ml b-4G7SDIE. Vergleich der Zugabe freien Biotins. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit SD dargestellt (n=3). Ausgewertet mit One-Way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $p \leq 0,01$.

4 Diskussion

Die immuntherapeutischen Methoden in der Krebstherapie von Erwachsenen als auch von Kindern haben sich in den letzten Jahren, zusätzlich zu den bisherigen Therapien durch Bestrahlung, Operation und Chemotherapie, zu einer vierten Therapiesäule entwickelt, die nicht mehr wegzudenken ist [16]. Insbesondere der adoptive Zelltransfer von T-Zellen, darunter die Anwendung von chimären Antigenrezeptoren (CARs), hat sich als eine der erfolgversprechendsten innovativen Therapien herauskristallisiert. Bemerkenswerte Erfolge der CAR-Therapie wurden beschrieben [55]. Jedoch birgt sie schwerwiegende Nebenwirkungen wie Antigenevasion, CRS (cytokine release syndrome) oder Schädigung von gesundem Gewebe, die die Therapieerfolge bisher stark einschränken. Es ist daher eine bedeutende Notwendigkeit, das CAR-T System weiterzuentwickeln und zu verbessern. Deshalb wird hier ein neues Konzept der CAR-Therapie vorgestellt. Es basiert auf der Trennung von Antigenerkennung und T-Zell-Aktivierung unter Einsatz von bifunktionalen Adaptermolekülen in Form biotinylierter monoklonaler Antikörper.

Eingesetzt gegen die Tumorantigene CD19 der B-ALL Zelllinie Nalm6 und GD2 der Neuroblastomzelllinie LS wird ein breites Spektrum pädiatrischer hämatologisch-onkologischer Erkrankungen repräsentiert. Ziel ist die Verbesserung des vielversprechenden konventionellen CAR-T Ansatzes durch Verminderung der schwerwiegenden Nebenwirkungen, die bisher häufig die Limitation der Behandlung darstellen [119]. Bedingungen für eine erfolgreiche Therapie sind die Kontrollierbarkeit und erhöhte Patientensicherheit in der CAR-Therapie durch regulierbare „ON“- und „OFF“-Zustände, universelle Anwendbarkeit durch flexible Auswahl und Austausch der Adaptermoleküle sowie sequenziellen oder simultanen Angriff gegen verschiedene Tumorantigene und eine einfache Umsetzbarkeit in die Klinik bei gleichwertiger Effizienz zur bisherigen konventionellen CAR-Therapie.

4.1 Bisherige Adapter-CAR Systeme

Diverse Methoden zur Weiterentwicklung des konventionellen CAR Systems wurden beschrieben (siehe **Kap.1.7**). So auch Studien auf der Basis, Antigenerkennung und T-Zell Aktivierung durch Einsatz eines Adaptermoleküls zu trennen.

Ein veröffentlichter Ansatz ist das programmierbare, universale SUPRA CAR von *Cho et al.* [120]. Es besteht aus einem Zwei-Komponenten-Rezeptor-System, die durch „Reißverschlüsse“ (zipper) miteinander kompatibel sind. Die erste Komponente stellt die intrazellulär gelegene Signaldomäne dar, die mit einem extrazellulären Leucin-Zipper fusioniert ist (zipCAR). Die zweite Komponente (Adaptermolekül) besteht aus einem scFv-Teil mit einem weiteren ähnlichen Leucin-Zipper (zipFv). Der spezifische scFv-Teil bindet das gewünschte Tumorantigen und der Leucin-Zipper wiederum das zipCAR. Letzteres wird somit aktiviert. Auf diese Weise ist auch das Targeting von multiplen Antigenen möglich [120]. Innerhalb des Systems weist das SUPRA CAR diverse Regulierungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Affinität zwischen Leucin-Zipper-Paaren oder die Konzentration von zipFv auf, die das System durch feines Abstimmen der T-Zell Funktion kontrollierbarer machen. Durch Zugabe von kompetitiven zipFv, die an das spezifische zipFV binden und die Wirkung somit inhibieren, kann kontrolliert ein „OFF“-Zustand hergestellt werden, der Patienten zum Beispiel im Falle eines schweren CRS Sicherheit bieten kann. Die Anwendung von diversen zipFv, die Antigene einzeln oder simultan angreifen und die Tumorzellen in gleichwertiger Weise lysieren („OR“- gate), stellt eine effiziente Methode gegen den Verlust von Antigenen im Rahmen der Immunevasion dar. Um der Immunogenität durch synthetisch hergestellte Leucin-Zipper vorzubeugen, wurden zipCAR - und zipFv - Komponenten kreiert, die von humanen Transkriptionsfaktoren abstammen. Eine gleichwertige Zytotoxizität gegenüber synthetisch hergestellten Leucin-Zippern konnte nachgewiesen werden [120].

Ein weiteres Prinzip ist die Verwendung spezifischer „Schalter“ (switch), die die Aktivität der CAR-Ts im Falle schwerer toxischer Nebenwirkungen „ausschalten“ können. Bereits veröffentlichte Ansätze beschreiben sogenannte „kill switches“ unter Verwendung von Suizidgenen wie beispielsweise iCasp9 [94, 121]. Nachteilig werden die T-Zellen dabei irreversibel eliminiert (siehe **Kap.1.7**).

Darauf basierend kreierten *Rodgers et al.* eine Methode unter Verwendung von sogenannten „switchable CAR-Ts“ (sCAR-Ts), in der diese in der Lage sind, zielgerichtet ein neues Epitop, das in einen spezifischen monoklonalen Antikörper integriert wurde, zu erkennen und zu binden [122]. Dieses Peptid - Neoepitop (PNE) unterscheidet sich von weiteren endogenen Strukturen des Körpers, somit erfolgt die Bindung und Aktivierung der sCAR-Ts über den anti-PNE scFv-Teil spezifisch und lediglich in Anwesenheit des Antikörpers mit dem PNE. Der „Schalter-Effekt“ (switch) erlaubt eine bessere Kontrollierbarkeit über die Geometrie der immunologischen Synapsen und zeitliche Interaktion zwischen sCAR-T, Antikörper und Tumorzielzelle *in vitro* und *in vivo*, vergleichbar den Ergebnissen konventioneller CAR-Ts [122]. Eine irreversible Elimination (kill switch) der sCAR-Ts erfolgt dabei nicht.

CAR-Bindungsdomänen, die an verschiedene Lokalisationen in Adaptermolekülen integriert werden, können neben kurzen Peptiden auch Fc-Domänen darstellen [123, 124]. Diese Methode birgt allerdings die Gefahr von autoimmunen Reaktionen über endogene Immunglobuline. Neben der primären Integration der CAR-Bindungsdomäne in das Adaptermolekül gibt es weitere Ansätze in der Verbesserung der konventionellen CAR-Therapien, bei denen die Bindungsdomäne an ein bereits existierendes Adaptermolekül wie einen monoklonalen Antikörper konjugiert und in eine Sekundärreaktion eingebunden ist [101].

Ein bisher veröffentlichter Ansatz ist beispielsweise die Verwendung von FITC- (fluorescein isothiocyanate) konjugierten Markern [125-127].

Diese Methode beschreibt die Arbeitsgruppe von *Ma et al.* [127]. Sie konjugierten den synthetischen Farbstoff FITC an CD19 und CD22 Antikörperfragmente. Ein anti-FITC scFv-Teil wurde in ein CAR der zweiten Generation integriert und erfolgreich in funktionellen Assays unter anderem gegen die Zelllinien Nalm6 und Raji getestet. Unterschiede in der Effektivität der Tumorzelllyse zeigten sich je nach Ort der FITC-Konjugation am Antikörperfragment. Durch diese jeweils ortsspezifische Proteinkonjugation am Adaptermolekül kann die Geometrie und Stöchiometrie der komplexen Formation zwischen den Tumorzellen- und anti-FITC CARs präzise kontrolliert werden [127].

Die Übertragung adapterbasierter CAR-Systeme mit sicher verwendbaren Markern (anti-tag CARs) in die Klinik stellt eine große Herausforderung dar. Um keine Immunogenität zu erzeugen, bietet sich die Verwendung endogener Vitamine des Körpers an [101]. Der Einsatz biontinylierter Antikörper im Rahmen der CAR-T Therapie wurde bereits von *Urbanska et al.* sowie von *Lohmueller et al.* beschrieben [128, 129].

Urbanska et al. entwarfen CAR-Konstrukte der ersten und zweiten Generation. Der Biotinantagonist Avidin wurde extrazellulär in monomerer (mcAv) oder dimerer (dcAv) Form an die Konstrukte konjugiert [128]. Aktiviert werden die CAR-Ts in Anwesenheit biotinylierter Adaptermoleküle in Form von Antikörpern und scFv-Teilen, die wiederum spezifisch an gewünschte Tumorantigene binden. In funktionellen Assays gegen Tumorantigene unterschiedlicher Tumorentitäten erwies sich das Adaptersystem im Vergleich zu konventionellen CAR-Ts als gleichwertig effizient, vielseitig und spezifisch einsetzbar, wobei die CARs zweiter Generation mit Konjugation der dimeren Avidinform überlegen waren [128].

Auch *Lohmueller et al.* veröffentlichten einen biotin-basierten AdapterCAR Ansatz [129]. Dazu entwarf die Arbeitsgruppe anti-tag CARs (AT-CARs), die in der Lage sind, biotinylierte CD19 und CD20 Antikörper unter Verwendung einer CAR-Bindungsdomäne zu erkennen, die wiederum monomeres Streptavidin 2 (mSA2) beinhaltet [129]. Streptavidin zeichnet sich ähnlich wie Avidin durch eine

hohe Affinität zu Biotin aus [130]. Kreiert wurde jeweils ein CAR-Konstrukt der zweiten Generation. Als Adaptermolekül wurde Rituximab (anti-CD20) biotinyliert. Eine spezifische und effiziente Tumorzelllyse sowie potente Zytokinproduktion der mSA2-CARs konnte in Kombination mit biotinyliertem Rituximab nachgewiesen werden. Weiterhin waren die Ergebnisse vergleichbar mit denen konventioneller CAR-T-Zellen [129].

Biotin scheint als endogenes Vitamin besser tolerabel zu sein als körperfremde Proteine wie FITC oder PNE [129]. Dennoch birgt auch die Therapie mit marker (tag) -basierten Adaptersystemen unter Verwendung biotinylierter Moleküle Risiken. Sowohl Avidin als auch Streptavidin sind keine humanen Proteine [101]. Studien beschreiben zahlreiche Immunantworten im Rahmen adoptiver T-Zell Therapien, in deren Setting artfremde Proteine eingesetzt wurden [44, 128, 131]. Die hohe Immunogenität von Streptavidin bei der Übertragung in den klinischen Gebrauch wird sogar als zentrales Hindernis angesehen [130, 132].

Weiterhin zeichnen sich beide Proteine durch eine extreme Bindung an Biotin aus. Diese hohe Affinität führt in vivo zu einer unmittelbaren Sättigung durch das körpereigene proteingebundene oder freie Biotin [101].

Um diesen Limitationen entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit ein neues biotinspezifisches AdapterCAR-System entwickelt.

4.2 Das AdCAR-System ist effektiv und kontrollierbar

Ein zentraler Kritikpunkt bisheriger CAR-Behandlungen ist die schwierige Kontrollierbarkeit des Systems.

In dieser Arbeit wurden fünf AdCAR-T Konstrukte, die sich in der Länge des extrazellulären Platzhalters (Spacers) unterscheiden, untersucht und verglichen. Eine hohe Expressionsrate der chimären Antigenrezeptoren wurde auf allen fünf Konstrukten bei allen Spendern nachgewiesen.

Das AdCAR-T IgG4 hinge only (XS) mit der kürzesten Spacerlänge zeigte sich als das Konstrukt mit der stärksten Effektorfunktion, gefolgt von den Konstrukten mit den ansteigend längeren Spacern CD8 (S) und IgG4 hinge-CH3 (M). Das verwendete biotinylierte Antikörper Format war dabei unabhängig von dieser Beobachtung. Dass der Abstand zwischen Tumor- und Effektorzelle für die Lysefunktion und Interaktion zwischen Effektor- und Targetzelle von Wichtigkeit ist, bestätigen die Untersuchungen früherer Studien [35]. Für die weiteren Untersuchungen wurde konsequenterweise das Konstrukt IgG4 hinge only (XS) verwendet.

Eine exzellente Lysefunktion konnte im Vergleich verschiedener E:T Verhältnisse nachgewiesen werden. Das in den Versuchsreihen sehr breite Spektrum reichte von 5:1 bis 0,15625:1. Selbst im kleinsten E:T Verhältnis war noch eine signifikante Tumorzelllyse zu verzeichnen.

Ebenfalls wurde in dieser Arbeit die Effizienz des neu entwickelten AdCAR-T Systems in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an den biotinylierten Antikörpern b-4G7SDIE und b-ch14.18 (Adaptermoleküle) getestet. Das Spektrum wurde breit gewählt und umfasste Konzentrationen von 10 pg/ml bis 10 µg/ml LLE-Adaptermolekül. Selbst die kleinste Konzentration führte zu einer sichtbaren signifikanten Lyse der Tumorzellen. Diese Beobachtung unterstreicht nicht nur die hohe Effizienz des AdCAR-T Systems. Die Titration der Adaptermoleküle erlaubt weiterhin einen „ON“-Switch, eine kontrollierte Aktivierung des Systems mit präziser Feinregulierung, was bisher nicht möglich war im Ansatz konventioneller CAR-Ts.

Weiterhin konnte die überlegene T-Zell-Aktivierung von IgG4 hinge only (XS) durch Nachweis des intrazellulären Zytokins TNF α bestätigt werden.

Um eine effiziente alternative Therapieform zu bieten, wurde die Effektorfunktion der AdCAR-Ts in Kombination mit den Adaptermolekülen mit der von konventionellen CAR-Ts verglichen. Das Ergebnis zeigte eine starke Lysefunktion des AdCAR-T Systems vergleichbar mit den direkten CAR-Ts. Dies macht das Adaptersystem zu einem Therapieansatz, der mehr Kontrolle und Sicherheit als der konventionelle CAR-Ansatz bietet, ohne dabei die Effizienz zu mindern.

4.3 Das AdCAR-System ist spezifisch und sicher

Die unkontrollierte Expansion der CAR-Ts mit massiver Ausschüttung von Zytokinen in Anwesenheit des Tumorantigens führt bisher zu lebensbedrohlichen körperlichen Zuständen im Rahmen der CAR-T Behandlung. Nicht nur die präzise Regulierung durch titrierte Zugabe der LLE-Adaptermoleküle trägt zur Sicherheit der Therapie bei, auch ein kontrolliertes Beenden der T-Zell Aktivität ist ein wichtiger Punkt, um schwere Nebenwirkungen zu unterbinden. Außerdem ist es von großer Bedeutung, dass das AdCAR-System einer hohen Spezifität unterliegt. Getestet wurde das System gegen CD19 und GD2 mit dem jeweiligen spezifischen LLE- Antikörper (b-4G7SDIE und b-ch14.18) im Vergleich zum ebenfalls spezifischen aber unbiotinylierten Antikörper (anti-CD19 4G7SDIE und anti-GD2 ch14.18) sowie dem biotinylierten Antikörper mit Spezifität für das jeweils andere irrelevante Tumorantigen. Die Ergebnisse zeigten eindrücklich, dass die Funktionalität des Adaptersystems hochspezifisch von dem korrekten Antikörper mit konjugiertem LLE abhängt. Weder der spezifische Antikörper ohne LLE noch der Antikörper irrelevanter Spezifität mit LLE konnten eine vergleichbare Aktivierung des Systems mit anschließender Tumorzelllyse bewirken.

Diese Ergebnisse bestätigen die Spezifität des Systems, dies ist sehr wichtig für die Patientensicherheit unter der Therapie. Im Falle schwerwiegender toxischer Nebenwirkungen, die möglicherweise auch nur temporär auftreten können, kann die Aktivität der AdCAR-Ts durch den Anwender kontrolliert aufgehoben werden, indem die Zugabe der LLE-Adaptermoleküle gestoppt wird, ohne die AdCAR-Ts

dabei irreversibel zu eliminieren. Die Aktivierung der CAR-Ts ist also nicht länger vom Tumorantigen allein abhängig, sondern der entscheidende Punkt ist die Anwesenheit des LLE-Adaptermoleküls. Die zentralen Anforderungen an eine neue CAR-Therapie, die Steuer- und Kontrollierbarkeit und damit die Patientensicherheit, sind somit erfüllt.

4.4 Das AdCAR-System ist universal und flexibel

Das Ziel ist, ein allgemeingültiges und universal anwendbares Konzept in der Therapie gegen ein breites Spektrum an hämatologisch-onkologischen Erkrankungen zu schaffen. Aus diesem Grund soll das AdCAR System eine Universalität im Sinne einer Anwendbarkeit gegen theoretisch alle Antigene aufweisen. Als Zielantigene wurden daher CD19 und GD2 ausgewählt. CD19 ist ein großes Transmembranprotein, das als Pan-B-Zellmarker in die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors (BCR) involviert ist [6]. Es wird auf B-phenotypischen leukämischen Blasten exprimiert. Folglich sind die meisten B-Zell Leukämien und Lymphome wie ALL, CLL, NHL und HL CD19 positiv. Dies macht das Protein zu einem attraktiven Ziel der CAR-Therapie [133].

Im Gegensatz dazu handelt es beim Tumorantigen GD2 um ein kleines Disialogangliosid neuroektodermalen Ursprungs [10]. Auf normalem Gewebe wird es auf Neuronen, Melanozyten und peripheren sensorischen Nervenfasern exprimiert. Typische Tumorentitäten mit GD2 Expression und somit potenzielle Ziele der CAR-Therapie sind das Neuroblastom, Sarkome, Melanome und andere solide Tumoren [6, 69]. Während beim Melanom eine große Menge GD2 und GD3 exprimiert wird, stellt GD2 beim Neuroblastom das Hauptgangliosid dar. Es unterstützt die Anhaftung an Proteine der Extrazellulärmatrix und trägt somit zur Metastasierung bei [134]. Weiterhin wirken Ganglioside immunmodulierend durch Modifizierung von APCs und Lymphozyten und begünstigen das Tumorwachstum [135]. Damit stellt auch GD2 ein erfolgsversprechendes Zielantigen in der Immuntherapie dar.

Die Ergebnisse der funktionellen Assays gegen die beiden Oberflächenmarker ergaben keinen Unterschied bezüglich der Effizienz der Zytotoxizität. Diese Beobachtung lässt auf einen breiten Anwendungsbereich schließen.

Nicht nur Versuche gegen CD19 und GD2 sind der aktuelle Stand der Arbeitsgruppe. Die Hypothese ist, dass prinzipiell alle Antigene in diesem Setting von den AdCAR-Ts erkannt und gebunden werden können. Um die Universalität der AdCAR Technologie zu überprüfen, wurde das Spektrum um 10 weitere, myeloisch-assoziierte Antigene erweitert. Untersucht wurden biotinylierte Antikörper gegen die Tumorantigene CD15, CD32, CD33, CD38, CD117, CD123, CD133, CD135, CD276, CD371. Bei ausreichender Expression der Antigene konnte eine signifikante, spezifische Lyse der Tumorzellen durch die AdCAR-Ts in Kombination mit allen untersuchten Antikörpern nachgewiesen werden. Fortführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass eine signifikante Effektorfunktion der AdCAR-Ts nicht nur in Anwesenheit von biotinylierten Antikörpern in ihrer gesamten Länge, sondern auch mit Fab- und F(ab')₂-Fragmenten erreicht wurde [101].

Prinzipiell kann das LLE mühelos auf eine GMP-konforme Weise an jede Proteinstruktur konjugiert werden. Der Einsatz von bereits existierenden FDA (food and drug administration) - geprüften monoklonalen Antikörpern und Antikörperfragmenten beispielsweise gewähren damit eine hohe Patientensicherheit. Jedoch können darüber hinaus nicht nur Antikörper (-fragmente) als Adaptermoleküle verwendet werden. Spektrum erweiternd ist der Einsatz von polyfunktionalen Adaptern, die durch Rekrutierung weiterer Effektorzellen die Effizienz zusätzlich steigern können [101]. Beispielsweise wird zur Reduktion einer minimalen Resterkrankung bei therapierefraktärer oder rezidivierender B-ALL der Fc-optimierte CD19 Antikörper 4G7SDIE angewandt, der in der Lage ist, weitere immunologische Effektorzellen zu rekrutieren [136]. Ebenfalls aktivieren Zytokine oder bispezifische Antikörper die Effektorzellen des Immunsystems und sorgen somit für eine selektive Rückbildung des Tumors [137].

Durch präzise Selektion von LLE-Adaptermolekülen können die AdCAR-Ts individuell an Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen verabreicht werden.

Eine bedeutende Nebenwirkung der konventionellen CAR-Therapien stellt der Verlust, die Modifikation oder Herabregulation des für die Therapie entscheidenden Antigens dar. Diese wird durch die lange Persistenz der CAR-T-Zellen und Selektionsdruck gegen das Antigen begünstigt [88, 89]. Um dieser Limitation vorzubeugen untersuchte die Arbeitsgruppe die Funktion des AdCAR-T Systems in Hinblick auf die Lyse und Selektion von Tumorzellen mit Varianten von Antigenverlust für CD19, CD20 und CD19/CD20. Dazu wurden diese Formen der non-Hodgkin Lymphom (NHL) - Zelllinie JeKo-1 durch CRISPR/Cas9 Knockout generiert. JeKo-1 zeichnet sich durch eine hohe und vergleichbare Expression von CD19 und CD20 aus. Knockoutvarianten wurden zur Untersuchung mit Wildtypformen vermischt. Die Untersuchung ergab eine hochselektive Elimination der jeweils antigenpositiven Tumorzellen bei singulärem Angriff unter Verwendung der AdCAR-Ts kombiniert mit entweder biotinyliertem CD19- oder CD20 Antikörper. Die antigen-negativen JeKo-1 Varianten blieben unangetastet. Das duale Targeting führte darüber hinaus lediglich zu einer Selektion der doppelt-negativen Tumorzellen, während alle anderen Varianten signifikant lysiert wurden (Funktion eines „OR“-gates). Weiterhin konnten die doppelt-negativen Tumorzellen anschließend durch Einsatz eines dritten biotinylierten ROR-1 Antikörpers vermindert werden [101]. Zusammenfassend lässt sich also darstellen, dass multiples Targeting der AdCAR-Ts möglich ist und der Evasion durch Antigenverlust vorbeugen kann. Weiterhin können im Verlauf der Therapie bei Bedarf weitere Antigene hinzugefügt oder getauscht werden. Die Gesamtheit dieser Beobachtungen lässt auf eine flexible universelle Anwendungsmöglichkeit der neuen AdCAR Technologie schließen.

4.5 Das AdCAR-System *in vivo*

Eine große Hürde in der tag-basierten Therapie ist das Herauskristallisieren eines Markers, der keine Immunogenität aufweist und nicht mit anderen endogenen Proteinen im menschlichen Körper interferiert. Die Verwendung des Neoepitopes LLE führt zu einer hochspezifischen Bindung der AdCAR-Ts am Adaptermolekül ohne Verwendung von Biotinantagonisten, die immunogene Wirkung aufweisen und die Therapie limitieren können. Dennoch ist Biotin Bestandteil des LLEs und eine Interferenz mit dem endogenen Vitamin wurde untersucht. Es ist in einer Konzentration von ca. 0,4 – 1,2µg/l, vor allem in freier Form, im Blut zu finden [100]. Dazu wurden den Versuchsreihen ansteigend supraphysiologische Konzentrationen an freiem Biotin zugegeben, die die humane Konzentration um bis zu 10.000x übersteigen. Trotz diesen extrem hohen Biotinwerten wurde die Effektorfunktion der AdCAR-Ts in Kombination mit den biotinylierten Adaptermolekülen nicht gemindert. Eine gleichwertig effiziente Zytotoxizität in Anwesenheit unterschiedlicher Biotinkonzentrationen zum Vergleich ohne Biotinzugabe konnte bestätigt werden. Ebenfalls wurden die Versuche mit 50% Humanserum durchgeführt, auch hier war keine verminderte Effektorfunktion nachweisbar. Diese wichtige Beobachtung führt zum Schluss, dass keine Interferenz mit dem humanen freien oder proteingebundenen Biotin im Körper zu erwarten ist und unterstreicht die Spezifität des Adaptersystems zum LLE-Neoepitop.

Weiterführend untersuchte die Arbeitsgruppe nach der *in vitro* Testung das AdCAR System *in vivo* unter Verwendung des NALM6 xenograft NSG Mausmodells. Die Injektion des biotinylierten CD19 Antikörpers (Fc-optimierter CD19 Antikörper 4G7SDIE) führte unmittelbar zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast in den Mäusen, vermutlich ausgelöst durch Fc-medierte antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADPC). Um die Funktion der AdCAR-Ts jedoch exklusiv und ohne unspezifische Aktivität beurteilen zu können, wurden für die Experimente ein gleichwertiger rekombinanter Fc-optimierter Antikörper (LLE-CD19 REA675 Antikörper) sowie zytokinfreie kryokonservierte AdCAR-Ts (cold AdCAR-Ts)

verwendet. Diese Kombination führte im Mausmodell zu einer signifikanten Tumorzelllyse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und den AdCAR-Ts kombiniert mit unbiotinyliertem CD19 Antikörper (REA675 ohne LLE) (**Abb. 4.1**) [101].

Diese Ergebnisse demonstrieren einen spezifischen, signifikanten Antitumoreffekt der AdCAR-Ts in Kombination mit dem biotinyliertem CD19 REA675 Antikörper *in vivo*.

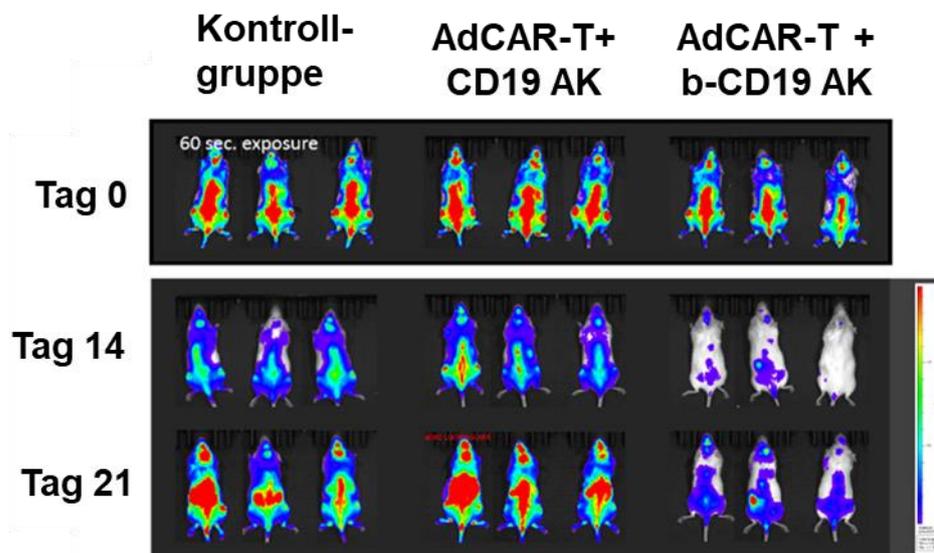


Abb. 4.1 Die neue AdCAR-T Technologie *in vivo*

Das Schaubild zeigt die Tumormasse nach Injektion von CD19⁺ NALM6 Tumorzellen im Mausmodell. Die *in vivo* Bildgebung erfolgte an Tag 0, 14 und 21. Die Kontrollgruppe entspricht unbehandelten Versuchstieren. Die „AdCAR-T + CD19 AK“ Gruppe erhielt lediglich AdCAR-T Zellen und zweimalig pro Woche unbiotinylierten CD19 AK. Die Behandlungsgruppe „AdCAR-T + b-CD19 AK“ erhielt AdCAR-T Zellen und zweimalig pro Woche biotinylierten CD19 AK (b-CD19 REA675 Antikörper) [101].

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe präsentieren ein differenziertes neues CAR-System unter Verwendung biotinspezifischer Adaptermoleküle.

Die Zusammenschau an Ergebnissen macht deutlich, dass die Hindernisse der bisherigen Behandlungsansätze konventioneller CAR-T-Zellen überwunden werden können. Es konnten Methoden zur Kontrollierbarkeit durch feinregulierte (De-) Aktivierung und zur universellen sowie flexiblen Anwendung des Systems gezeigt werden, die durch maximale Kontrolle der T-Zell-Funktion zu einer hohen Patientensicherheit unter der hochspezifischen Therapie führen ohne dabei die Effizienz der CAR-T-Zell Therapie zu mindern. Das Konzept ist auf eine GMP-konforme Weise leicht in den klinischen Gebrauch zu übertragen, autoimmune Reaktionen sind nicht zu erwarten.

Patienten können somit je nach Grunderkrankung therapiert werden. Dabei kann die Behandlung höchst individuell und je nach Bedarf auf den einzelnen Patienten angepasst, abgestimmt und flexibel verändert werden. Dieses Adaptersystem unter Verwendung biotinspezifischer chimärer Antigenrezeptoren stellt eine sehr vielversprechende Weiterentwicklung bisheriger Behandlungskonzepte dar und weckt bedeutende Erwartungen an die zukünftige Krebstherapie.

5 Zusammenfassung

Leukämien machen den Großteil der Malignome im Kindesalter, gefolgt von den ZNS-Tumoren, aus. Durch herausragende Therapieerfolge in den Zulassungsstudien bei refraktären B-Zell assoziierten Malignomen erfolgte die Zulassung zweier CD19-CAR Produkte (Kymriah® und Yescarta®). Hierdurch ist die CAR-Therapie zu einer Standardtherapie bei refraktären Leukämien und Lymphomen aufgestiegen.

Um die CAR-Therapie auch auf andere Indikationen zu erweitern, ist ein flexibler Einsatz und eine strenge Kontrolle des Systems durch den behandelnden Arzt eine Grundvoraussetzung. Dies gilt vor allen Dingen, um die antitumorale Aktivität zu steigern als auch um lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie das Zytokinfreisetzungssyndrom, mögliche „On-Target off-Tumor Toxizität“ oder schwere neurotoxische Schädigungen besser zu kontrollieren.

Bei konventionellen CAR Technologien erfolgt die Erkennung oberflächen-exprimierter Antigene. Bei Adapter CAR Technologien hingegen erfolgt die Antigenerkennung durch ein Adaptermolekül, genauer eine Markierung auf dem Adaptermolekül. AdCAR-Ts erkennen Biotin im Kontext einer spezifischen Linkerstruktur, welche chemisch oder enzymatisch an beliebige Adaptermoleküle konjugiert werden kann. Das System stellt eine Weiterentwicklung konventioneller CAR-T Technologie mit erhöhter Steuer- und Kontrollierbarkeit, Flexibilität und Universalität dar.

In dieser Arbeit wurde die Adapter CAR Technologie (AdCAR-T) in einem Zweitgenerationskonstrukt (co-stimulierende Signaldomäne 4-1BB) evaluiert und charakterisiert. Diese bietet durch das Split-CAR-Design die Möglichkeit der feinen Regulation des Systems durch den behandelnden Arzt, in dem in Abhängigkeit der Pharmakokinetik und -dynamik die Adaptermoleküle ein- bzw. ausdosiert werden. Hierdurch wird eine, im Gegensatz zur konventionellen CAR-T-Zell Therapie, erhöhte Steuerbarkeit erreicht und somit werden die wesentlichen Limitationen direkter CAR Technologien adressiert. Die multidimensionale Austestung ergab interessanterweise die beste CAR-Aktivität für das AdCAR-Konstrukt mit dem kürzesten Spacer unabhängig von der

Tumorzelllinie (NALM6 und LS) und dem Zielantigen CD19 und GD2. Die antitumorale Aktivität von AdCAR-Ts war vergleichbar mit der Aktivität konventioneller CAR-T Zellen.

Durch titrierte Zugabe der biotinylierten Antikörper konnte die Aktivität des AdCAR-Systems fein justiert werden. Es wurde eine hohe Spezifität des AdCAR Systems nachgewiesen, d.h. eine Aktivierung der AdCAR-Ts erfolgte lediglich in der Kondition AdCAR-T plus biotinylierte Adaptermoleküle korrekter Spezifität plus Tumorzelllinie mit korrespondierendem Zielantigen (z.B. b-CD19 Antikörper und CD19 Antigen auf Tumorzellen). Nicht biotinylierte Adaptermoleküle führten nicht zu einer Vermittlung einer Effektorfunktion durch AdCAR-Ts. Darüber hinaus wurden AdCAR-Ts weder durch freies Biotin, selbst in suprphysiologischen Konzentrationen, noch in Humanserum gehemmt. Es ist daher nicht von einer Interferenz mit Humanserum oder endogenem freiem oder proteingebundenem Biotin im menschlichen Körper auszugehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die AdCAR-Technologie die wesentlichen Limitationen konventioneller CAR-T-Zell Strategien adressiert und somit zu einer erhöhten Sicherheit, Steuer- und Kontrollierbarkeit, Flexibilität und Universalität in der CAR-Therapie beitragen könnte. Mittelfristiges Ziel ist die klinische Translation der AdCAR-Technologie.

6 Referenzen

1. Institut, R.K., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017.
2. German Childhood Cancer Registry GCCR, P.D.R.P.K., *Annual Report 2017*. 2018.
3. Steliarova-Foucher, E., et al., *Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991-2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study*. *Lancet Oncol*, 2018.
4. Woods, W.G., et al., *Screening of infants and mortality due to neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(14): p. 1041-6.
5. Maria Yiallourous, P.D.m.F.B., *Neuroblastom*. 2012.
6. Gross, G. and Z. Eshhar, *Therapeutic Potential of T Cell Chimeric Antigen Receptors (CARs) in Cancer Treatment: Counteracting Off-Tumor Toxicities for Safe CAR T Cell Therapy*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016. **56**: p. 59-83.
7. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(14): p. 1324-34.
8. Frost, J.D., et al., *A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group*. *Cancer*, 1997. **80**(2): p. 317-33.
9. Simon, T., et al., *Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(17): p. 3549-57.
10. Pule, M.A., et al., *Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma*. *Nat Med*, 2008. **14**(11): p. 1264-70.
11. Yiallourous, D.B.M., *Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) - Kurzinformation*. 2014.
12. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
13. Bauters, T. and Y. Benoit, *[Acute lymphoblastic leukemia in children: history of drug therapy management]*. *J Pharm Belg*, 2014(4): p. 20-3.
14. Bhojwani, D. and C.H. Pui, *Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Lancet Oncol*, 2013. **14**(6): p. e205-17.
15. Smith, M.A., et al., *Declining childhood and adolescent cancer mortality*. *Cancer*, 2014. **120**(16): p. 2497-506.
16. Mackall, C.L., M.S. Merchant, and T.J. Fry, *Immune-based therapies for childhood cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(12): p. 693-703.
17. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(8): p. 711-23.
18. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 450-61.
19. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
20. Veillette, A. and J. Chen, *SIRPα-CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy*. *Trends Immunol*, 2018. **39**(3): p. 173-184.
21. Perez Horta, Z., et al., *Human and murine IL2 receptors differentially respond to the human-IL2 component of immunocytokines*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(6): p. e1238538.
22. Topp, M.S., et al., *Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic*

- leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival.* J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. 2493-8.
23. Schlegel, P., et al., *Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab.* Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1212-9.
 24. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer.* N Engl J Med, 2010. **363**(5): p. 411-22.
 25. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
 26. Hong, J.J., et al., *Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(19): p. 4892-8.
 27. Eberlein, T.J., M. Rosenstein, and S.A. Rosenberg, *Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2.* J Exp Med, 1982. **156**(2): p. 385-97.
 28. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.* Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
 29. Leen, A.M., et al., *Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 2013. **121**(26): p. 5113-23.
 30. Icheva, V., et al., *Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation.* J Clin Oncol, 2013. **31**(1): p. 39-48.
 31. Kessels, H.W., et al., *Immunotherapy through TCR gene transfer.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 957-61.
 32. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10024-8.
 33. Eshhar, Z., et al., *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 720-4.
 34. Gorman, J., et al., *Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation.* Cell, 1990. **60**(6): p. 929-39.
 35. Gill, S. and C.H. June, *Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies.* Immunol Rev, 2015. **263**(1): p. 68-89.
 36. Milone, M.C., et al., *Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo.* Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1453-64.
 37. Song, D.G., et al., *In vivo persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB).* Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4617-27.
 38. Hombach, A.A. and H. Abken, *Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling.* Int J Cancer, 2011. **129**(12): p. 2935-44.
 39. Guedan, S., et al., *ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells.* Blood, 2014. **124**(7): p. 1070-80.
 40. Maher, J., et al., *Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor.* Nat Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 70-5.

41. Loskog, A., et al., *Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells*. *Leukemia*, 2006. **20**(10): p. 1819-28.
42. Zhong, X.S., et al., *Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication*. *Mol Ther*, 2010. **18**(2): p. 413-20.
43. Till, B.G., et al., *CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results*. *Blood*, 2012. **119**(17): p. 3940-50.
44. Kershaw, M.H., et al., *A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6106-15.
45. Haso, W., et al., *Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(7): p. 1165-74.
46. James, S.E., et al., *Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane*. *J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 7028-38.
47. Alabanza, L., et al., *Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains*. *Mol Ther*, 2017. **25**(11): p. 2452-2465.
48. Guest, R.D., et al., *The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens*. *J Immunother*, 2005. **28**(3): p. 203-11.
49. Hudecek, M., et al., *Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(12): p. 3153-64.
50. Hudecek, M., et al., *The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(2): p. 125-35.
51. Jonnalagadda, M., et al., *Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy*. *Mol Ther*, 2015. **23**(4): p. 757-68.
52. Taylor, M.J., et al., *A DNA-Based T Cell Receptor Reveals a Role for Receptor Clustering in Ligand Discrimination*. *Cell*, 2017. **169**(1): p. 108-119.e20.
53. Finney, H.M., A.N. Akbar, and A.D. Lawson, *Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain*. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 104-13.
54. Bridgeman, J.S., et al., *CD3zeta-based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **175**(2): p. 258-67.
55. Maude, S.L., et al., *Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(16): p. 1507-17.
56. Lee, D.W., et al., *T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial*. *Lancet*, 2015. **385**(9967): p. 517-528.
57. Turtle, C.J., et al., *CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(6): p. 2123-38.
58. Park, J.H., et al., *Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(5): p. 449-459.
59. Fry, T.J., et al., *CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy*. *Nat Med*, 2018. **24**(1): p. 20-28.

60. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
61. Turtle, C.J., et al., *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, 2016. **8**(355): p. 355ra116.
62. Kochenderfer, J.N., et al., *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*. J Clin Oncol, 2015. **33**(6): p. 540-9.
63. Chu, J., et al., *CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 917-27.
64. Savoldo, B., et al., *Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2620-30.
65. Hombach, A., et al., *Characterization of a chimeric T-cell receptor with specificity for the Hodgkin's lymphoma-associated CD30 antigen*. J Immunother, 1999. **22**(6): p. 473-80.
66. Pizzitola, I., et al., *Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo*. Leukemia, 2014. **28**(8): p. 1596-605.
67. Handgretinger, R., et al., *A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma*. Eur J Cancer, 1995. **31a**(2): p. 261-7.
68. Simon, T., et al., *Long term outcome of high-risk neuroblastoma patients after immunotherapy with antibody ch14.18 or oral metronomic chemotherapy*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 21.
69. Cheung, N.K., et al., *Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma*. J Clin Oncol, 1987. **5**(9): p. 1430-40.
70. Kushner, B.H., K. Kramer, and N.K. Cheung, *Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(22): p. 4189-94.
71. Handgretinger, R., et al., *A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a*. Cancer Immunol Immunother, 1992. **35**(3): p. 199-204.
72. Murray, J.L., et al., *Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors*. J Clin Oncol, 1994. **12**(1): p. 184-93.
73. Wu, C.Y., et al., *Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor*. Science, 2015. **350**(6258): p. aab4077.
74. Fitzgerald, J.C., et al., *Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia*. Crit Care Med, 2017. **45**(2): p. e124-e131.
75. Lee, D.W., et al., *Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome*. Blood, 2014. **124**(2): p. 188-95.
76. Davila, M.L. and R.J. Brentjens, *CD19-Targeted CAR T cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Clin Adv Hematol Oncol, 2016. **14**(10): p. 802-808.
77. Davila, M.L., et al., *Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia*. Sci Transl Med, 2014. **6**(224): p. 224ra25.

78. Maude, S.L., et al., *CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 4017-23.
79. Kang, S., T. Tanaka, and T. Kishimoto, *Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody*. *Int Immunol*, 2015. **27**(1): p. 21-9.
80. Labanieh, L., R.G. Majzner, and C.L. Mackall, *Programming CAR-T cells to kill cancer*. *Nature Biomedical Engineering*, 2018. **2**(6): p. 377-391.
81. Roybal, K.T., et al., *Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits*. *Cell*, 2016. **164**(4): p. 770-9.
82. Scheuermann, R.H. and E. Racila, *CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy*. *Leuk Lymphoma*, 1995. **18**(5-6): p. 385-97.
83. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(95): p. 95ra73.
84. Kochenderfer, J.N., et al., *Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19*. *Blood*, 2010. **116**(20): p. 4099-102.
85. Kochenderfer, J.N., et al., *B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells*. *Blood*, 2012. **119**(12): p. 2709-20.
86. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 16-25.
87. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
88. Ruella, M., et al., *Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(10): p. 3814-3826.
89. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
90. Sotillo, E., et al., *Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(12): p. 1282-95.
91. Jacoby, E., et al., *CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12320.
92. Fedorov, V.D., M. Themeli, and M. Sadelain, *PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(215): p. 215ra172.
93. Sato, T., et al., *Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy*. *Mol Ther*, 2007. **15**(5): p. 962-70.
94. Di Stasi, A., et al., *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(18): p. 1673-83.
95. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
96. Bargou, R., et al., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 974-7.
97. Grada, Z., et al., *TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e105.
98. Robert Koch Institut, D.G.M., *Was essen wir heute? Ernährungsverhalten in Deutschland*. 2001.
99. Mock, D.M. and M.I. Malik, *Distribution of biotin in human plasma: most of the biotin is not bound to protein*. *Am J Clin Nutr*, 1992. **56**(2): p. 427-32.

100. Hesecker, P.D.H., *Biotin: Vorkommen, Funktionen, Physiologie, Referenzwerte und Versorgung in Deutschland*. 2009.
101. **Christian Martin Seitz MD1, J.M.P., Jana Hau1, Selina Reiter1, Clara Illi1, Verena Kieble1, Fabian Engert M.Sc.2, Britta Drees M.Sc.2, Giulia Bender1, Ann-Christin Krahl PhD1, Philipp Knopf MSc3, Sarah Schroeder1, Stefan Grote MSc1, Nikolas Paulsen1, Alexander Rokhvarguer1, Daniel Atar MSc1, Armin Rabsteyn PhD1, Sabine Schleicher PhD1, Karin Schilbach PhD1, Manfred Kneilling MD3, Bernd Pichler PhD3, Dominik Lock PhD2, Bettina Kotter M.Sc.2, Sandra Dapa M.Sc.2, Stefan Miltenyi2, Andrew Kaiser PhD2, Peter Lang MD1, Rupert Handgretinger MD1 and Patrick Schlegel MD1* *Adapter CAR T-cell (AdCAR-T) technology for precisely controllable multiplex targeting*. Under Revision in *Cancer Discovery*, 2020.**
102. GmbH, L.I.D.-D.S.v.M.u.Z., *Nalm6*, ACC128.
103. GmbH, L.-I.-D.-D.S.v.M.u.Z., *Cell line 293 ACC305*.
104. GmbH, L.-I.D.-D.S.v.M.u.Z., *LS ACC675*.
105. Boyum, A., *Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media*. *Methods Enzymol*, 1984. **108**: p. 88-102.
106. Scientist, T. *Going Their Separate Ways: A Profile of Products for Cell Separation*. 1999.
107. Biotec, M., *CD4 MicroBeads human Order no. 130-045-101*. p. 4.
108. Biotec, M., *CD8 MicroBeads human Order no. 130-045-201*. p. 4.
109. Biotec, M., *MACSelect Transfected Cell Selection User manual*.
110. Biotec, M., *T Cell Activation/Expansion Kit human Order no 130-091-441*.
111. Wikiwand. *Viraler Vektor*. Available from: https://www.wikiwand.com/de/Viraler_Vektor
112. Bronstein, I., et al., *Chemiluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assays*. *Analytical Biochemistry*, 1994. **219**(2): p. 169-181.
113. Scientific, T.; *Firefly Luciferase Assays & Vectors* <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/reporter-gene-assays/luciferase-assays/firefly-luciferase-assays-vectors.html>].
114. Ke, N., et al., *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability*. *Methods Mol Biol*, 2011. **740**: p. 33-43.
115. Kho, D., et al., *Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time*. *Biosensors (Basel)*, 2015. **5**(2): p. 199-222.
116. Herzenberg, L.A., et al., *The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford*. *Clinical Chemistry*, 2002. **48**(10): p. 1819-1827.
117. Bonner, W.A., et al., *Fluorescence activated cell sorting*. *Rev Sci Instrum*, 1972. **43**(3): p. 404-9.
118. Hombach, A., A.A. Hombach, and H. Abken, *Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response*. *Gene Ther*, 2010. **17**(10): p. 1206-13.
119. Barrett, D.M., D.T. Teachey, and S.A. Grupp, *Toxicity management for patients receiving novel T-cell engaging therapies*. *Curr Opin Pediatr*, 2014. **26**(1): p. 43-9.
120. Cho, J.H., J.J. Collins, and W.W. Wong, *Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses*. *Cell*, 2018. **173**(6): p. 1426-1438.e11.
121. Straathof, K.C., et al., *An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4247-54.

122. Rodgers, D.T., et al., *Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(4): p. E459-68.
123. Kudo, K., et al., *T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing*. Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 93-103.
124. Akard, L.P., et al., *ACTR087, Autologous T Lymphocytes Expressing Antibody Coupled T-Cell Receptors (ACTR), Induces Complete Responses in Patients with Relapsed or Refractory CD20-Positive B-Cell Lymphoma, in Combination with Rituximab*. Blood, 2017. **130**(Suppl 1): p. 580-580.
125. Tamada, K., et al., *Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(23): p. 6436-45.
126. Kim, M.S., et al., *Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules*. J Am Chem Soc, 2015. **137**(8): p. 2832-5.
127. Ma, J.S., et al., *Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(4): p. E450-8.
128. Urbanska, K., et al., *A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor*. Cancer Res, 2012. **72**(7): p. 1844-52.
129. Lohmueller, J.J., et al., *mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting*. Oncoimmunology, 2017. **7**(1): p. e1368604.
130. Yumura, K., et al., *Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin*. Protein Sci, 2013. **22**(2): p. 213-21.
131. Lamers, C.H., et al., *Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells*. Blood, 2011. **117**(1): p. 72-82.
132. Weir, C., et al., *Streptavidin: a novel immunostimulant for the selection and delivery of autologous and syngeneic tumor vaccines*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(5): p. 469-79.
133. Davila, M.L., et al., *How do CARs work?: Early insights from recent clinical studies targeting CD19*. Oncoimmunology, 2012. **1**(9): p. 1577-1583.
134. Cheresh, D.A., et al., *Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins*. J Cell Biol, 1986. **102**(3): p. 688-96.
135. Potapenko, M., G.V. Shurin, and J. de Leon, *Gangliosides as immunomodulators*. Adv Exp Med Biol, 2007. **601**: p. 195-203.
136. Seidel, U.J., et al., *Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody*. Mol Ther, 2016. **24**(9): p. 1634-43.
137. Kiefer, J.D. and D. Neri, *Immunocytokines and bispecific antibodies: two complementary strategies for the selective activation of immune cells at the tumor site*. Immunol Rev, 2016. **270**(1): p. 178-92.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Diagnosespektrum der Krebsarten bei Kindern (Daten von 2004-2015)	2
Abb. 1.2 Spektrum monoklonaler Antikörper Antitumor-Effekte auszulösen	6
Abb. 1.3 Aufbau CARs erster bis dritter Generation	8
Abb. 1.4 Funktionsweise der AdCAR Technologie	17
Abb. 1.5 Die AdCAR Technologie im Vergleich mit konventionellen CAR-Ts	18
Abb. 2.1 Arbeitsplan	26
Abb. 2.2 Prinzip der magnetischen Zellseparation	29
Abb. 2.3 Transfektion und Transduktion mit Lentiviren	34
Abb. 2.4 Aufbau der AdCAR-T der zweiten Generation	35
Abb. 2.5 Adaptermolekül mit Linker/Label Epitop (LLE)	36
Abb. 2.6 Prinzip der Luciferase-Reaktion	38
Abb. 2.7 Messprinzip xCELLigence	41
Abb. 3.1 CD4- und CD8-Verteilung und Expressionsfärbung nach LNGFR der AdCAR-T Konstrukte (am Beispiel Spender 1 gezeigt)	47
Abb. 3.2 Expression chimärer Antigenrezeptoren	48
Abb. 3.3 Konstruktvergleich: Spezifische Lyse von GD2 ⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch die fünf AdCAR-T Konstrukte	53
Abb. 3.4 Konstruktvergleich: Spezifische Lyse von CD19 ⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch die fünf AdCAR-T Konstrukte	54
Abb. 3.5 Konstruktvergleich: Akkumulation von TNF α nach Aktivierung durch die fünf AdCAR-T Konstrukte	55
Abb. 3.6 E:T Abhängigkeit: Spezifische Lyse von GD2 ⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)	59
Abb. 3.7 E:T Abhängigkeit: Spezifische Lyse von CD19 ⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)	60
Abb. 3.8 Vergleich mit anti-CD19 CAR-T: Spezifische Lyse CD19 ⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)	61
Abb. 3.9 Antikörpertitration: Spezifische Lyse von GD2 ⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)	64

Abb. 3.10 Antikörpertitration: Spezifische Lyse von CD19 ⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS)	65
Abb. 3.11 Spezifität: Lyse von GD2 ⁺ Neuroblastomzellen (LS) durch AdCAR-T (XS).....	68
Abb. 3.12 Spezifität: Lyse von CD19 ⁺ B-ALL Zellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS).....	69
Abb. 3.13 Freies Biotin: Spezifische Lyse von GD2 ⁺ Tumorzellen (LS) durch AdCAR-T (XS)	72
Abb. 3.14 Freies Biotin und Humanserum: Spezifische Lyse CD19 ⁺ Tumorzellen (Nalm6) durch AdCAR-T (XS).....	73
Abb. 4.1 Die neue AdCAR-T Technologie <i>in vivo</i>	85

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde 1 – Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie – unter Betreuung von Prof. Peter Lang, Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel in Zusammenarbeit mit Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach.

Das lentivirale Transferplasmid *Luciferase mcherry* wurde freundlicherweise von Frau Prof. Irmela Jeremias, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt. Unterstützt wurde ich durch Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel bei der Herstellung der CAR-T-Zellen.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung von Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel eigenständig von mir vorbereitet, durchgeführt und ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse der Dissertation habe ich ohne Ergänzung durch andere Labormitglieder vorgenommen.

Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel haben die Experimente gemeinsam mit mir geplant, Ergebnisse mit mir besprochen und das Manuskript korrigiert.

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

Reutlingen, den 10.03.2021

Jana Mi-Young Hau

9 Danksagung

Die Erstellung dieser Dissertation war meine persönlich bisher größte Herausforderung. Ich danke Prof. Lang und der gesamten Arbeitsgruppe für ihre großartige Unterstützung. Zu Beginn vor allem Desirée Syring, Alexander Jöchner und Maximilian Wiedenmann, die mir maßgeblich geholfen haben, mich in die Labortätigkeiten einzuarbeiten. Weiterhin gelten Renu Murugesan, Sylvia Klein, Anne Schilling, Annika Horrer, Ann-Christin Krahl, Armin Rabsteyn und allen anderen Kollegen, auch des Stammzelllabors, mein herzlichster Dank für die geduldige Unterstützung, jegliche Hilfestellungen und schöne Zeit im Labor. Besonders hervorheben und bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern Dr. Christian Seitz und Dr. Patrick Schlegel. Ohne euer unermüdliches Engagement und die tatkräftige Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ihr habt oft mehr getan, als ihr hättet tun müssen. Ich freue mich sehr, dass ihr mich in dieses innovative, spannende Projekt integriert, mein Interesse an der Hämatologie und Onkologie geweckt und damit maßgeblich meinen Lebensweg geprägt habt.

Ich möchte weiterhin meinen Freunden und meiner Familie danken. Vor allem meinen Eltern, Juli und Frauke und Sina, die mir motivierend und unterstützend in entscheidenden Momenten zur Seite standen. Ohne meine Eltern wäre mein Weg so nicht möglich gewesen. Ich konnte ihn nach meinen eigenen Vorstellungen gehen ohne finanzielle Sorgen und mit Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen konnte.

Herzlichen Dank an Judith und Martin Schick, die mir die Türen zu diesem Weg geöffnet haben.

Derjenige, der am meisten mit mir aushalten musste, ist mein lieber Freund Jonas. Die Zeit der Erstellung unserer Dissertationen hat sich jahrelang überschritten. Ich weiß nicht, wer von uns schlimmer war. Aber ich weiß, dass wir uns unermüdlich motiviert und gegenseitig viel Verständnis und Geduld entgegengebracht haben und damit haben wir beide letztendlich unser Ziel erreicht.