

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

**Präklinische Evaluation von Adapter CAR-T-Zellen
(AdCARs) zur Behandlung der akuten myeloischen
Leukämie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bender, Giulia
2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Tag der Disputation: 17.05.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Akute myeloische Leukämie im Kindesalter	12
1.1.1	Epidemiologie und Prognose der akuten myeloischen Leukämie	12
1.1.2	Aktuelle Therapie der akuten myeloischen Leukämie im Kindesalter	15
1.1.3	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	18
1.2	Aufbau von CAR-T-Zellen	18
1.2.1	Das Prinzip der CAR-T-Zell Technologie	18
1.2.2	Therapie mit CAR-T-Zellen	20
1.2.3	Adapter-CAR-T-Zellen als neues Therapiekonzept.....	21
1.2.4	Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit CAR-T-Zellen	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Ausrüstung	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial, Glasware und Plastikware	26
2.1.3	Stammlösungen.....	27
2.1.4	Puffer, Medien, Reagenzien	28
2.1.5	Antikörper, Magnetische Partikel, Zytokine	29
2.1.6	Computerprogramme.....	30
2.1.7	Zentrifugenprogramme	31
2.2	Zellmaterial und AML-Zelllinien	32
2.2.1	AML Zelllinien	33
2.3	Kultivierung der AML-Tumorzelllinien	33
2.4	Akquise von Patientenblutproben.....	33
2.5	Transduktion der mCherry-Luciferase in AML Zelllinien	34

2.6	Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	34
2.7	Durchflusszytometrische Zellsortierung der mCherry-Luciferase positiven Zellen	38
2.8	Luciferase-basierte Zytotoxizitätstests mit humanen AML Zelllinien ...	39
2.9	Herstellung der Adapter CAR-T-Zellen.....	41
2.9.1	Dichtegradientenzentrifugation der peripheren Vollblutproben von gesunden Probanden.....	42
2.9.2	MACS mit CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Beads zur Gewinnung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	43
2.9.3	HEK293T – Zellen für die Manufaktur der Lentiviren	44
2.9.4	Prinzip der Lentivirenherstellung und Ernte der Viren	44
2.9.5	Transduktion und Expression des Adapter CAR-T-Zellen Systems in T-Zellen mittels Lentiviren	45
2.9.6	MACS mit LNGFR-Beads zur Gewinnung der LNGFR positiven Adapter CAR-T-Zellen.....	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Charakterisierung des CAR-T-Zell Produkts.....	48
3.2	Auswahl der AML Zelllinien für die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstest	51
3.2.1	Herstellung der Luciferase exprimierenden Tumorzelllinien	51
3.2.2	Auswahl der Antigene als mögliche Zielstrukturen des Adaptersystems	52
3.2.3	Primäre und sekundäre FACS Analyse der Antigen-Expression auf humanen AML-Zelllinien	52
3.3	Normalisierte Lyse der AML-Blasten verschiedener AML-Zelllinien mittels Adapter CAR-T-Zellen.....	53
3.3.1	Auswahl AML-Zelllinien für die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests anhand des günstigsten E:T Verhältnisses	53

3.3.2	Adapter CAR-T-Zellen Expansion basierend auf der LNGFR Positivität	58
3.4	Vergleich der AML-Zelllinien	73
3.4.1	Vergleich der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Antigenexpression der fünf AML-Zelllinien	73
4	Diskussion und Hypothese.....	76
4.1	Hypothese und Arbeitsplan	76
4.2	Bedarf neuer Therapieansätze für die AML.....	76
4.3	CAR-T-Zell Therapie	77
4.3.1	Bisheriger Einsatz der CAR-T-Zell Therapie	77
4.3.2	CAR-T-Zell-Toxizität und die Notwendigkeit des Einsatzes eines Adaptersystems	78
4.3.3	Effektivität der CAR-T-Zell Therapie	81
4.3.4	Bereits in Studien verwendete Zielantigene für CAR-T-Zellen bei AML und zusätzliche potentielle Antigene	82
4.3.5	Methode und die Lyse beeinflussende Faktoren.....	86
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis.....	92
7	Anhang	102
7.1	Antigene.....	102
7.2	Protokolle.....	107
7.2.1	Virusherstellung.....	107
7.2.2	AdCAR-T-Zell Expansion:.....	109
7.2.3	Antigenscreening der AML-Tumorzelllinien, Sekundärfärbung....	111
7.2.4	Luciferase-basierte Zytotoxizitätstests	112
8	Erklärung zum Eigenanteil	115
9	Danksagung.....	116

Abkürzungsverzeichnis

AdCAR	= Adapter CAR-T-Zelle
Ag	= Antigen
AK	= Antikörper
ALL	= Akute lymphatische Leukämie
AML	= Akute myeloische Leukämie
CAR	= CAR-T-Zelle
CD	= Cluster of differentiation
CR	= Komplette Remission
DLBCL	= Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
E:T Verhältnis	= Effektor:Target Verhältnis
FACS	= Fluorescence-activated cell sorting
FAB	= FAB Fragment eines Antikörpers
FAD	= oxidierte Flavine
FasL	= Fas-ligand
FC	= Fragment, kristallisierbar
FCS	= Fetales Kälberserum
FSC	= Forward light scatter
Fig.	= Figure
GeoMean	= Geometrischer Mean
GvHD	= Graft versus host disease
GvHR	= Graft versus host reaction
h.i.	= Hitze inaktiviert
HIV	= Humanes Immundefizienz-Virus
HSC	= Hämatopoetische Stammzelle
HSCT	= Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN	= Interferon
Ig	= Immunglobulin
IL	= Interleukin
mAB	= Monoklonaler Antikörper
MACS	= Magnetic Activated Cell Sorting
MAS	= Makrophagen Aktivierendes Syndrom
mCherry-LUC	= mCherry-Luciferase
MFIR	= Mean Fluorescence Intensity Ratio
MHC	= Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC A/B	= MHC Klasse I Polypeptidähnliche Sequenzen A und B
MSC	= Mesenchymale Stammzellen
NADPH	= Reduzierte Pyridin-Nukleotide
NGS	= Next Generation Sequencing
PBS	= Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBMC	= Periphere Mononukleäre Blutzellen
PI	= Propidiumiodid
PMBCL	= Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
RT	= Raumtemperatur
SD	= Standardabweichung
sIL2R α	= Löslicher Interleukin-2-Rezeptor α
SSC	= Sideward light scatter
scFv	= single chain variable fragment
SZT	= Stammzelltransplantation
Tab.	= Tabelle
TCR	= T-Zell-Rezeptor
TNF	= Tumornekrosefaktor
T _{reg}	= Regulatorische T-Zelle
T _H 1	= T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	= T-Helferzelle Typ 2
vs.	= Versus
w CD33	= nach Zugabe von CD33
w/o CD33	= nur Effektorzellen, ohne Zugabe von CD33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausrüstung.	25
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial, Glasware und Plastikware.....	26
Tabelle 3: Puffer, Medien, Reagenzien.	28
Tabelle 4: Magnetische Partikel, Zytokine.	29
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper - alle mit einer Konzentration von 11ng/µl.....	29
Tabelle 6: Computerprogramme.....	30
Tabelle 7: Zentrifugenprogramme.	31
Tabelle 8: Zellmaterial und AML-Zelllinien.....	32
Tabelle 9: FAB Klassifikation der AML-Subtypen.	33
Tabelle 10: Fluorochrome und Einstellungen des Zytometers.	37
Tabelle 11: Reagenzien zur Vollblutaufbereitung.	42
Tabelle 12: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Molm-13. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	60
Tabelle 13 : Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	61
Tabelle 14: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie HL-60. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	62
Tabelle 15: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie Kasumi-1- <i>Werte gerundet auf Einer.</i> .	63
Tabelle 16: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie U937. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	64
Tabelle 17: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Molm-13. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	65
Tabelle 18: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	66
Tabelle 19: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie HL-60. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	68
Tabelle 20: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Kasumi-1. <i>Werte gerundet auf Einer.</i>	69

Tabelle 21: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie U937. <i>Werte gerundet auf Einer</i>	71
Tabelle 22: Antigenexpression der AML-Zelllinien Molm-13, THP-1, U937, HL-60 und Kasumi-1 gemessen in der Overton Positivität (%).....	74
Tabelle 23: Darstellung der Antigenexpression der AML-Zelllinien Molm-13, THP-1, U937, HL-60 und Kasumi-1 gemessen in der MFIR.	75
Tabelle 24: Potentielle Zielantigene für die CAR-T-Zell Therapie bei der AML und bisherige Daten aus präklinischen und klinischen Studien.	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau CAR	20
Abbildung 2: Prinzip der Bindung der AdCAR-T-Zelle an die Tumorzelle über das Adaptersystem.	22
Abbildung 3: Vorteile des AdCAR-Systems.....	23
Abbildung 4: Darstellung der sekundären Färbung für die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung.	36
Abbildung 5: Gating-Strategie.	38
Abbildung 6: Herstellung der AdCAR-T-Zellen.	41
Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation der peripheren Vollblutproben zur Isolation der T-Zellen.	42
Abbildung 8: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung nach LNGFR Anfärbung.	49
Abbildung 9: Auswertung des Transduktionserfolgs.....	50
Abbildung 10: Transduktionseffizienz der beiden verwendeten Viruschargen .	51
Abbildung 11: E:T Titration der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie THP-1.	54
Abbildung 12: E:T Titration der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie U937.	55
Abbildung 13: Darstellung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie Kasumi-1.....	56
Abbildung 14: Darstellung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie HL-60.....	57
Abbildung 15 : Darstellung der durch AdCART-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie Molm-13.....	58
Abbildung 16: Ermittlung der MFIR und der Overton Positivität.....	59
Abbildung 17: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Molm-13.....	60
Abbildung 18: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie THP-1.	61
Abbildung 19: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie HL-60.....	62

Abbildung 20: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Kasumi-1	63
Abbildung 21: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie U937.	64
Abbildung 22: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Molm-13.....	65
Abbildung 23: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1.	66
Abbildung 24: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie HL-60.....	67
Abbildung 25: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Kasumi-1.	69
Abbildung 26: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie U937.	70
Abbildung 27: Darstellung der Korrelation der Overton-Positivität in Prozent und der über Antigenbindung-vermittelten Lyse der AML Zelllinien nach 24 h.	72
Abbildung 28: Korrelation der MFIR und der über Antigenbindung-vermittelten Lyse der AML Zelllinien nach 24 h.	73

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie im Kindesalter

1.1.1 Epidemiologie und Prognose der akuten myeloischen Leukämie

Unter den malignen Tumorerkrankungen im Kindesalter stellt die Leukämie eine der häufigsten Formen dar. Dabei ist die akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter weit häufiger verbreitet als die akute myeloische Leukämie (AML), welche lediglich 18% der akuten Leukämien im Kindesalter ausmacht und einen Altersgipfel um die 60 Jahre aufweist. Zusammen machen die akuten Leukämien bis zu 30% der malignen pädiatrischen Tumordiagnosen aus (Kaatsch, Gabrow, und Spix 2018).

Die unreifen und funktionslosen AML-Blasten entstehen durch die maligne Transformation von hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloischen Zellreihe. Normalerweise sind die Vorläuferzellen im Knochenmark lokalisiert, jedoch können die unreifen Vorstufen bei akuten Leukämien ins periphere Blut ausgeschwemmt und dort auch nachgewiesen werden. Der Stammzellpool (CD34+/CD38-) ist hierbei seltener betroffen als die hochproliferativen Vorläuferzellen (CD34+/CD38+). Die unreifen Blasten verdrängen die reifen myeloischen Zellen aus dem Knochenmark, was wiederum zu einer Depletion der gesunden Hämatopoese führt. Durch zahlreiche unterschiedliche Mutationen können funktionslosen Blasten entstehen, die bereits zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden sein können (Gilliland und Tallman 2002; Greaves 2003). Zu diesen Mutationen gehören (Studien wurden vorwiegend für die AML im Erwachsenenalter durchgeführt):

Aufzählung nach Ref. (Metzeler u. a. 2016; Papaemmanuil, Döhner, und Campbell 2016).

- Aktivierende Mutationen in Genen, welche eine Rolle in Signaltransduktionswegen spielen (KRAS, KIT, FLT3 etc.)
- Mutationen verschiedener Transkriptionsfaktoren der myeloischen Reihe (RUNX1, CEBRA etc.)

- Fusion von Genen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (PML-RARA, MYH11-CBFB etc.)
- Mutationen in Chromatin-Modifikatoren (MLL-PTD, ASXL1 etc.) oder des Kohesin-Komplexes
- Mutationen, welche für Gene der Spleißosomen codieren
- Mutationen in Tumorsuppressorgenen (WT1, etc.)
- Mutationen des NPM1-Gens
- Mutationen in Genen, die für die Methylierung der DNA zuständig sind (IDH1, IDH2; TET-Genen oder DNMT-Genen)

In einer NGS-Analyse, welche die Daten von ca. 200 AML-Patienten im Erwachsenenalter umfasst, konnte gezeigt werden, dass mehrere rekurrente Veränderungen in Blasten eines Patienten vorkommen können. Der Durchschnitt an rekurrenten Mutationen lag pro Patient bei etwa fünf; die häufigsten Mutationen konnten in den Genen FLT3, IDH1 und 2, NPM1 und DNMT3A nachgewiesen werden (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Krankheitsdefinierend für die AML ist ein Blastenanteil von mehr als 20 % im peripheren Blut oder im Knochenmark. Die ersten Symptome der akuten Leukämie können bereits vor dem 2. Lebensjahr auftreten. Wie von Puumala et. al beschrieben, ist die *in utero* Exposition von ionisierender Strahlung eine bekannte Ursache der *de novo* AML (Puumala u. a. 2013). Die genauen Chromosomenmutationen, die als Ursache einer AML in Frage kommen, sind bisher nicht gänzlich bekannt. Die AML scheint durch eine Mischung aus genetischer Prädisposition und erworbenen Mutationen (bspw. Strahlung, Chemische Einflüsse etc.) zu entstehen.

In Deutschland liegt die Inzidenz der AML im Gesamten bei 7,1 / 1.000.000, d.h. bei etwa 100 - 200 Kindern und Jugendlichen pro Jahr (Kaatsch, Gabrow, und Spix 2018). Wie bereits erwähnt, ist die AML eine Tumorerkrankung, die vorwiegend im späten Erwachsenenalter auftritt und bis zu 80 % der Leukämien im Erwachsenenalter ausmacht. Männer bzw. Jungen sind um das 1,4-fache häufiger betroffen als Frauen bzw. Mädchen.

Die AML im Kindesalter ist häufig mit weiteren inflammatorischen oder genetischen Erkrankungen assoziiert, wie beispielsweise der Fanconi-Anämie oder dem Down-Syndrom (Zwaan u. a. 2015). Ein besonderer Fall ist die mit Trisomie 21 assoziierte AML im Kindesalter, da sie bereits intrauterin zu einer gesteigerten Megakaryopoese während der fetalen Blutbildung führt. Mehrere Studien wiesen darauf hin, dass der hämatopoetische Transkriptionsfaktor GATA1 im zweiten Trimenon eine wichtige Rolle in der Entstehung der mutierten, megakaryoblastären Klone zu spielen scheint. Bei 5 - 10 % der Neugeborenen mit Trisomie 21 sind diese Klone proliferiert und es ist eine transiente Leukämie nachweisbar. Die Mutation des GATA1 Gens scheint jedoch vorwiegend für die Entstehung der megakaryoblastären Leukämie wichtig zu sein (Alford u. a. 2011; Klusmann, Godinho, u. a. 2010; Klusmann, Li, u. a. 2010). Weitere Mechanismen, welche bei Kindern mit Down-Syndrom zu einer myeloischen Leukämie führen können, sind bislang noch ungeklärt. Als mögliche Ursachen werden Keimbahnmutationen in Betracht gezogen.

Klinisch tritt die AML variabel in Erscheinung, abhängig vom Rückgang der reifen Blutzellen, wie Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten, nicht jedoch von Lymphozyten, da diese ihren Ursprung in den Vorstufen aus der lymphatischen Entwicklungsreihe haben. Zu den häufigen Erstsymptomen zählen dementsprechend die Anämie, die Thrombozytopenie (welche mit Petechien, Ekchymosen etc. einhergehen kann), die Leukozytose, eine erhöhte Infektionsgefahr, Mundsoor oder B-Symptomatik. Die Blasten können nicht nur das Knochenmark, sondern das gesamte Organsystem befallen und somit weitere Symptome, wie Hepatosplenomegalie, geschwollene Lymphknoten oder einen Befall der Meningen auslösen. Bei einem sehr hohen Blastenanteil kann es auch zu Viskositätsproblemen kommen, welche sich anfangs als pulmonale Symptome präsentieren können, oder in einer Gerinnungsstörung mit schweren Blutungen resultieren kann. Aufgrund des Knochenmarkbefalls kann generalisierter Knochenschmerz ohne Fokus ein weiteres wichtiges Symptom darstellen. Zu den häufigsten Todesursachen der AML zählen Gerinnungsstörungen und Infektionen wie beispielsweise Pneumonien, welche

mit einer erheblichen und schnellen Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Patienten einhergehen.

Für die Prognose ist es wichtig zwischen zwei Formen der AML zu unterscheiden: die *de novo* AML und die sekundäre Form der AML. Die Prognose der sekundären AML ist mehreren Faktoren, wie beispielsweise dem Alter, unterworfen und tritt vorzugsweise im späten Erwachsenenalter auf. Oftmals folgt sie auf bereits bestehende Diagnosen wie dem MDS (Myeloblastisches Syndrom). Die AML, sowohl *de novo*, als auch sekundär entstanden, ist eine tödliche Erkrankung, welche unbehandelt durch ihren natürlichen Verlauf in ca. fünf Monaten, nach Erstdiagnose, zum Tod führt (Southam u. a. 1951; Gee, Yu, und Clarkson 1969).

Durch Einführung der Chemotherapie konnte die Prognose deutlich verbessert werden, da bei Patienten unter 60 Jahren und im Kindesalter eine komplette Remission (CR) bei bis zu 70 % der Patienten erreicht werden kann (Büchner u. a. 2005).

Von einer kompletten Remission spricht man, wenn der Blastenanteil im Knochenmark unter 5 % sinkt, keine Auerstäbchen oder extramedulläre Manifestationen nachweisbar sind und die Neutrophilenzahl unter 1000/ μ l bzw. die Thrombozytenzahl über 100.000/ μ l liegt. Demnach spricht man bei einem Anstieg des Blastenanteils im Knochenmark auf über 5 %, bei einem erhöhten Blastenanteil im peripheren Blut (welcher sich nicht durch eine reaktive Blutbildregeneration erklären lässt) oder bei einer extramedullären Manifestation der AML von einem Rezidiv.

1.1.2 Aktuelle Therapie der akuten myeloischen Leukämie im Kindesalter

Die aktuelle Therapie der AML im Kindesalter basiert auf einer intensiven Polychemotherapie, vorwiegend mit den Zytostatika Cytarabin und Alkylantien. Sie lässt sich in zwei Phasen einteilen: die Induktionsphase, welche eine komplette Remission (CR) erzielen soll und die Postremissionsphase, welche wiederum die Erhaltung der CR zum Ziel hat. Durch die Intensivierung der Behandlung in der Induktionsphase in den letzten Jahren konnte eine

Verbesserung der CR-Rate erzielt werden. Diese liegt, wie bereits erwähnt, bei ca. 70-80 %. Voraussetzung für die Intensivierung der Induktionsphase ist eine verbesserte Supportivtherapie zur Reduktion der schweren Nebenwirkungen und zur Kontrolle der hohen Injektionsfrequenz (Creutzig u. a. 2016).

Da eine Verzögerung des Therapiebeginns von nur einer Woche zu einer Verschlechterung der Prognose und des Therapieergebnisses führt, sollte die Induktionsphase direkt nach Erstdiagnosesicherung erfolgen (Sekeres u. a. 2009). Nach Standard-Induktionstherapie Schema (3+7) erfolgt eine dreitägige Gabe eines Anthrazyklins, in den meisten Fällen Daunorubicin 60 mg/m² oder Idarubicin 10-12 mg/m², gefolgt von einer kontinuierlichen Gabe Cytarabin (100-200 mg/m²) über sieben Tage. Als therapierefraktär gelten Patienten, die auch nach zwei Induktionstherapiezyklen nicht auf die Therapie ansprechen. Sie werden nach Schema der Rezidivbehandlung therapiert. Patienten, welche eine FLT3-assoziierte Mutation aufweisen, wird von Tag 8-21 der Induktionsphase Midostaurin per os verabreicht (50 mg / 2x täglich). Dieses muss jedoch bei Patienten, für welche eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) geplant ist, 48 Stunden vor der Konditionierungsphase abgesetzt werden (Grimwade u. a. 1998; Smuga-Otto 2016; Gallogly und Lazarus 2016). Da Midostaurin über den CYP3A4-Mechanismus abgebaut wird, muss auf eventuelle Wechselwirkungen mit CYP3A4-Induktoren (Rifampicin, Carbamazepin, Johanniskraut etc.) oder Inhibitoren (Ketoconazol, Clarithromycin etc.) geachtet werden. Die AML-BFM-Studiengruppe empfiehlt außerdem die Gabe von Sorafenib in den Intervallen der einzelnen Chemotherapieblöcke bei nachgewiesenen Mutationen im FLT3-Gen. Der Status der FLT3-Mutation spielt für das verbesserte Gesamtüberleben nach Sorafenibgabe, laut einer randomisierten-placebokontrollierten Studie bei Patienten bis zu 60 Jahren, keine Rolle (Röllig u. a. 2015; 2017).

In den AML-BFM Studien in Deutschland wird aufgrund der hohen Kardiotoxizität der Anthrazykline vermehrt eine liposomale Form des Daunorubicins angewandt und diese Nebenwirkung somit verringert. Weitere Substanzen, welche in der Induktionsphase eingesetzt werden, sind, neben den Anthrazyklinen und

Cytarabin: Etoposid, Thioguanin und Mitoxantron (Parigger u. a. 2016; Reinhardt u. a. 2004).

Nachdem eine CR erzielt wurde, benötigen die Patienten eine Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie), um ein Rezidiv zu vermeiden. Orientierend am Risikoprofil der AML und dem individuellen Allgemeinzustand des Patienten, kann diese entweder durch eine allogene Stammzelltransplantation oder durch die Gabe von hoch dosiertem Cytarabin erfolgen (Döhner u. a. 2017). Durch die erneute Zulassung von Gemtuzumab-Ozagamicin (Konjugat aus anti-CD33-Antikörper (AK) und Calicheamicin) in Kombination mit der Standard-Chemotherapie für AML, konnte die Rezidivrate verringert und das rezidivfreie Überleben für alle AML-Subgruppen und unabhängig des Alters, signifikant verlängert werden. Der positive Effekt von Gemtuzumab-Ozogamicin ist hierbei unabhängig von krankheits- oder patientenspezifischen Charakteristika. Basierend auf neu publizierten Studienergebnissen wurde die Zulassung für das Medikament 2017 erneut erteilt. Dabei ist zu beachten, dass höhere Dosen nicht zwangsläufig eine bessere Wirkung erzielen als niedrige und dass höhere Dosen häufig mit einer erhöhten Toxizität einhergehen (Kharfan-Dabaja u. a. 2013; Loke u. a. 2015; Hills u. a. 2014).

Bei Auftreten eines Rezidivs erfolgt die Therapie zunächst mit einer erneuten Induktionstherapie. Damit können Überlebensraten nach einem Rezidiv von bis zu 38 % erreicht werden. Um diese Überlebensrate zu erreichen, muss in allen Fällen eine Stammzelltransplantation in der zweiten Remission erfolgen (Kaspers u. a. 2013). Wenn nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ein Rezidiv auftritt, kann nach zwölfmonatiger Remissionsdauer eine weitere SZT erwogen werden, jedoch erfolgt dies nur bei Einzelfällen und ist kein Bestandteil der allgemeinen Leitlinien (Fathi und Chen 2014).

1.1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Nach Remission kann nicht nur eine Postremissionstherapie in Form einer Chemotherapie erfolgen, sondern vor allem bei Hochrisikopatienten oder bei Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation mit hoher Mutationslast sollte eine allogene Stammzellentransplantation durchgeführt werden (Cornelissen u. a. 2007; 2012). Dafür müssen die Patienten frühzeitig in einem Transplantationszentrum vorgestellt werden, unabhängig ihres Allgemeinzustandes, da der Erfolg der allogenen SZT zum einen von den Begleiterkrankungen, zum anderen auch vom Krankheits- und Transplantationsrisiko abhängig ist. Bei einer allogenen SZT sind Donor und Empfänger nicht dieselbe Person und somit muss die Kompatibilität mithilfe einer HLA-Typisierung überprüft werden. Falls sich kein HLA-identer Spender findet, oder sich der Patient in schlechtem klinischem Allgemeinzustand befindet bzw. signifikante Komorbiditäten aufweist, sollte eine Chemokonsolidierung erfolgen. Diese wird über zwei bis drei Zyklen mittels hochdosiertem Cytarabin ($3 \text{ g} / \text{m}^2 / 2\text{x} \text{ täglich}$) durchgeführt (Mayer u. a. 1994; Burnett u. a. 2013). Alternativ ist eine SZT mit Spendern deren HLA-Profil zu 9 / 10 oder 8 / 10 mit dem des Empfängers, sowie HLA-haploidentem familiären Spender möglich. Bei HLA-haploidenten Spendern können mithilfe einer Induktionstherapie, mittels Hochdosis Ara-C, gefolgt von einer monatlichen myelosuppressiven Postremissionstherapie, gleichwertige Therapieergebnisse erzielt werden, wie bei anderen Konsolidierungstherapien (Büchner u. a. 2003). Es zeigt sich, dass die Prognose für Patientin mit Rezidiv oder therapieresistenter AML schlecht ist. Ein neuer experimenteller Ansatz für die Therapie der AML stellen CAR-T-Zellen dar.

1.2 Aufbau von CAR-T-Zellen

1.2.1 Das Prinzip der CAR-T-Zell Technologie

CAR steht für chimeric antigen receptor und beruht auf dem Prinzip eines zytotoxischen T-Zell-Hybridom mit integriertem genetischem Material zur Erkennung und Bindung von Antigenen. Es wurde erstmals von Gross, Waks und Eshhar et al. in 1989 beschrieben (Gross, Waks, und Eshhar 1989). Mittels dieses Konstrukts war es nicht nur möglich zu zeigen, dass ein ausgewähltes Antigen

gezielt gebunden werden kann, sondern auch, dass dies unabhängig der MHC-Restriktion erfolgen kann. Die Transduktion der T-Zellen erfolgt *ex vivo*, nachdem sie aus peripherem Blut gewonnen wurden. Im Anschluss daran werden die transduzierten T-Zellen expandiert. Während der Transduktion wird mithilfe von lentiviralen oder gammaretroviralen Vektoren der chimäre Antigen-Rezeptor in die T-Zellen integriert (Amado und Chen 1999; Naldini u. a. 1996). Chimär bedeutet, dass die variablen Regionen des T-Zell-Rezeptors durch den Antigen-bindenden Anteil eines Antikörpers/Antikörperfragments ersetzt wurde, während die konstanten Regionen, deren Aufgabe die Signalweiterleitung und anschließende Aktivierung der T-Zelle sind, beibehalten wurden.

Die Antigenerkennung der CAR-T-Zelle erfolgt über die Ektodomäne, welche aus Teilen der schweren und leichten Ketten eines scFv (engl. *single-chain variable fragment*) eines Antikörpers besteht, die über Polypeptide miteinander verbunden sind. Über die Gelenkregion (CD8- oder IgG4-Molekül) wird die Interaktion zwischen der CAR-T-Zelle und der Zielzelle erleichtert. Die Bindung des scFv an das Epitop wird durch die Affinität und der Abstand zwischen Effektorzelle und scFv beeinflusst. Die Transmembrandomäne, stammt zumeist von CD28 oder CD8, verbindet die Ektodomäne mit der Endodomäne und verankert den chimären Antigenrezeptor in der Zellmembran der T-Zelle. Über die Endodomäne wird die CAR-T-Zelle nach Antigenbindung aktiviert. Die Endodomäne stammt im Falle der ersten Generation der CAR-T-Zellen von der ζ -Kette des T-Zell Rezeptors und initiiert über Phosphorylierung aktivierender Motive, genannt ITAMs (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), eine Signalkaskade, die die Aktivierung der CAR-T-Zelle zur Folge hat. Endodomänen neuerer Generationen von CAR-T-Zellen enthalten weitere aktivierende Domänen, die beispielsweise von stimulierenden Molekülen, wie CD27, CD28, ICOS, 4-1BB oder OX40 abstammen (Savoldo u. a. 2011; Laport u. a. 2003). Diese kostimulierenden Domänen erhöhen die Effektivität der Signaltransduktion über die ζ -Kette, was wiederum in einer stärkeren Proliferation und Persistenz der CAR-T-Zellen nach Antigenbindung resultiert. Die erste kostimulierende Domäne, welche im Zusammenhang mit einem CAR-Konstrukt getestet wurde, stammte von CD28. Dabei kam es zu einer drastischen

Erhöhung der Zytotoxizität und einer erhöhten IL2-Produktion (Finney, Akbar, und Lawson 2004; Loskog u. a. 2006). Wichtig ist, dass wie bereits vorab erwähnt, die Bindung eines CARs an die Oberflächenmoleküle der Zielzellen nicht von der Oberflächenpräsentation der MHC-Expression abhängig ist. Der Escape-Mechanismus durch verminderte MHC-Expression durch die Tumorzelle wird somit verhindert. (Grupp u. a. 2013).

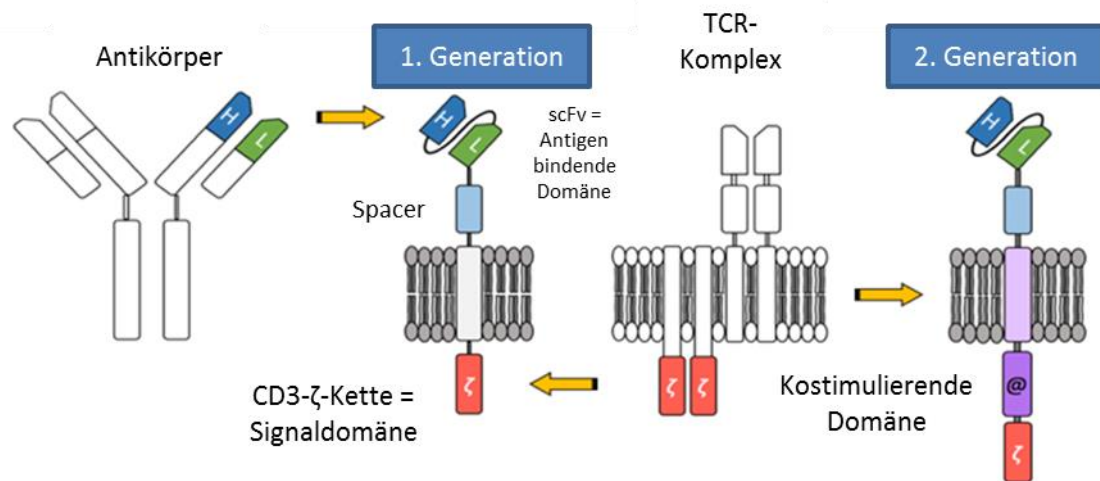


Abbildung 1: Aufbau CAR

Links ist ein Antikörper mit seinen schweren und leichten Ketten dargestellt. Das AK-Fragment besteht aus jeweils einer leichten und einer schweren Kette, welche, nach künstlicher Verbindung dieser, die antigenerkennende scFv Region formen. Die scFv Bindungsdomäne wird im zweiten Schritt mit dem CD3-ζ-Anteil und der Transmembrandomäne des TCR-Komplexes (2. Abb. von rechts), über einen Spacer, zu einem CAR der ersten Generation verbunden. Ganz rechts ist ein CAR der zweiten Generation dargestellt, bei welchem zusätzlich eine kostimulierende Domäne (CD28 oder 41BB) zwischen CD3-ζ-Domäne und Transmembrandomäne eingebaut wurde.

1.2.2 Therapie mit CAR-T-Zellen

Nachdem die CAR-T-Zellen in den Patienten infundiert wurden, binden sie über den CAR an Tumorzellen, welche das passende Zielantigen exprimieren. Nach erfolgreicher Bindung proliferieren die CAR-T-Zellen und zerstören die gebundenen Zielzellen. Da jedoch die meisten Antigene nicht nur auf Tumorzellen exprimiert werden, sondern auch physiologisch auf körpereigenen Zellen, würde die Persistenz der CARs im menschlichen Körper starke Komplikationen mit sich bringen. Als wichtiges Beispiel ist hierfür die Behandlung von Patientinnen mit Mamma-CA zu nennen, bei welcher Her-2-spezifische CAR-T-Zellen eingesetzt wurden, die sich gegen das Antigen Her-2-neu richteten.

Jedoch ist Her-2-neu auch zu geringem Grad auf Lungenendothel und dem Myokard exprimiert, wodurch es in einigen Fällen zu tödlichen Nebenwirkungen kam (Morgan u. a. 2010; Linette u. a. 2013). Dies bedeutet, dass es ein hohes Risiko für Komplikationen darstellt, aktivierte zytotoxische CAR-T-Zellen im Körper zu belassen. Der Aufwand die individuellen CAR-T-Zellen für jeden Patienten herzustellen ist wiederum sehr kostspielig. Da die Therapie mit CAR-T-Zellen jedoch eine mehrfache Anwendung erfordern kann, wurden verschiedenste Adaptersysteme entwickelt, die die CARs sowohl aktivieren, als auch inaktivieren können (Y. G. Lee u. a. 2019; Van Schandevyl und Kerre 2020). Auf die einzelnen Adaptersysteme wird in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen.

1.2.3 Adapter-CAR-T-Zellen als neues Therapiekonzept

In dieser Arbeit wurde ein eigens entwickeltes Adaptersystem verwendet, in welchem ein biotinyliertes Adaptermolekül als Schalter für die Aktivierung und Inaktivierung der CAR-T-Zellen verwendet wurde. Dieses Adaptermolekül fungiert als austauschbares Bindungsstück zwischen Antigen und CAR-T-Zelle. Das Adaptermolekül erkennt und bindet das Epitop des entsprechenden Zielantigens auf der Tumorzelle. Die CAR-T-Zelle wiederum bindet an das Biotin des Adaptermoleküls, wodurch sie aktiviert wird und somit die zytotoxische Zerstörung der Zielzelle einleitet. CAR-T-Zellen, die nicht das Antigen an sich, sondern eine Struktur auf einem Adaptermolekül erkennen, werden als Adapter-CAR-T-Zellen (AdCAR-T-Zellen oder AdCARs) bezeichnet. In dieser Arbeit wurde ein biotinylierter Antikörper als Adapter verwendet, welcher aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit innerhalb weniger Stunden aus dem Körper ausgeschieden werden soll. Demnach ist das ganze CAR-System nur nach Zugabe dieses Antikörpers aktiv und vermutlich können CAR-T-Zellen nach Ausscheidung des Adaptermoleküls weiterhin bis zu mehreren Jahren inaktiviert im Körper des Patienten persistieren, bis sie, beispielsweise im Falle eines Rezidivs, wieder benötigt werden und mittels des Adapters wieder aktiviert werden können. Zusammenfassend ermöglicht das Adaptersystem einen universellen, transienten, synchronen bzw. multiplen Angriff der Zielzelle. Durch den universellen Angriff über Biotin können Adaptermoleküle beliebig

ausgetauscht werden bei gleichbleibenden Effektorzellen. Aufgrund des transienten Angriffs durch Zugabe oder Entzug des Adaptermoleküls, ist die Wirksamkeit des Systems stark von der Pharmakokinetik und –dynamik des Adaptermoleküls abhängig. Des Weiteren soll durch synchronen bzw. multiplen Angriff verschiedener Zielantigene, simultan oder sequenziell, der Tumor Escape Mechanismus durch Veränderung der exprimierten Antigenlandschaft erschwert werden.

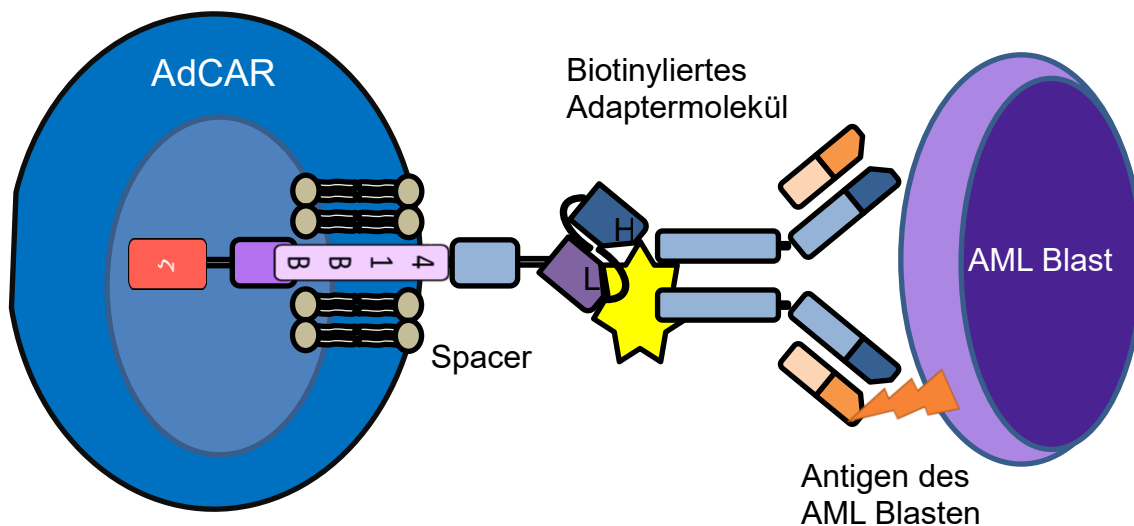


Abbildung 2: Prinzip der Bindung der AdCAR-T-Zelle an die Tumorzelle über das Adaptersystem.

Links ist die AdCAR Z-Zelle dargestellt, welche über ihre antigenbindende Domäne nicht direkt das Antigen der Tumorzelle bindet, sondern an ein biotinyliertes Adaptermolekül. Das Adaptermolekül wiederrum bindet dann an das Zielantigen des im Bild rechts dargestellten AML-Blasten. Über die Bindung an das Adaptermolekül erfolgt die Aktivierung der AdCAR-T-Zelle und die dadurch vermittelte Lyse der Tumorzelle kann stattfinden.

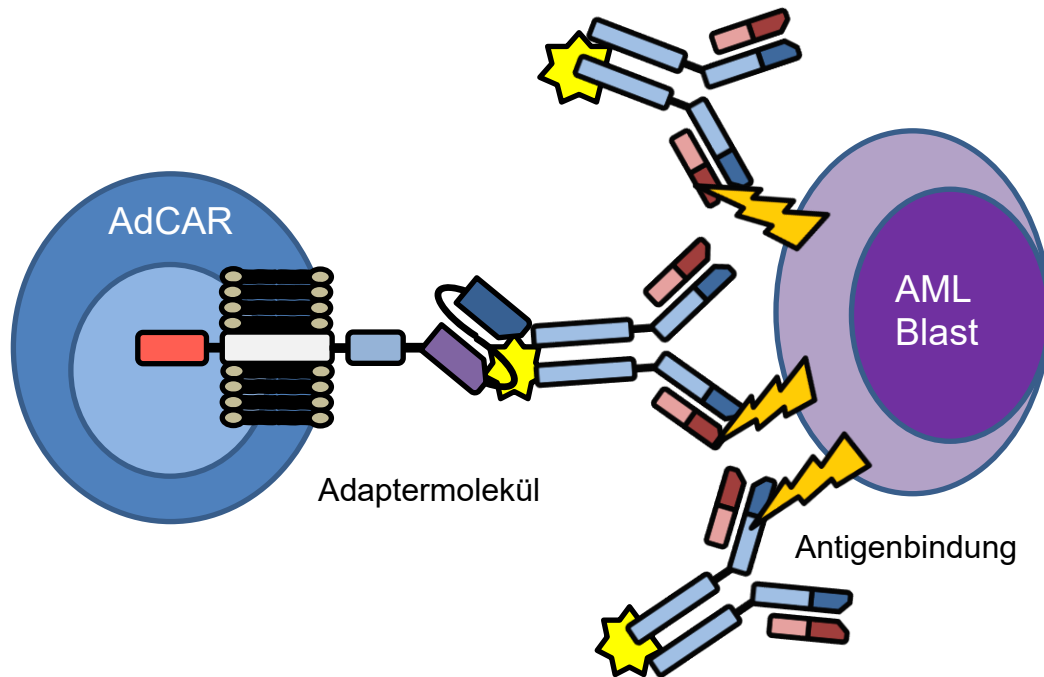


Abbildung 3: Vorteile des AdCAR-Systems.

In dieser Grafik sind die drei wesentlichen Vorteile der Verwendung eines biotinylierten Adaptermoleküls dargestellt: universelle, transiente und synchrone Bindung multipler Antigene. Links ist wie in Abb. 2 die AdCAR-T-Zelle dargestellt, die wieder über Bindung an den biotinylierten Adapter, sekundär über diesen an die Tumorzelle (rechts im Bild) bindet.

1.2.4 Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit CAR-T-Zellen

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, werden in der Therapie der AML hoch zytotoxische Zytostatika wie Cytarabin, Daunorubicin oder Alkylantien eingesetzt, welche sich nicht spezifisch gegen die Tumorzelle richten, sondern auch andere Körperzellen zerstören. Im Falle der AML ist die myeloische Zellreihe betroffen und unter Chemotherapie werden alle Zellen dieser Zellreihe angegriffen und supprimiert. Dies bringt nicht nur zahlreiche Komplikationen mit sich, sondern kann vor allem im adulten Alter einen schweren bis tödlichen Verlauf nehmen. Aufgrund des raschen und massiven Tumorzerfalls kann ein Tumorlyse-Syndrom auftreten, wobei es zu einer erhöhten Freisetzung von Zellbestandteilen und Elektrolyten (Kalium, Phosphat etc.) kommt. Durch die Freisetzung werden verschiedene Organsysteme aktiv geschädigt und es können ein akutes Nierenversagen (durch Uratnephropathie), Herzrhythmusstörungen oder Epileptische Anfälle auftreten.

Das Leukostase-Syndrom stellt einen hämatologischen Notfall dar. Es entsteht infolge der Hyperleukozytose, wobei sich die Leukozyten am Endothel anlagern und somit die Viskosität des Blutes erhöhen. Durch die verminderte Fließeigenschaft des Blutes können Mikrozirkulationsstörungen, insbesondere in Kapillaren der Lunge und des Gehirns, auftreten.

Der Einsatz von AdCAR-T-Zellen, welche nur so lange aktiviert werden, bis die Tumorzellen zerstört sind, bzw. gezielt nur die Tumorzellen angreifen, soll die genannten Komplikationen reduzieren. Durch die Dosierung der AdCARs soll eine höhere Spezifität für Tumorzellen, sowie eine bessere Steuerbarkeit durch die Adaptergabe bewirkt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ausrüstung

Tabelle 1: Ausrüstung.

Firma	Equipment
BAYER	ADVIA120-Zellzählung
BD Biosciences	BD LSR II Flow Cytometer BD FACSAria II Cell Sorter
Becton, Dickinson GmbH	Flow Zytometer
Brand	Multikanalpipette 20-200µl
Counter Wallac	Viktor 1420 Multilabel Counter
Cryostorage System	Tank zur Kryokonservierung der Kinderklinik Tübingen
Eppendorf	Verstellbare Pipette: Research 2,5µl
GFL	Wasserbad 1804
Gilson	Verstellbare Pipette: Pipetman: 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl
Heraeus	Inkubator HERAcell
Heraeus instruments	Sterilbank HERAsafe
Hettich	Zentrifuge ROTANTA 46RSC Zentrifuge ROTIXA 50RS Zentrifuge ROTINA 420R
Horiba	BGA ABX Micros CRP 100
IKA	Vortexer MS1 Minishaker
Integra	Elektrische Pipette, Pipetboy 2
Liebherr/Bosch	Kühlschrank
Memmert, Köttermann	Wasserbad 10l
Miltenyi Biotech	QuadroMACS Separator 130-090-976
Olympus	Lichtmikroskope: Durchlichtmikroskop CX40LF200 und Inversionsmikroskop IX50
Qualilab	Mr Frosty ®
Radiometer	ABL800 Flex
Scorsman	Eismachine

2.1.2 Verbrauchsmaterial, Glasware und Plastikware

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial, Glasware und Plastikware.

Firma	Ware	Katalognummer
ACEA Bioscience Inc	Zellkulturplatte, E-plate 96, 96KV	2801035
BD™ Bioscience	Cell strainer, 40 µm (Zellfilter) FACS Analyseröhrchen mit Rundboden	
BD™ Diagnostics / Plastipak	Sterile Spritze 50 ml Einmalkanülen, Microlance (19 G), Luer-Lok	300869
Bemis	Parafilm, Verschlussfolie, „M“	
Biozym	Pipettenspitzen 1 - 10 µl	720011
Cellstar, Greiner bio-one	Falcon-Röhrchen 15 ml Zellkulturflasche T 25 Zellkulturflasche T 75 Zellkulturflasche T 175 Zellkulturplatte, 6 KV	188271 690175 658175 660175 657160
Costar	Zellkulturplatte, 12 KV Zellkulturplatte, 24 KV Stripetten 2 ml Stripetten 5 ml Stripetten 10 ml Stripetten 25 ml Stripetten 50 ml	3524 4021 4051 4101 4251 4501
CRYO.S, Greiner bio-one	Pipettenspitzen 100 - 1000 µl	122263
Eppendorf	Sterile Eppendorfcups, PP/1,5 ml	
Falcon	Falcon-Röhrchen 50 ml FACS-Röhrchen 5 ml	352070 352008
Greiner	Zellkulturplatte, weiß, 96 KV Sterile Kryoröhrchen, 2 ml	655083
Hartmann	Einmalhandschuhe	
Miltenyi Biotech	MACS columns LS (Säulen) MACS Multiständer	130-042-401 130-042-401
Ratiolab	Pipettenspitzen 20 µl	
Sarstedt	Pipettenspitzen 10 - 200 µl Butterfly, Safety-Multifly-Set	70.760.002

2.1.3 Stammlösungen

1a) Medium für die Expansion der AML-Zelllinien HL-60, U-937, Mono-MAC-6 und NOMO-1:

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 50 ml (10%) Fetales Kälberserum (FCS, FBS), hitzeinaktiviert für 10 Minuten bei 55 °C
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin (10.000 U / ml) / Streptomycin (0,01 U / ml) (Pen / Strep)

1b) Medium für die Expansion der AML-Zelllinien THP-1, Molm-13, KG-1a und MV4-11:

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 100 ml (20%) FCS, hitzeinaktiviert
- 5 ml L-Glutamine (200 mM)
- 5 ml Penicillin (10.000 U / ml) / Streptomycin (0,01 U / ml) (Pen / Strep)
- 5 ml Natrium-Pyruvat (1 mM)

1c) Medium für die Expansion der AML-Zelllinien Kasumi-1 und ME-1:

- 500 ml RPMI 1640 Medium
- 100 ml (20%) FCS, hitzeinaktiviert
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin (10.000 U / ml) / Streptomycin (0,01 U / ml) (Pen / Strep)

2) Medium für die Herstellung und Expansion der AdCARs:

- 50 ml TexMacs Medium von Miltenyi Biotech
- 500 µl Penicillin (10.000 U / ml) / Streptomycin (0,01 U / ml) (Pen/Strep)
- 50 µl Interleukin-7 (Konz.: 10 ng / ml) von Miltenyi Biotech
- 25 µl Interleukin-15 (Konz.: 5 ng / ml) von Miltenyi Biotech

4) MACS-Puffer:

- 1000 ml CliniMACS PBS/EDTA von Miltenyi Biotech

- 10 ml Humanes Serumalbumin aus dem hämatologischen Labor für Stammzelltransplantationen der Kinderklinik Tübingen

5) Einfriermedium:

- 90% FCS, hitzeinaktiviert
- 10% DMSO

2.1.4 Puffer, Medien, Reagenzien

Tabelle 3: Puffer, Medien, Reagenzien.

Firma	Produkt	Katalognummer
Becton, Dickinson GmbH	FACS Clean Flüssigkeit	340345
	FACS Flow Flüssigkeit	342003
	FACS Rinse Flüssigkeit	340346
Biochrom	RPMI 1640 Medium	F 1215
	FCS, FBS – Fetales Kälberserum	S 0115
	L-Glutamin 200M	K 0282
	Biocoll-Lösung Penicillin + Streptomycin Natrium-Pyruvat 1mM	K02822
CSL Behring GmbH	Humanes Serumalbumin, 20% IVlg, 100mg/ml	J9344411A CD.-B: 43282000024
Dr. Schumacher GmbH	Descosept AF (Desinfektionsmittel)	00-311-010
Interlock Medizintechnik GmbH	Isopropanol	02009
Irmela Jeremias	Plasmid LucGFP/LucmCherry	
Miltenyi Biotec	TexMACS GMP media	170-076-306
	CliniMACS PBS/EDTA	700-29
	TransACT, human Plasmide (A und B)	130-111-160
NeoLab Migge GmbH	pH-Stabilisierer Wasserbad	1-6095
OriGen Biomedicals	Dimethylsulfoxid (DMSO)	V10050
Ratiopharm	Heparin-Natrium-25000	Ch.-B: T23531A
Sigma-Aldrich	PBS	P5119
	D-Luciferin, synthetisch	L9504-10MG
Takara	Lenti-X-Concentrator	631231
ThermoFischer	Lipofectamin p3000	L3000008
	HEPES (1M)	15630080

2.1.5 Antikörper, Magnetische Partikel, Zytokine

Tabelle 4: Magnetische Partikel, Zytokine.

Firma	Produkt	Katalognummer
BD Biosciences	CompBeads, a-Mouse	51-90-9001229
Miltenyi Biotec	Anti-CD4+-Microbeads	130-045-101
	Anti-CD8+-Microbeads	130-042-201
	Interleukin 7, human (c.: 10 ng/ml)	130-045-101
	Interleukin 15, human c.: 5 ng/ml	130-045-201
	Helferplasmid A	
	Helferplasmid B	

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper - alle mit einer Konzentration von 11ng/µl.

Antikörper	Antigen/Synonym	Klon	Hersteller	Bestellnummer
Anti-CD15-Biotin	Sialyl Lewis ^x	VIMC6 human	Miltenyi Biotec	130-098-383
Anti-CD30-Biotin	TNF-Rezeptor 8	Ki-2 human	Miltenyi Biotec	130-098-639
Anti-CD32-Biotin	FCGR2A	2 E 1 human	Miltenyi Biotec	130-097-509
Anti-CD33-Biotin	Siglec-3	AC104.3E3 human	Miltenyi Biotec	130-098-916
Anti-CD38-Biotin	ADP-Ribosylcyclase/cADP R-Hydrolase 1	REA671 human	Miltenyi Biotec	130-110-242
Anti-CD44v6-Biotin	LHR, BA-1, CSPG8 (Chondroitinsulfat Proteoglykan 8), Epican	REA706 human	Miltenyi Biotec	130-112-580
Anti-CD56-Biotin	NCAM1 (neurales Zelladhäsionsmolekül 1)	REA196 human	Miltenyi Biotec	130-100-688
Anti-CD64-Biotin	Fc-γ-Rezeptor 1 (integrales Membranglykoprotein, der IgG-AK bindet)	10.1.1 human	Miltenyi Biotec	130-097-065
Anti-CD96-Biotin	T-Zell-Oberflächenprotein TACTILE	REA195 human	Miltenyi Biotec	130-111-751
Anti-CD112-Biotin	Nectin-2	R2.525 human	Miltenyi Biotec	130-109-000
Anti-CD123-Biotin	Interleukin-3-Rezeptor, IL-3RA	AC145 human	Miltenyi Biotec	130-098-565
Anti-CD133/1-Biotin	Promonin 1	AC133 human	Miltenyi Biotec	130-090-664
Anti-CD133/2-Biotin	5-Transmembran-Oberflächenantigen	293C3 human	Miltenyi Biotec	130-113-185
Anti-CD135-Biotin	Rezeptortyp-Tyrosin-Protein-Kinase FLT3	BV10A4H2 human REA786 human	Miltenyi Biotec	130-106-250 130-111-586

Anti-CD157-Biotin	BST1, ADP-Ribosylcyclase-2	REA465 human	Miltenyi Biotec	130-106-916
Anti-276-Biotin	B7H3	FM276 human	Miltenyi Biotec	130-095-514
Anti-CD276-HEK Biotin Anti-CD276-FAB(2)-Biotin	B7H3	FM276 human	Dauids Biotechnologie	
Anti-CD305-Biotin	LAIR-1 (Leukozyten-assoziiertes Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor-1)	REA447 human	Miltenyi Biotec	130-106-804
Anti-CLL1/CD371-Biotin	CLEC12A	REA431 human	Miltenyi Biotec	130-106-433
Anti-MICA/B-Biotin	F-6, MHC-1 assoziiertes Protein A und B	6D4 human	Miltenyi Biotec	130-100-901
Anti-Biotin-FITC	Konjugiertes Biotin	Bio3-18E7 human	Miltenyi Biotec	130-090-857
Isotyp PE	Zielantigen nicht bekannt	MOPC-173	Biolegend Conc: 200ng/µl	B213581
Anti-CD4 BUV395		SK3	BD Bioscience	563550
Anti-CD8 APC Vio770		BW1357/80	Miltenyi Biotec	130-096-561
Anti-LNGFR-FITC		ME20.4-1.H4	Miltenyi Biotec	130-091-917

2.1.6 Computerprogramme

Tabelle 6: Computerprogramme.

Firma	Programm
ACEA Biosciences Inc.	RTCA
BD Biosciences	BD FACS Diva v 6.1.3
Becton, Dickinson & Company	FlowJo v10.2/10.7
Compaq	Angeschlossene Hardware an Victor, PC Windows 95
Hewlett-Packard	Angeschlossene Hardware / PC an BD LSR II Flow Cytometer und BD FACSAria II Cell Sorter
Inkscape community	Inkscape 0.92.0
Microsoft	Microsoft Office 2007/2018
Statcon	GraphPad Prism v 7.3
Wallac	Wallac 1420 Workstation

2.1.7 Zentrifugenprogramme

Tabelle 7: Zentrifugenprogramme.

Programm	Radius	T/°C	Start	Stopp	RCF/g	t/min	Kommentar
1	183	20	1	1	800	30:00	Ficoll 1
2	183	20	9	9	500	10:00	Ficoll 2
3	183	20	9	9	400	10:00	Ficoll 3
4	183	04	9	9	350	05:00	FACS
5	183	04	9	7	200	10:00	MACS
6	183	20	9	7	250	05:00	Waschprogramm T-Zellen
7	159	32	9	0	800	30:00	Transduktion
8	183	4	9	9	1500	45:00	Virusherstellung
9	183	20	9	9	300	05:00	Waschprogramm Zelllinien
10	159	04	2	2	300	05:00	Zytokin-Platten

2.2 Zellmaterial und AML-Zelllinien

Tabelle 8: Zellmaterial und AML-Zelllinien.

AdCARs	Die T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut von vier unterschiedlichen, gesunden Spendern (D1, D2, D3, D4) gewonnen.	
Molm-13	AML FAB M5a Gewonnen aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Mannes mit AML nach MDS in 1995. Mit FLT3 Tandem Duplikation und Mutation des CBL- δ -Exons 8.	Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
THP-1	Unbekannte FAB Klassifikation FAB? Gewonnen aus der AML eines einjährigen Jungen in 1978. Produziert Lysozyme und vermittelt Phagozytose mittels eines KMT2A-MLLT3-Fusionsgens	Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
U937	Generalisiertes diffuses histiozytäres Lymphom. Gewonnen aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes in 1974. In der Literatur wird beschrieben, dass diese Zelllinie Monozyten-assoziierte Marker exprimiert.	Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
HL-60	AML FAB M2 Gewonnen aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Frau in 1976. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass diese Zelllinie ein amplifiziertes MYC Gen trägt und sensibel auf Reagenzien wie DMSO reagieren soll.	Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
Kasumi-1	AML FAB M2 Gewonnen aus dem peripheren Blut eines siebenjährigen Jungen in 1989. Die Zelllinie Kasumi-1 exprimiert ein RUNX1-RUNX1T1 Fusionsgen, auch bekannt als AML1-ETO und weist zusätzlich die KIT Mutation N822 auf.	Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.2.1 AML Zelllinien

Die für die Versuche verwendeten AML-Zelllinien verfügen über unterschiedliche FAB-Subtypen und können anhand dieser und anhand der Reifestufen der AML-Blasten in acht verschiedene M-Subgruppen eingeteilt werden. In den Versuchen kamen AML-Zelllinien der Subgruppen M1-M5 zum Einsatz, um den Mechanismus des Adapter-Systems für verschiedene Zelllinien und Reifestufen der AML zu zeigen. Teilweise weisen die verschiedenen Subgruppen zusätzlich zytogenetische Veränderungen auf.

Tabelle 9: FAB Klassifikation der AML-Subtypen.

M0	Minimal differenzierte AML
M1	Teilweise ausgereifte AML Zellen
M2	Ausgereifte AML-Zellen
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M4 (+eos)	Akute Myelomonozytäre Leukämie (+ Eosinophilie)
M5	Akute Monozytäre Leukämie
M6	Akute Erythrozytäre Leukämie
M7	Akute Megakaryoblastozytäre Leukämie

2.3 Kultivierung der AML-Tumorzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten AML-Zelllinien wurden bei 37 °C und in einer Umgebung mit einem CO₂-Anteil von 5% in ihren jeweiligen Stammlösungen aus dem Kapitel 3.1.3 kultiviert. Das Nährmedium muss drei- bis viermal wöchentlich gewechselt werden. Abhängig ist die Pflege der Zelllinien davon, ob die Zellen expandiert oder nur in Kultur gehalten werden sollen. Für die Expansion wird alle zwei bis drei Tage die Zellzahl ermittelt und abhängig davon die Zugabe frischen Mediums angepasst. Werden die Zellen lediglich in Kultur gehalten und sollen nicht expandiert werden, wird die Zellzahl nur einmal pro Woche ermittelt. In diesem Fall erfolgt die Zellpflege anhand der Beurteilung des Mediums und dessen Trübung. In der Regel wurden die Zellen dreimal die Woche im Verhältnis 1:4 / 1:5 aufgetrennt.

2.4 Akquise von Patientenblutproben

Die vorliegende Studie mit der Ethikvotumsnr.: 761/2015B02, wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Tübingen geprüft und genehmigt.

Alle Probanden haben nach sorgfältiger Aufklärung der Studie zugestimmt und eingewilligt. Insgesamt wurde das Zellmaterial von vier Spendern für die Versuche gewonnen. Die Entnahme des Vollblutes zur Isolation der T-Zellen per Biocoll Methode erfolgte nur im Rahmen der Studie. Es wurden keinerlei andere Untersuchungen durchgeführt.

2.5 Transduktion der mCherry-Luciferase in AML Zelllinien

Da die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests auf dem Prinzip der Biolumineszenz basieren, musste in die AML Zelllinien vorher ein für Luciferase-kodierendes Gen (LUC m-Cherry) integriert werden. Für die Integration des LUC m-Cherry Konstrukts wurden lentivirale Vektoren verwendet, welche mit den AML Zelllinien in serumfreies Tumormedium gegeben wurden. Der Serumentzug ist notwendig, da dessen Bestandteile unspezifische Bindungen mit den Lentiviren eingehen können. Um Tumorzellen und Lentiviren in räumliche Nähe zueinander zu bringen, wurde der Ansatz mit Programm 7 zentrifugiert. Zur Herstellung des optimalen Nährmediums wurde nach 6 h Inkubation wieder serumhaltiges Tumormedium zu den transduzierten AML Zellen gegeben. Nach weiteren 6 und dann insgesamt nach 24 h wurde anhand der ermittelten Zellzahl weiteres Tumormedium hinzugegeben und nach 48h das komplette Medium, bis auf 20% des ursprünglichen Mediums, ausgetauscht.

2.6 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Für diese Arbeit wurde ein LSR II Durchflusszytometer der Firma Becton, Dickinson GmbH verwendet. Die Messungen wurden mit den Programmen FacsDiva, FlowJo und Excel grafisch dargestellt und ausgewertet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie wurde erstmalig von L.A.Herzenberg et al. im Jahre 1976 beschrieben und basiert auf der hydrodynamischen Fokussierung einer Zellsuspension und Aufteilung der Suspension in ihre unterschiedlichen Zellaggregate (Herzenberg, Sweet, und Herzenberg 1976). Mittels der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer chemischen oder physikalischen Eigenschaften identifiziert und sortiert werden. Dabei passieren die Zellen Laserstrahlen, wobei sie abhängig ihrer physikalischen Eigenschaften oder der Anfärbung mittels Fluorochrome (chemische Eigenschaften) die

Wellenlänge und auch die Richtung der Laserstrahlen verändern. Diese Veränderung des emittierten Lichts wird nach passieren von Spektralfiltern durch dahinterliegende Detektoren aufgezeichnet und durch die Verarbeitung durch eine Software in Echtzeitdiagrammen dargestellt. Zur Auftrennung der Suspension in ihre Aggregate wird am Rand der Messkapillare, durch welche die Zellen einzeln hindurchfließen sollen, ein zweiter, schnellerer Flüssigkeitsstrom erzeugt. Der schnellere Strom der beiden umhüllt den Probenstrom und engt diesen soweit ein, dass die Zellen nur noch einzeln hindurchpassen und in einer Messkammer den Laser passieren können. Beim Durchlaufen der Laser wird das zur Längsachse gestreute Licht (FSC = forward scatter) und das 90° zur Seite gestreute Licht (SSC = side scatter) gemessen und aufgezeichnet. Dabei ist die relative Zellgröße proportional zum FSC und die intrazelluläre Granularität proportional zum SSC. Die relative Zellgröße wird durch die Brechung des Lichts in einem flachen Winkel, anhängig vom Volumen der Zelle bestimmt. Die Refraktion ist abhängig von Zellgröße, der Struktur der Zellmembran, intrazellulären Komponenten und vor allem von der Granularität der Zelle. Durch Größe und Granularität lassen sich verschiedene Zellpopulationen differenzieren. Die verschiedenen Blutbestandteile (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) werden grafisch mittels Punktdiagramm dargestellt (FSC auf der x-Achse und SSC auf der y-Achse).

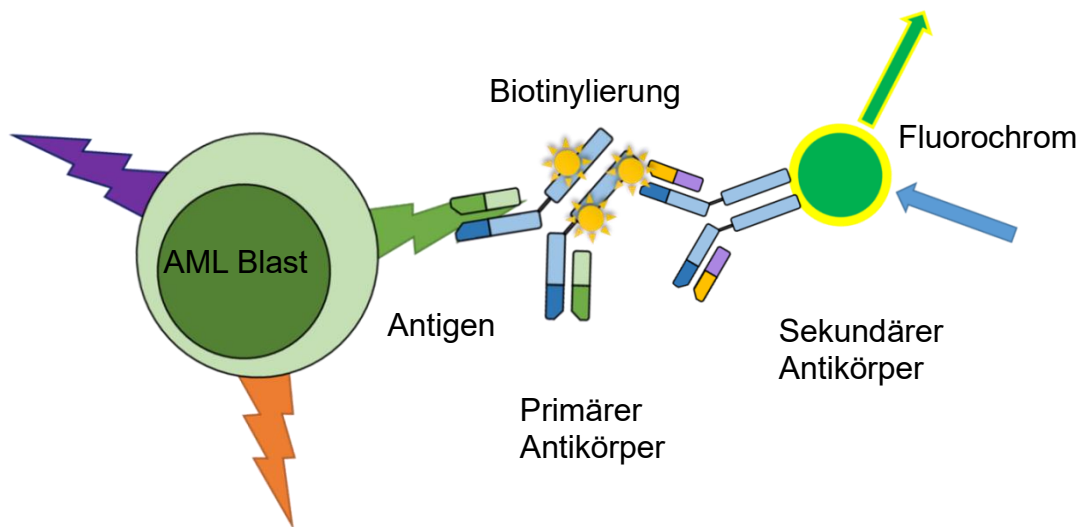


Abbildung 4: Darstellung der sekundären Färbung für die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung.

Links ist die Tumorzelle dargestellt, deren extrazelluläres Antigen (AG) von einem primären antigen-spezifischen Antikörper (AK) gebunden wird. Durch die Konjugation des primären Antikörpers mit Biotin kann ein sekundärer, Biotin-spezifischer Antikörper an diesen binden. Durch die Konjugation des sekundären Antikörpers mit einem Fluorochrom wird bei der FACS Messung das Fluorochrom mit einer bestimmten Wellenlänge (Laser) angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses emittierte Licht kann wiederum detektiert werden.

Mithilfe der Markierung der Antigene durch Antikörper (siehe Abbildung 4), können diese nachgewiesen werden. Bei der Sekundärfärbung werden die AK mit einem mit Fluorochrom konjugierten AK konjugiert. Die Elektronen der Fluorochrome absorbieren Laserlicht einer definierten Wellenlänge und erreichen somit ein höheres Energieniveau, was als Exzitation bezeichnet wird. Wenn die Elektronen auf ihr niedrigeres Energieniveau zurückkehren, emittieren sie Licht mit einer größeren Wellenlänge, das dann vom Durchflusszytometer detektiert wird.

Da die Zellen nicht nur aufgrund einer Antikörperbindung Fluoreszenz zeigen, sondern auch einen geringen Anteil Autofluoreszenz aufweisen, werden sowohl eine ungefärbte Probe als auch eine Isotypkontrolle, zur Ermittlung der Fluoreszenz des mit FITC markierten Sekundärantikörpers benötigt. Die Isotyp Kontrolle enthält die Zellsuspension und den an Biotin bindenden FITC Antikörper. Anhand der Kontrollen können die Gates zur Einstellung der

Fluoreszenz-Messung gesetzt werden. Mithilfe der Durchflusszytometrie kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob bestimmte Antigene exprimiert werden. Die ermittelten Antigene können in weiterführenden Versuchen als Angriffspunkte für Adaptermoleküle dienen.

Tabelle 10: Fluorochrome und Einstellungen des Zytometers.

Fluorochrom	Extitation_{max}	Laser	Langpassfilter	Bandpassfilter	Detektion
APC	650nm	633nm	keiner	670/30nm	660nm
APC vio770	652nm	561nm	750nm	780/60nm	775nm
BUV395	348nm	355nm	keiner	379/28nm	395nm
eFluor780	633nm	633nm	755nm	780/60nm	780nm
FITC	495nm	488nm	505nm	525/50nm	519nm

Die Auswertung der Immunphänotypisierung mittels sekundärer FACS Färbung erfolgte mit den Programmen FacsDiva, FlowJo und Excel. Dafür musste zuerst die zu analysierende Hauptpopulation markiert werden. Mithilfe eines weiteren Punktdiagramms konnten Zellen auf ihre Viabilität überprüft werden, wobei nur Zellen inkludiert wurden, die negativ für den Apoptosemarker eFluor780 waren. Um Zellaggregate in der Auswertung von den runden Einzelzellen abzugrenzen, wurden die Parameter FSC-A und FSC-H gegeneinander aufgetragen. Diese bestimmen die Zellgröße und sind bei runden Einzelzellen zueinander proportional. Bei den noch inkludierten Zellen der ursprünglichen Hauptpopulation wurde deren Emission bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert und die Intensität der spezifischen Antigenfärbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle verglichen. Um den Intensitätsunterschied besser darstellen zu können, wurde die Antigenexpression in Prozent (Overton Positivität in %) und in Form der MFIR (= Mean Fluorescence Intensity Ratio) dargestellt.

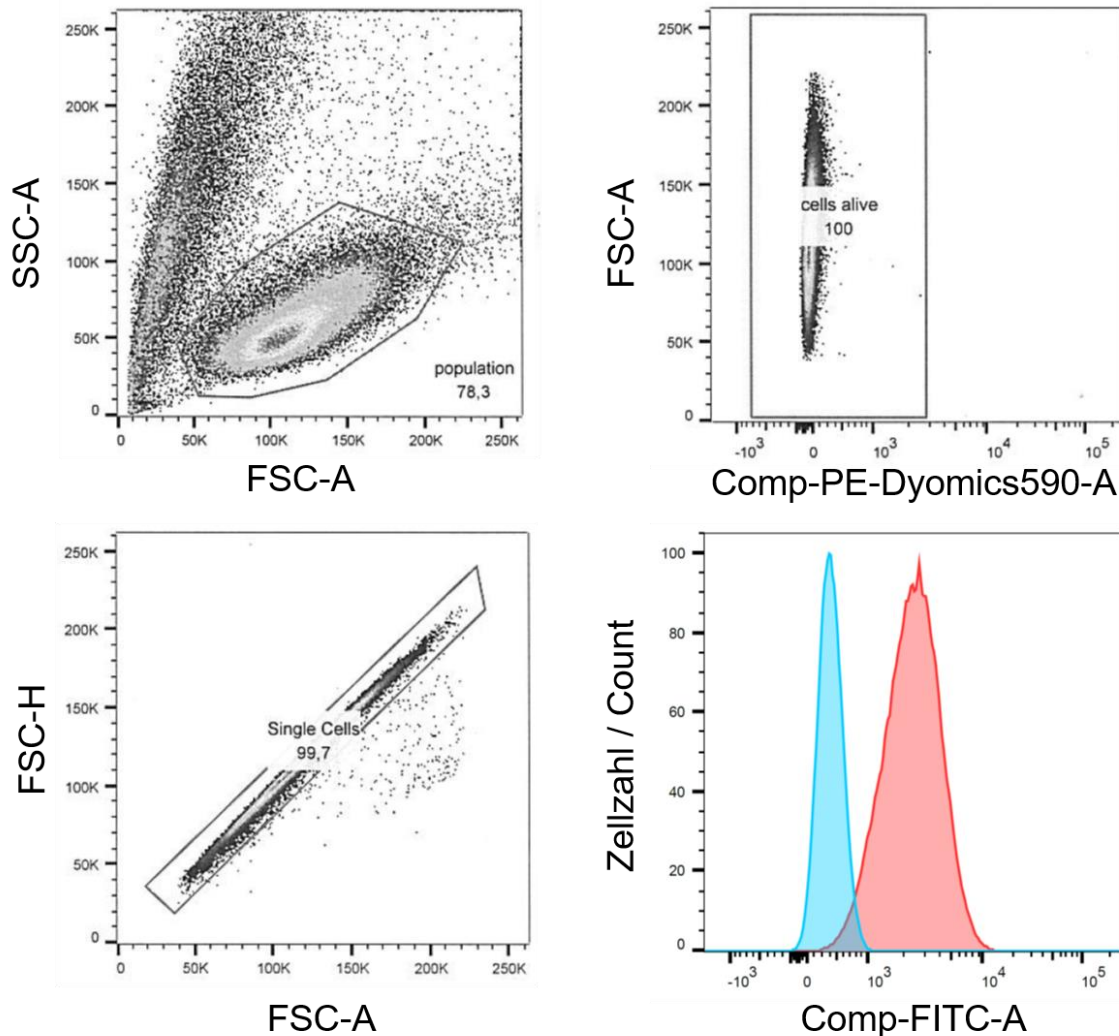


Abbildung 5: Gating-Strategie.

Exemplarische Darstellung der Gating Strategie für die Immunphänotypisierung mittels sekundärer FACS Färbung anhand der AML Tumorzelllinie U937 und dem Antigen CD14. In Bild A sind die gesamten Zellen, unabhängig ihrer Viabilität, dargestellt. Die toten Zellen wurden mithilfe einer Viabilitätsfärbung mittels Propidiumiodid identifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Bild B). In Bild C wurden Zellaggregate (Cluster) o.Ä. aus dem Gating ausgeschlossen und nur die Einzelzellen für die weitere Analyse verwendet. In Bild D ist die Messung der Antigenpositivität dargestellt. Der linke Peak entspricht hierbei der Isotyp Kontrolle und der rechte Peak der Antigenexpression in Prozent.

2.7 Durchflusszytometrische Zellsortierung der mCherry-Luciferase positiven Zellen

Die durchflusszytometrische Zellsortierung der mCherry-Luciferase positiven Zellen entspricht weitestgehend dem gleichen Prinzip wie die Durchflusszytometrie in Kapitel 3.6. Dabei kann eine gewünschte Zellpopulation

aus einer Zellsuspension detektiert und für die weitere Verarbeitung isoliert werden. Für die Messung wird der FACSAria II Cell Sorter verwendet. Mit diesem können bis zu vier verschiedene Zellpopulationen aus einer Suspension gleichzeitig gewonnen werden. Nach der hydrodynamischen Fokussierung und Messung der Zellen kann die gewünschte Zellpopulation markiert. Die beschleunigten Zellen passieren anschließend einen sogenannten Abrisspunkt, an welchem der Flüssigkeitsstrahl unter Einfluss eines Schwingungsgebers in Einzeltröpfchen abbricht. In jedem dieser Einzeltröpfchen befindet sich nun eine einzelne Zelle. Soll diese bestimmte Zelle isoliert werden, wird der Einzeltröpfchen vor Abreißen des Strahls mit einer elektrischen Ladung versehen, welche dazu führt, dass der geladene Tröpfchen bei Passieren eines elektrischen Feldes in Richtung des Auffangröhrchens abgelenkt und dadurch isoliert wird.

2.8 Luciferase-basierte Zytotoxizitätstests mit humanen AML Zelllinien

Bei den Zytotoxizitätstests werden Tumorzellen (Zielzellen) über einen bestimmten Zeitraum mit den Effektorzellen, welche die Zelllyse vermitteln, inkubiert. Der Anteil an lebenden Zellen wird hierbei mit dem einer Kontrollpopulation ins Verhältnis gesetzt. Ziel der Zytotoxizitätstests war es, die durch AdCAR-T-Zellen ermittelte Lyse der Zielzellen zu quantifizieren. Mittels Kontrollgruppen konnte die unspezifische Wirkung der Effektoren auf die Tumorzellen ermittelt und dementsprechend verrechnet werden. Die unspezifischen Wirkungen können durch unspezifische Lyse oder Wachstumshemmung (bspw. durch Nährstoffkarenz oder Zytokinproduktion) zustande kommen.

Die Methode basiert auf Biolumineszenz, mit welcher die Zellviabilität gemessen werden kann. Die Zielzellen exprimieren nach Transduktion das Enzym Luciferase. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Luziferin mit O_2 zu Oxyluziferin und Biolumineszenz. Oxyluziferin befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand und gibt bei der Rückkehr in den ursprünglichen Zustand ein Photon ab. Für diesen Vorgang wird ATP als Energielieferant benötigt, welches lediglich in lebenden Zellen präsent ist. Das emittierte Licht

(=Biolumineszenz) wird durch hoch sensitive Kameras mithilfe des Victor Messgeräts detektiert. Die Intensität des detektierten Lichts ist proportional zur Menge an lebenden Zellen. Um den Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und der Anzahl lebender Zellen unter Berücksichtigung des individuellen Wachstums der unterschiedlichen Zelllinien zeigen zu können, wird eine Titrationskontrolle (100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% der Gesamtzellzahl) benötigt, welche die absolute Anzahl an viablen Zellen zu jedem Zeitpunkt zeigt. Die Reihen 1, 8 und 12 der 96 KV Platte enthielten weitere Kontrollen mit 100% der Gesamtzellzahl zur Messung verschiedener Einflüsse, wie Abkühlung und Alkalisierung des Mediums auf die Lichtintensität während der Messung im Victor Messgerät. Die 96 KV Platten wurden jeweils nach 12 und 24 Stunden Inkubation gemessen. Dazwischen wurden die 96KV Platten im Inkubator kultiviert. Die Messzeit pro Kavität betrug ca. 1 Sekunde. Die ermittelten Zählheiten wurden grafisch in einer Excel Tabelle dargestellt und in Werte, welche die Zellviabilität darstellen umgerechnet. Die Umrechnung erfolgte anhand einer linearen Funktion durch die Messpunkte der Reihe 1 und 12 (entsprechen 100 % der Gesamtzellzahl), d.h. einer Eichgerade, wodurch die Lichtintensität sowohl insgesamt, als auch innerhalb der einzelnen Messschritte ermittelt werden konnte. Die hierbei ermittelte Veränderung der Lichtintensität konnte aus den einzelnen Messwerten herausgerechnet werden und den dadurch korrigierten Werten der Lichtintensität eine relative Zellviabilität zugeordnet werden. Die spezifische Lyse wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\left(1 - \left(\frac{\text{Viabilität Adapter [\%]}}{\text{Viabilität Isotyp [\%]}}\right)\right) \times 100 = \text{spezifische Lyse [\%]} .$$

Zur grafischen Darstellung mussten die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Lysewerte mithilfe GraphPad Prism 7.3 berechnet werden.

2.9 Herstellung der Adapter CAR-T-Zellen

Die Herstellung der Adapter-CAR-T-Zellen erfolgte, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, in mehreren Schritten. Die Dauer der Herstellung betrug ca. 1 Woche, wobei die Zytotoxizitätstests erst nach Expansion der AdCAR-T-Zellen stattfinden konnten. Die Expansionsdauer betrug im Durchschnitt weitere 7-14 Tage.

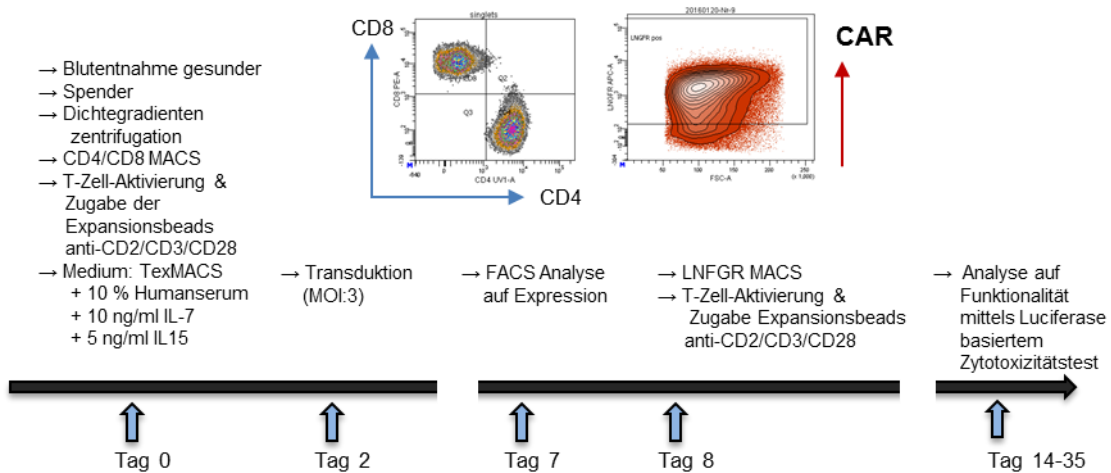


Abbildung 6: Herstellung der AdCAR-T-Zellen.

Einzelne Schritte der AdCAR-T-Zell-Herstellung anhand einer Zeitachse in Tagen dargestellt. Beginnend mit der Blutentnahme von gesunden Spendern, Dichtegradientenzentrifugation und Gewinnung der T-Zellen an Tag 0. Anschließende Transduktion und Expressions-FACS in der ersten Woche. An Tag 8 LNFR MACS und Expansion der AdCARs. Ab Tag 9 Expansion der AdCARs.

2.9.1 Dichtegradientenzentrifugation der peripheren Vollblutproben von gesunden Probanden

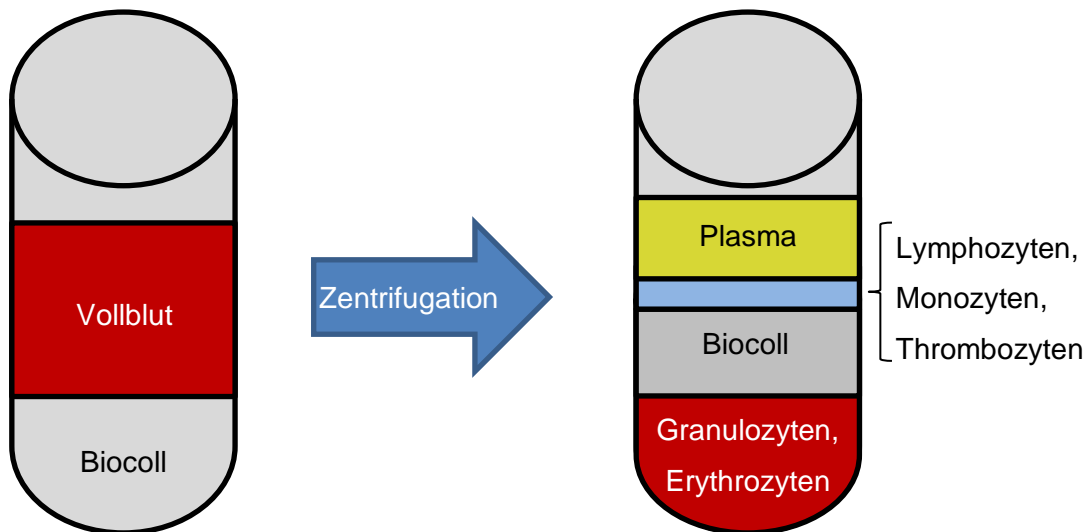


Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation der peripheren Vollblutproben zur Isolation der T-Zellen.

Links: Vollblut mit Biocoll im 50 ml Falcon vor der Zentrifugation. Rechts: Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile anhand ihrer Dichte nach Zentrifugation.

Die bei dieser Arbeit verwendeten T-Zellen wurden aus peripheren Vollblutproben aus Venen der Ellenbeuge gesunder Spender gewonnen. Zur Verhinderung der Gerinnung des entnommenen Blutes wurden pro 10ml Vollblut 100µl Natrium-Heparin (Na⁺-Heparin) zugegeben.

Tabelle 11: Reagenzien zur Vollblutaufbereitung.

Na ⁺ -Heparin-25000-Ratiopharm	Ratiopharm
PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline/Kochsalzlösung)	PAA Laboratories
Biocoll Separating Solution	Biochrom

Die Isolation mononukleärer Zellen aus heparinisierem Vollblut erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll-Solution basierend auf dem Verfahren von Bøyum (Protokoll im Anhang) (Bøyum 1968). Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutbestandteile können diese voneinander separiert werden. Ein in der Biocoll Lösung enthaltenes Copolymer (mit einer Dichte von 1,077 g/ml) fungiert während der Zentrifugation als Filter. Blutbestandteile

(Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten = PBMC) mit einer niedrigeren Dichte (1,077 – 1,084 g/ml) als das Copolymer, sammeln sich als trüber Ring oberhalb der Copolymerphase an. Dieser Ring kann mithilfe einer Pipette isoliert werden. Da Erythrozyten (nach Aggregatformierung bei Raumtemperatur kommt es zu einer schnelleren Sedimentation dieser) und Granulozyten eine höhere Dichte als 1,077 g/ml haben, passieren diese Zellen das Copolymer und Akkumulieren am Boden des Falcons. Nachdem die PBMC isoliert und gewaschen wurden kann mit der T-Zell Isolation begonnen werden.

2.9.2 MACS mit CD4⁺/CD8⁺ Beads zur Gewinnung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die Entwicklung und erstmalige Beschreibung des Prinzips der magnetisch aktivierten Zellsortierung erfolgte durch Stefan Miltenyi. Die Anreicherung der T-Zellen mit CD4⁺/CD8⁺ Beads wurde gemäß SOP der FA Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Zellsuspension wird mit MicroBeads (50nm große magnetische Partikel mit Eisenoxid und einem Mantel aus Polysaccharidschichten), welche Antikörper binden und gegen diverse Oberflächenproteine gerichtet sind, inkubiert. Spezifische Oberflächenproteine können somit gebunden und die gewünschte Zellpopulation isoliert werden. Die markierten Zellen werden durch ein die Auftrennungssäule umgebendes magnetisches Feld vor dem kompletten Durchfluss bewahrt. Unmarkierte Zellen werden nach Durchfluss der Zellsuspension durch die Säule in einem 50 ml Falcon aufgefangen, während markierte Zellen in der Säule verbleiben. Nach Entfernung des magnetischen Feldes können diese Zellen in einem neuen 50 ml Falcon aufgefangen werden. Wenige Tage später bauen sich die MicroBeads biologisch ab. Für die Prozedur der T-Zell-Isolation werden zuerst CD4⁺ und CD8⁺ verwendet. Dabei beträgt die Menge an CD4⁺ Helferzellen ca. 27-57% der Lymphozyten im adulten Blut. Sie erkennen fremde Zellen und Erreger und aktivieren unter Teilung anderer Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise B-Zellen. Typ 1 Helferzellen (T_H1) spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Immunantwort, während T_H2 wichtig für die humorale Zellantwort und die Zytokinproduktion sind. CD8⁺ zytotoxische Killerzellen (Teil der regulatorischen T-Zellen) töten endogen infizierte Zellen ab. Für die Aktivierung von T-Zellen wird neben CD28 auch der CD3-Komplex

benötigt, da dieser das Aktivierungssignal vom T-Zell-Rezeptor nach intrazellulär vermittelt. Nach der Isolation und Transduktion des CAR-T-Zell Konstrukts in die CD4 und CD8 positiven T-Zellen (im Verhältnis 1:1), müssen diese in einem weiteren, zweiten Schritt mit anti-LNGFR magnetischen Partikeln ein weiteres Mal sortiert und isoliert werden.

2.9.3 HEK293T – Zellen für die Manufaktur der Lentiviren

Etabliert wurde die HEK293T - Zelllinie bereits 1970 und stammt, wie ihr Name verrät, aus primären embryonalen Nierenzellen (HEK = human embryonic kidney cells). Die HEK-Zellen wurden durch Bestandteile eines humanen Adenovirus (Adenovirus 5) transformiert und dadurch immortalisiert. Sie wurden als Wirtszellen für die Herstellung der lentiviralen Vektoren genutzt, aufgrund der Eigenschaft einfach kultivierbar und transfizierbar zu sein.

2.9.4 Prinzip der Lentivirenherstellung und Ernte der Viren

Für die Herstellung der AdCAR T-Zellen wurden lentivirale Vektoren (zweite Generation), Grafik in der Einleitung, zur stabilen Integration des AdCAR Konstruktes in das Genom der T-Zellen verwendet. Von Nutzen ist hierbei die Eigenschaft, dass die Integration unabhängig von Zellzyklusphasen erfolgt und die Lentiviren nach Integration nicht mehr replizieren. Zur Herstellung der Vektoren wurde die Zelllinie HEK293T verwendet. Mittels Integration des gewünschten Gens in ein Transferplasmid und der Zugabe der Helferplasmide A und B, kann der das benötigte Gen tragende Lentivirus in die HEK293T Zellen transfiziert werden. Die Helferplasmide codieren zum einen für das Protein VSV-G, ein Fusionsprotein zur Verschmelzung der viralen Hülle mit der Membran der Wirtszelle (= envelope Plasmid) und zum anderen für verschiedene lentivirale *packaging* Plasmide (Gag, ol, Rev und Tat). Die Anforderung an einen viralen Vektor, beispielsweise Stabilität, geringe Zyto- oder Genotoxizität und hohe Spezifität, sind durch die Verwendung der lentiviralen Vektoren gegeben. Das Transferplasmid wird nach Transfektion in die HEK293T Zelle vervielfältigt. Für die endgültige Proteinbiosynthese werden zusätzlich die Helferplasmide abgelesen und die lentiviralen Partikel, in welchen sich das Erbgut des ausgewählten Gens befindet, werden intrazellulär gebildet.

Für die Transfektion (siehe Protokoll im Anhang) wurden die kryokonservierten HEK293T Zellen einen Tag vorher aufgetaut und in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät. Dabei wurden pro Zellkulturflasche $1,5 \cdot 10^7$ Zellen in 20ml Stammzelllösung (ohne P/S Zusatz) aufgenommen. Die HEK293T Zellen wurden bis zum Zeitpunkt der Transfektion im Brutschrank inkubiert und wiesen, unmittelbar vor dieser, ein konfluentes Wachstum von ca. 60% auf. Die zu transfizierenden Plasmide (Transfer- und Helferplasmide) wurden durch Zugabe von Lipofectamin in Vesikel, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, gepackt. Zur Herstellung der Lipiddoppelschicht um die Plasmide wurden diese, nach Entfernung des alten Kulturmediums, mit dem Lipofectamin nach Herstellerprotokoll gemischt. Das umgebende Medium, bestehend aus Opti-MEM und DMEM muss hierfür frei von Serum oder Antibiotikazusatz sein. Die Lipofectaminvesikel verschmelzen mit der Zellmembran der HEK293T Zellen und die Plasmide werden aufgenommen. Um die transfizierten HEK293T Zellen optimal mit Nährstoffen zu versorgen, wurde pro Flasche 2ml (10%) *h.i.* FCS hinzugegeben. Die Zugabe erfolgte nach 6 h Inkubation im Brutschrank.

Die Virusernte fand 24 und 48 h nach Transfektion statt. Dafür wurde das gesamte Kulturmedium entfernt und durch 50ml Stammzelllösung (ohne P/S) ersetzt. Die nachfolgenden Schritte der Virusernte fanden, zur Schonung der Viren, auf Eis statt. Um Zellreste zu entfernen, wurden die Überstände der transfizierten HEK293T Zellkulturen in 50ml Falcons bei 4°C, 500g und für 10 min zentrifugiert. Nach Herstellerprotokoll wurden die Zellen anschließend mit dem LentiX-Concentrator gemischt und inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation auf Programm 8 konnte der Überstand verworfen und die Viren in PBS resuspendiert werden. Die Virustiter wurden durch Zentrifugation ungefähr 100-fach aufkonzentriert. Die Aliquots für die Kryokonservierung enthielten jeweils 100µl der Virussuspension.

2.9.5 Transduktion und Expression des Adapter CAR-T-Zellen Systems in T-Zellen mittels Lentiviren

Für die Expansion der T-Zellen ist eine Stimulation durch Antigenkontakt erforderlich. Demnach wurden die T-Zellen an Tag 0, d.h. nach Isolation aus dem

peripheren Blut, mit der Stammlösung (Kapitel 3.1.3, Stammlösung 2.) inkubiert. Durch die Bindung des T-Zell Co-Rezeptors CD28 erfolgte die Stimulation und somit die Aktivierung der T-Zellen. Die lentiviralen Vektoren wurden an Tag 1 hinzugegeben, welche die T-Zellen mit dem Virus, welches das benötigten Erbmateriale enthält, infizierten. Als Kontrolle wurden MOCK-T-Zellen (engl. für „Schein“) entsprechend den infizierten Zellen behandelt. Sie wurden jedoch nicht mit Lentiviren transduziert und dienen als Kontrollzellen für die darauffolgenden durchflusszytometrischen Färbungen. An Tag 2, d.h. 48 h nach Isolation der Zellen aus dem peripheren Blut, wurde das Medium gewechselt, um die stimulierenden Antikörper zu entfernen. Das Medium wurde ab diesem Zeitpunkt alle zwei Tage verdoppelt, um die Expansion der Zellpopulationen zu gewährleisten. Zur Ermittlung der Transduktionseffizienz erfolgte eine Bestimmung der LNGFR positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie. Das Gen für LNGFR sitzt auf dem Vektor. Demnach wird der „low-affinity nerv growth factor receptor“ (= LNGFR) nur von den erfolgreich transduzierten CAR-T-Zellen co-exprimiert und nicht von herkömmlichen T-Zellen. Als Kontrolle dienten hierfür die analog behandelten MOCK T-Zellen. Es wurden jeweils $0,25 \cdot 10^6$ MOCK T-Zellen, bzw. CAR-T-Zellen, in 50 µl MACS Puffer je 15 min mit einem Master-Mix aus:

- 3 µl anti-CD4 BUV395
- 5 µl anti-CD8 APCvio770
- 5 µl anti-LNGFR FITC

Antikörpern inkubiert. Die LNGFR-Expression ist demnach spezifisch für transduzierte Zellen und deren Frequenz gibt Auskunft über die Transduktionseffizienz. Die mittels Durchflusszytometrie gemessene Intensität der beiden Populationen (MOCK T-Zellen und CAR-T-Zellen) wurde miteinander verglichen, um den LNGFR positiven Anteil der Zellen, d.h. die CAR-T-Zellen zu ermitteln. Zusätzlich wurde bei der Auswertung der CD4/CD8 Quotient innerhalb der markierten Population gemessen.

2.9.6 MACS mit LNGFR-Beads zur Gewinnung der LNGFR positiven Adapter CAR-T-Zellen

Entsprechend dem Verfahren in 3.9.2 funktioniert das Prinzip der magnetisch aktivierten Zellsortierung zur Gewinnung der LNGFR positiven CAR-T-Zellen. Notwendig war die erneute Zellsortierung der CAR-T-Zellen bei einer Transduktionsrate unter 60% an Tag 7 nach T-Zell-Transduktion. Die LNGFR positiven Zellen wurden mittels anti-LNGFR-Beads (= ferromagnetische Microbeads) separiert und dadurch angereichert. Nach der erneuten Selektion war keine weitere Stimulation der LNGFR positiven CAR-T-Zellen nötig. Die Durchführung der magnetisch aktivierten Zellsortierung erfolgte, wie auch in 3.9.2, gemäß dem Herstellerprotokoll von Miltenyi Biotec.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des CAR-T-Zell Produkts

Für die AdCAR-Herstellung dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Viruschargen verwendet. Dabei war die Transduktionseffizienz abhängig von den Viruschargen und den Spendern. Um den Anteil der AdCARs innerhalb der T-Zell-Population konstant hoch zu halten, wurden diese mittels MACS positiv selektioniert. Der Prozentsatz der AdCARs wurde auf 60% normalisiert, da der Anteil der AdCARs nach MACS unabhängig vom Spender um die 60% betrug. Für die Vergleichbarkeit der Versuche untereinander wurde die Selektion durch MACS immer durchgeführt, auch wenn der AdCAR-Anteil nach Transduktion bereits über 60% lag.

Da für die Herstellung der AdCARs unterschiedliche Viruschargen mit unterschiedlichem Transduktionserfolg verwendet wurden, musste vor jeder Messung individuell eine Charakterisierung der Zellen durch die Verwendung des Prinzips der Durchflusszytometrie erfolgen. In der folgenden Abbildung ist die Transduktionseffizienz der verschiedenen Viruschargen dargestellt. Diese reicht von min. 31% bis max. 80,3%. Um den Anteil der AdCARs einer Population zu erhöhen, wurden die transduzierten Zellen mittels MACS-Verfahren positiv selektioniert. Dadurch konnte der Anteil auf bis zu 95,9% erhöht werden.

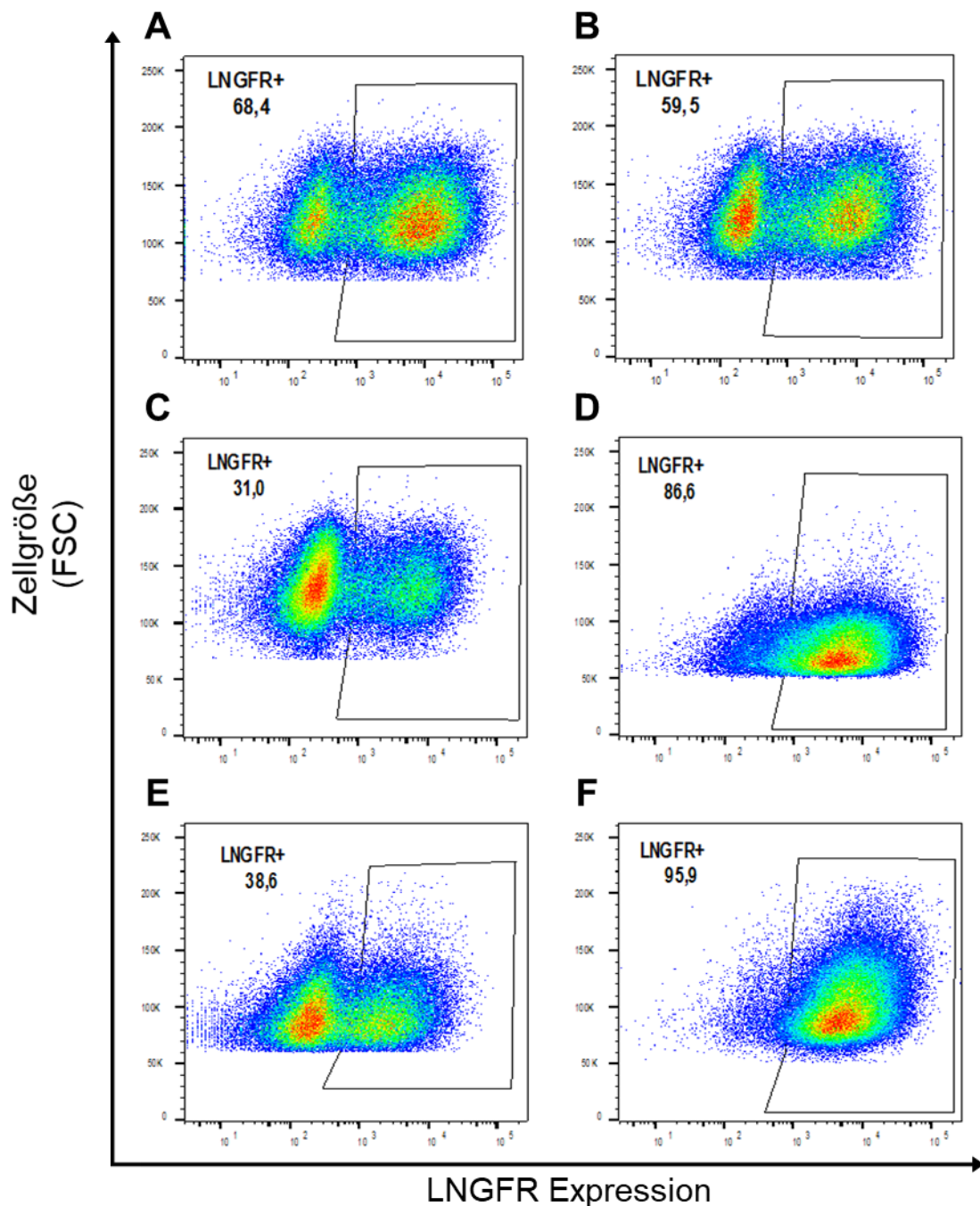


Abbildung 8: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung nach LNGFR Anfärbung.

Die Zellgröße (FSC, y-Achse) ist gegen die Positivität für den anti-LNGFR-Antikörper aufgetragen (FITC Kanal, x-Achse). Innerhalb des Gates befinden sich die LNGFR positiven Zellen, welche analog des AdCAR-Konstruktes ko-exprimiert wurden. a) Mit Ernte 1 No9 transduzierte T-Zellen von Spender D1, Tag 7. 68,4% der Population waren LNGFR positiv. b) Hinzugabe von MOCK-T-Zellen des Spenders D1, noch ca. 59,5% der Population AdCAR-T-Zellen sind positiv. c) Mit V2.E1 No9 transduzierte T-Zellen des Spenders D3, an Tag 7, mit 31% AdCAR-T-Zell Anteil. d) Die Population an Tag 10, drei Tage nach AdCAR-T-Zell Anreicherung mittels MACS. Der AdCAR-T-Zell Anteil erhöht auf 86,6%. e). Mit V2.E1 No9 transduzierte T-Zellen des Spenders D2, an Tag 7. AdCAR Anteil 38,6%. f) Die Population an Tag 10, drei Tage nach AdCAR-T-Zell

Anreicherung mittels MACS. Die AdCAR-T-Zell Erhöhung auf 95,9%. **Grafik entnommen aus (Schröder 2020)**

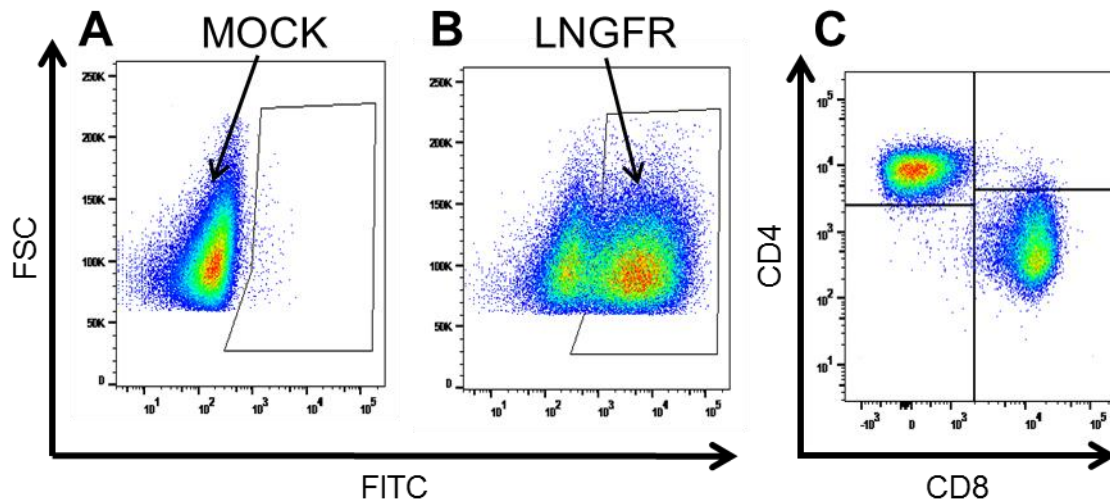


Abbildung 9: Auswertung des Transduktionserfolgs

A In dem Punktdiagramm ist die Zellgröße (FSC) auf der y-Achse gegen die LNGFR-Positivität (FITC) auf der x-Achse aufgetragen. Dabei dienen die LNGFR-negativen MOCK T-Zellen als Kontrolle. **B** Die Zellgröße ist wieder auf der y-Achse, die LNGFR-Positivität auf der x-Achse dargestellt. Im Gate sind die LNGFR-positiven Zellen, ein Antigen, welches von AdCARs koexprimiert wird, eingeschlossen. Bei diesen eingeschlossenen Zellen handelt es sich um die im Anschluss darauf von uns verwendeten AdCAR-T-Zellen. **C** Darstellung der LNGFR-positiven Zellen aus der Abbildung B. Hierbei wurde auf der y-Achse die CD4-Positivität und auf der x-Achse die CD8-Positivität dargestellt. Die CD4-positiven Zellen projizieren sich in den linken Quadranten oben, die CD8-positiven AdCAR-T-Zellen in den Quadranten rechts unten. **Grafik in Zusammenarbeit entstanden und entnommen aus (Schröder 2020).**

Für die Zytotoxizitätsversuche musste der Transduktionserfolg vorher ermittelt werden. Nachdem die AdCAR-T-Zellen an Tag 7 mittels LNGFR positiven magnetischen Beads sortiert wurden, folgte im Anschluss eine Messung der LNGFR-positiven Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie. Dabei wird der „low-affinity nerv growth factor receptor“ (LNGFR) nur von transduzierten, also AdCAR-T-Zellen, exprimiert und nicht von herkömmlichen T-Zellen. Dabei werden LNGFR und das AdCAR-Konstrukt in einem äquimolaren Verhältnis zueinander exprimiert. Somit ist die Frequenz von T-Zellen, welche das AdCAR-Konstrukt exprimieren, proportional zur Expression von LNGFR. Als Kontrolle dienten hierbei LNGFR-negative MOCK T-Zellen. Der Anteil an CD4- und CD8-positiven Zellen konnte ebenfalls ermittelt werden und ist in Abb. 9 C grafisch dargestellt.

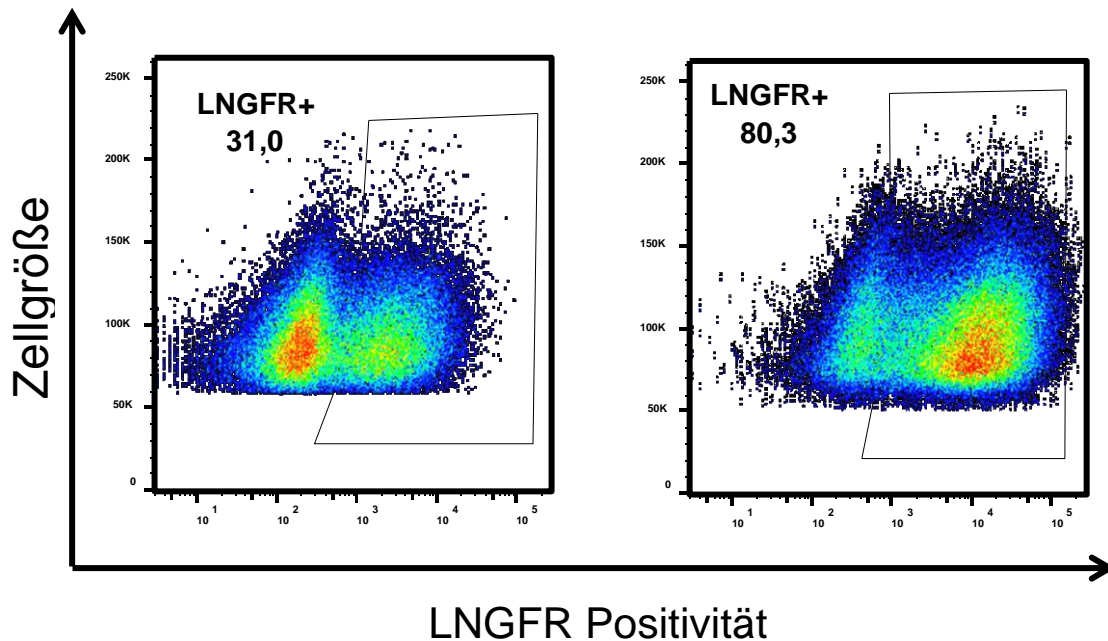


Abbildung 10: Transduktionseffizienz der beiden verwendeten Viruschargen

Auf der y-Achse wurde die Zellgröße, auf der x-Achse die LNGFR-Positivität aufgetragen. Dargestellt sind die beiden verwendeten Viruschargen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Transduktionseffizienz. **Grafik in Zusammenarbeit entstanden und entnommen aus (Schröder 2020)**

3.2 Auswahl der AML Zelllinien für die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstest

3.2.1 Herstellung der Luciferase exprimierenden Tumorzelllinien

Wie bereits im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, wurden die AML-Tumorzellen vor den Zytotoxizitätstests mit mCherry transduziert. Um den Transduktionserfolg zu messen wurde vor jedem Zytotoxizitätstest eine durchflusszytometrische Transduktionskontrolle der AML Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurde die Positivität der Tumorzellen für das Fluorochrom mCherry gemessen. Die transduzierten AML Zellen ko-exprimieren mCherry äquimolar mit dem Enzym Luciferase. Dies dient zum indirekten Nachweis der Luciferase Expression. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte Zellen verwendet. Zur Ermittlung der mCherry positiven Zellen wurde die Zellgröße (FSC-A) gegen die

Intensität der Fluoreszenz im PE-Dynamics590 Kanal aufgetragen. Die Populationen waren bei allen fünf AML Zelllinien gut voneinander abgrenzbar und die Fluoreszenzintensität konnte zwischen den beiden Gruppen (mCherry pos. vs. Kontrolle) verglichen werden. Für den Vergleich der beiden Gruppen wurde die mediane Fluoreszenzintensität Ratio (=MFIR) der transduzierten Tumorzellen ermittelt und die Differenz zur Autofluoreszenz der Kontrolle aufgezeigt. Bei den vor jedem Versuch durchgeführten Transduktionskontrollen konnte von einer ausreichenden Luciferase Expression für die Durchführung der folgenden Zytotoxizitätstests ausgegangen werden.

3.2.2 Auswahl der Antigene als mögliche Zielstrukturen des Adaptersystems

Vor Durchführung der Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests wurde mittels Durchflusszytometrie eine Immunphänotypisierung der AML Zelllinien zur Ermittlung der exprimierten Antigene durchgeführt. Die exprimierten Antigene wurden durch eine Sekundärfärbung nachgewiesen. Als Primärantikörper dienten biotinylierte Antikörper, welche in den folgenden Zytotoxizitätstests auch als Adaptermoleküle dienten. Der Sekundärantikörper war ein FITC konjugierter anti-Biotin Antikörper mit einem scFv Teil, welcher in seinem Aufbau der antigenbindenden Region des AdCAR-Konstruktes dieser Arbeit entsprach. Hypothetisch war somit nicht nur der semiquantitative Antigennachweis möglich, sondern es sollte auch möglich sein, eine qualitative Aussage über das ausgewählte Antigenepitop als potenzielles Ziel für die AdCARs zu treffen. Die Korrelation ist in Kapitel 4.3.2.2 dargestellt.

3.2.3 Primäre und sekundäre FACS Analyse der Antigen-Expression auf humanen AML-Zelllinien

Für die Auswahl der passenden Zielzellantigene für die AdCAR-T-Zellen war die Messung der Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen der AML Zelllinien notwendig. Zusätzlich musste gezeigt werden, dass die Bindung des Antikörpers zum einen direkt an sein passendes Antigen, zum anderen über einen biotinylierten Adapter an einen zweiten Antikörper, stattfinden kann. Der

Sekundärantikörper kann dementsprechend in den folgenden Luciferase-basierten-Zytotoxizitätstests durch das AdCAR Konstrukt ersetzt werden.

3.3 Normalisierte Lyse der AML-Blasten verschiedener AML-Zelllinien mittels Adapter CAR-T-Zellen

3.3.1 Auswahl AML-Zelllinien für die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests anhand des günstigsten E:T Verhältnisses

Für die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests muss das passende Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T, *engl. effector to target*) ermittelt werden, um die optimalen Rahmenbedingungen für die Bestimmung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten spezifischen Lyse der Zielzellen basierend auf deren Antigenexpression zu gewährleisten. Ein zu hohes E:T Verhältnis resultiert in der kompletten Lyse aller Zielzellen, auch in den Kontrollgruppen. Dies geschieht unabhängig davon, ob ein bestimmtes Antigen exprimiert wird oder nicht. Bei einem zu niedrigen E:T Verhältnis wiederum, wird auch bei Antigenexpression keine Lyse vermittelt. Demnach musste, um eine Antigen-spezifische Lyse zu erreichen, das passende E:T Verhältnis für jede AML Zelllinie und für jeden Spender vor den eigentlichen Zytotoxizitätstests titriert werden. Als Antigen wurde CD33 verwendet, da dieses von allen AML Zelllinien vergleichbar stark exprimiert wurde. In den Titrationen zeigte sich, dass die verschiedenen AML-Zelllinien unterschiedliche E:T Verhältnisse zur Optimierung der Versuchsbedingungen benötigten. Hierfür wurde das E:T Verhältnis ausgewählt, bei welchem die Lyse mit CD33 am höchsten, bei gleichzeitig geringster Lyse ohne CD33, war. Für die AML-Zelllinie THP-1 lag das ideale E:T Verhältnis bei 2,5:1 (siehe Abb. 11). Für die AML-Zelllinie U937 bei 1:1 (Abb. 12), für Kasumi-1 bei 10:1 (Abb. 13), für HL-60 bei 5:1 (Abb. 14) und für Molm-13 bei 0,5:1 (Abb. 15). In den folgenden Abbildungen ist die Titration für Spender D2 dargestellt. Für jeden Spender wurde die Titration insgesamt dreimal ($n = 3$) durchgeführt.

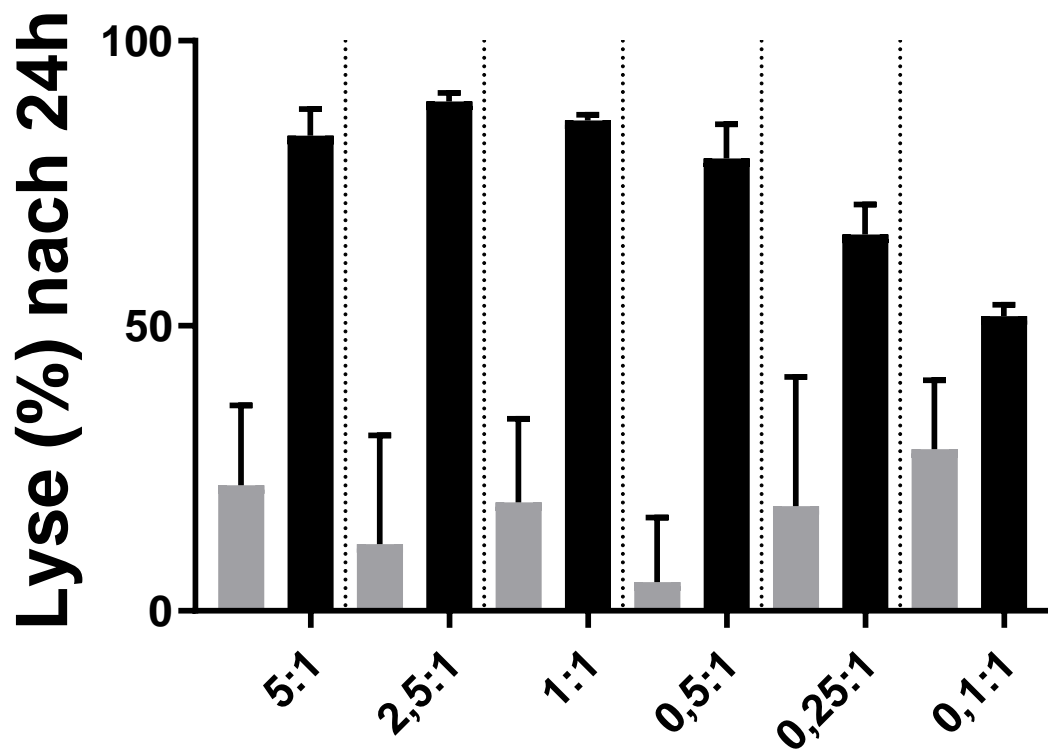


Abbildung 11: E:T Titration der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie THP-1.

Effektor zu Target Titration (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und 0,1:1) mit dem CD33 Antikörper (Konz.: 11 ng / μ l). Grau: Effektoren ohne Antikörper. Schwarz: Effektoren mit CD33 Antikörper. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. AdCAR-T-Zellen von Spender D2 (n=3). Die maximale Lyse wurde nach 24 h ermittelt.

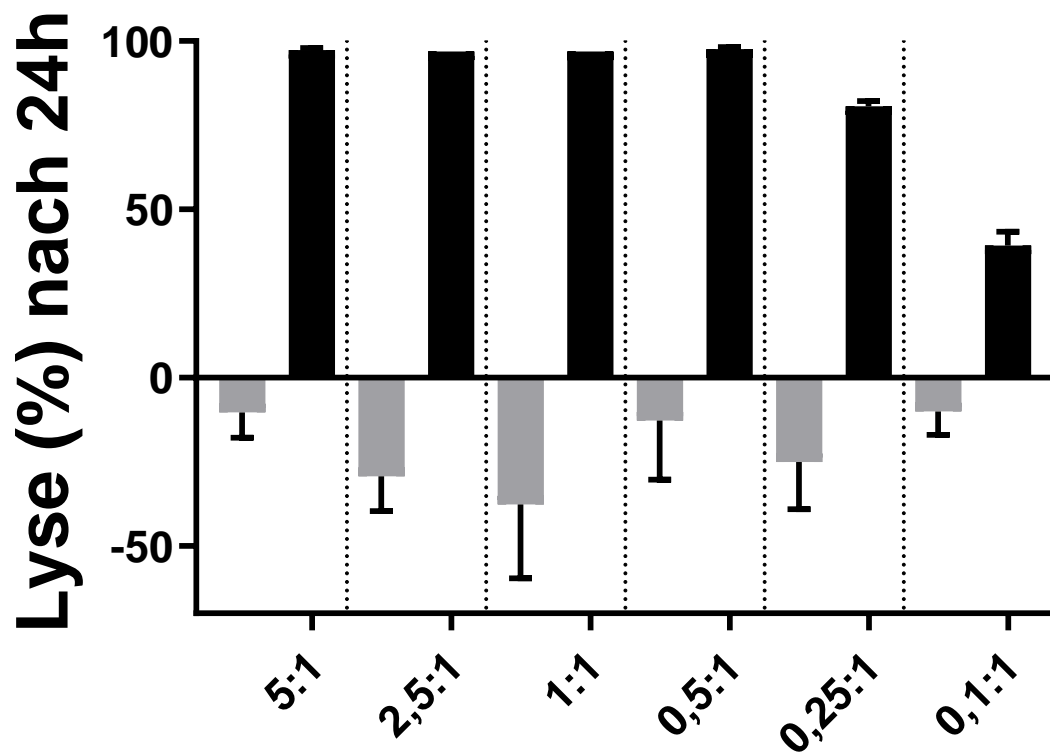


Abbildung 12: E:T Titration der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie U937.

Effektor zu Target Titration (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und 0,1:1) mit dem CD33 Antikörper (Konz.: 11 ng / μ l). Grau: Effektoren ohne Antikörper. Schwarz: Effektoren mit CD33 Antikörper. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. AdCAR-T-Zellen von Spender D2 (n=3). Die maximale Lyse wurde nach 24 h ermittelt.

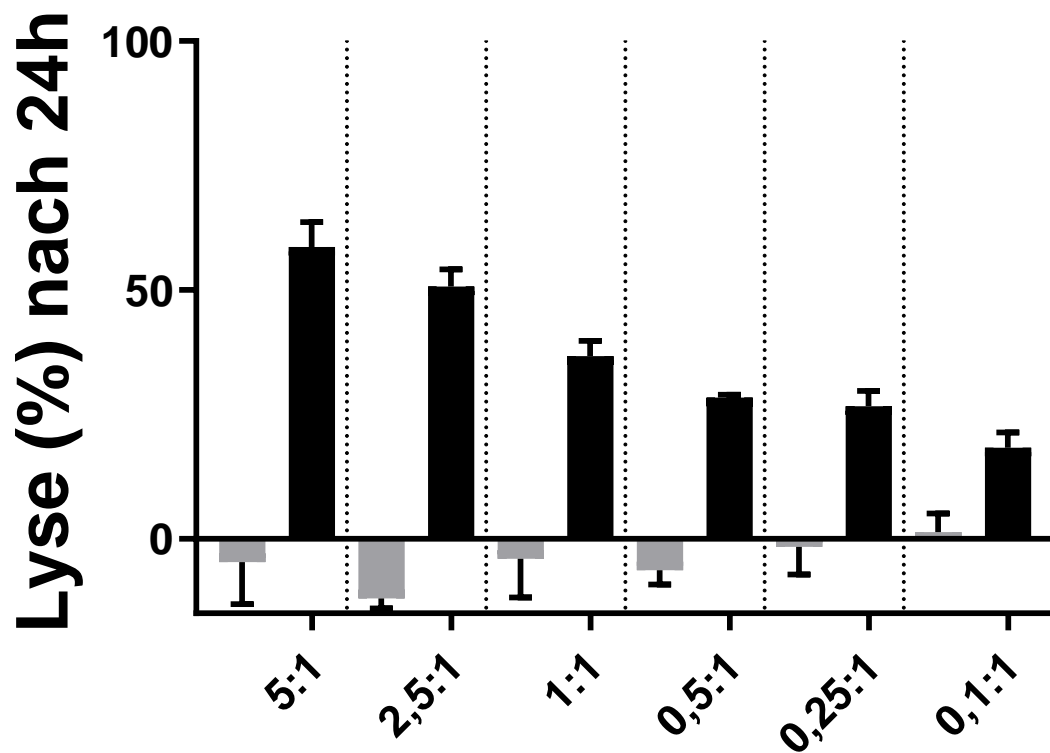


Abbildung 13: Darstellung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie Kasumi-1

Effektor zu Target Titration (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und 0,1:1) mit dem CD33 Antikörper (Konz.: 11 ng / μ l). Grau: Effektoren ohne Antikörper. Schwarz: Effektoren mit CD33 Antikörper. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. AdCAR-T-Zellen von Spender D2 (n=3). Die maximale Lyse wurde nach 24 h ermittelt.

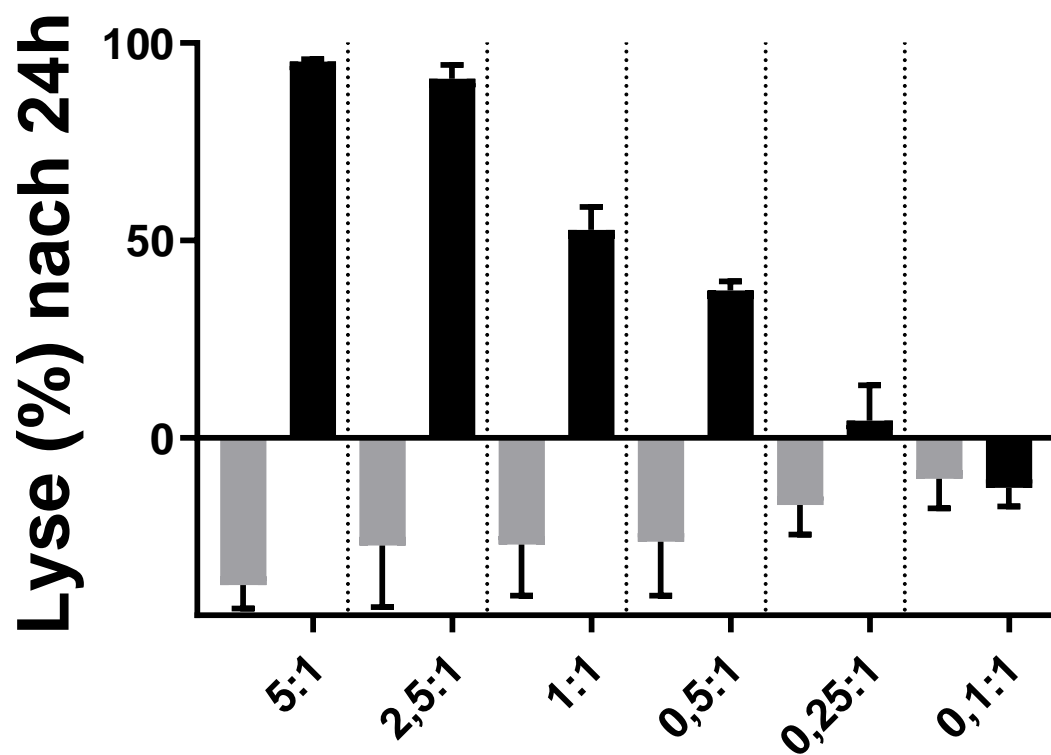


Abbildung 14: Darstellung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie HL-60

Effektor zu Target Titration (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und 0,1:1) mit dem CD33 Antikörper (Konz.: 11 ng / μ l). Grau: Effektoren ohne Antikörper. Schwarz: Effektoren mit CD33 Antikörper. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. AdCAR-T-Zellen von Spender D2 (n=3). Die maximale Lyse wurde nach 24 h ermittelt.

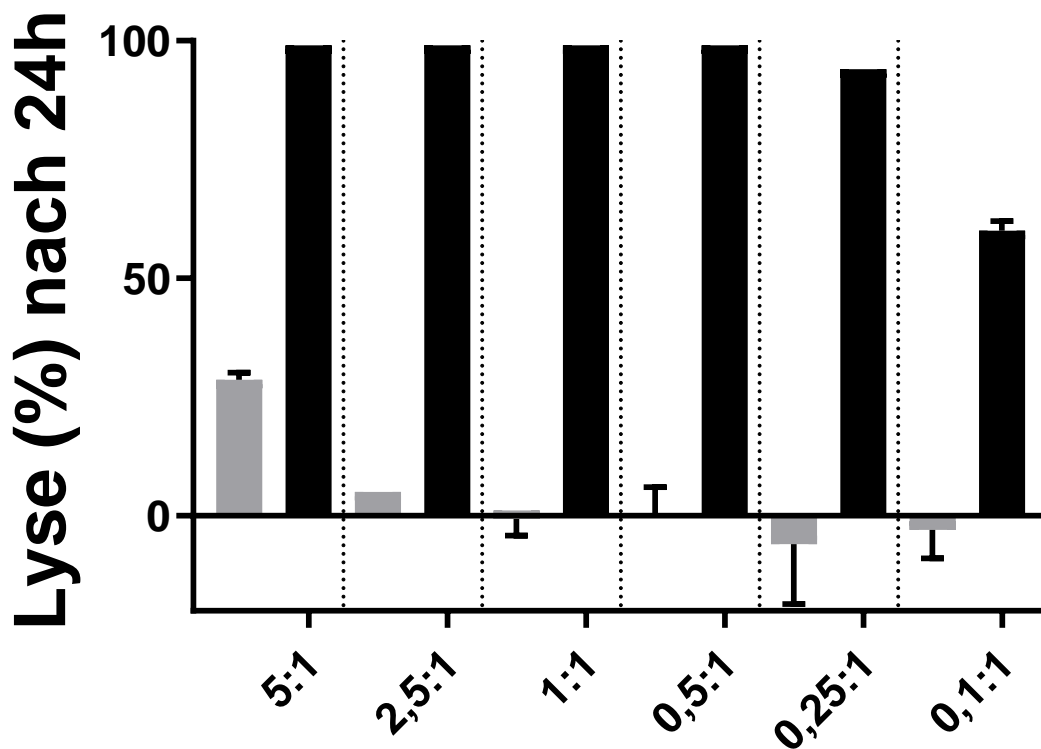


Abbildung 15 : Darstellung der durch AdCAR-T-Zellen vermittelten Lyse der AML Zelllinie Molm-13

Effektor zu Target Titration (5:1, 2,5:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1 und 0,1:1) mit dem CD33 Antikörper (Konz.: 11 ng / μ l). Grau: Effektoren ohne Antikörper. Schwarz: Effektoren mit CD33 Antikörper. Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. AdCAR-T-Zellen von Spender D2 (n=3). Die maximale Lyse wurde nach 24 h ermittelt.

3.3.2 Adapter CAR-T-Zellen Expansion basierend auf der LNGFR Positivität

3.3.2.1 Luciferase-basierte Zytotoxizitätstests mit Adapter CAR-T-Zellen gegen fünf unterschiedliche AML-Zelllinien

Mittels der Zytotoxizitätsversuche ergaben sich, unter Einsatz der Adaptermoleküle, für jedes Antigen 6 verschiedene Lysewerte (von jeder Zelllinie ein Wert pro Antigen). Diese Werte wurden für jede Zelllinie mit der Stärke der Antigenexpression verglichen und dann im Verlauf für alle Zelllinien gemeinsam in Korrelation zueinander gesetzt. In den folgenden Abbildungen ist die normalisierte spezifische Lyse nach 24 Stunden mit einem blau-grauen Balken

dargestellt. MFIR ist durch einen orangenen und die Overton Positivität durch einen grünen Balken dargestellt und reflektieren die Expression der Antigene.

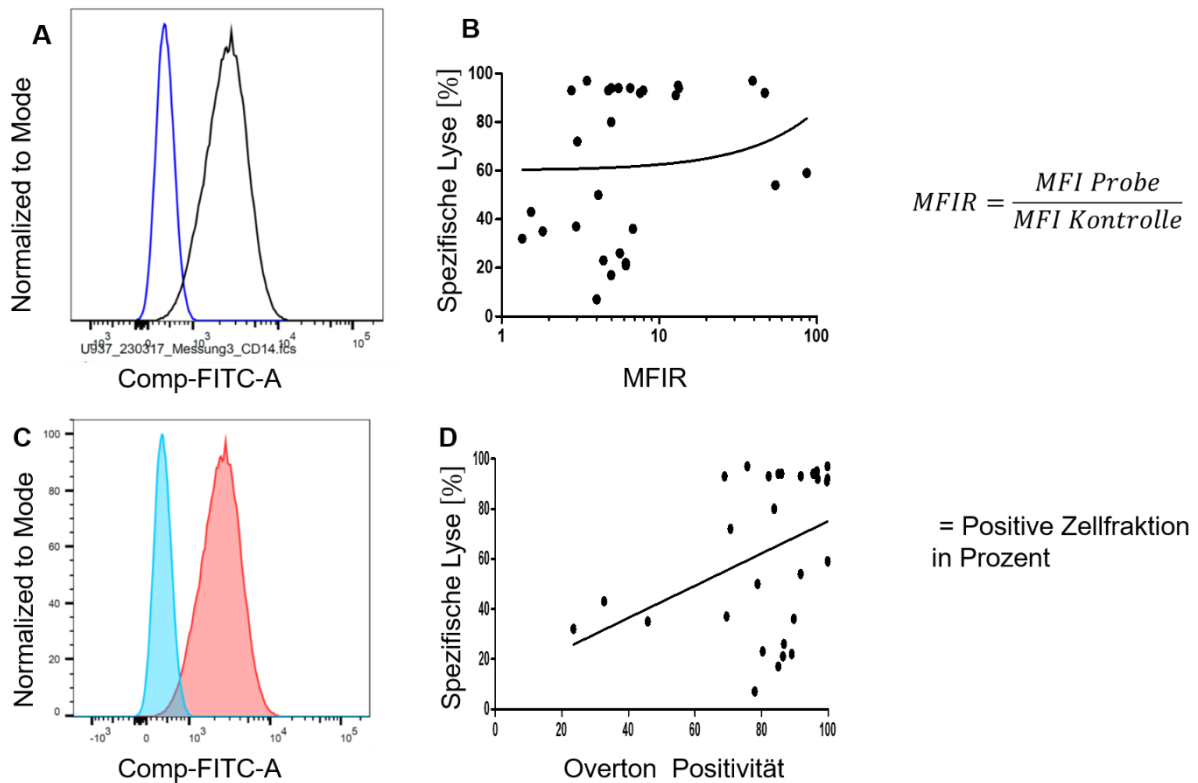


Abbildung 16: Ermittlung der MFIR und der Overton Positivität.

Beispielhafte Ermittlung der MFIR und der Overton Positivität.

A) Ermittlung der MFIR (= Mean Fluorescence Intensity Ratio) mittels FACS Analyse. Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe verglichen mit der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrolle. B) Korrelation zwischen MFIR und spezifischer Lyse. In C) dargestellt, als Fläche unter der Kurve, ist die Antigenpositive Zellfraktion in Prozent, auch Overton Positivität genannt. Diese wird ebenfalls im Anschluss an die FACS Analyse mit der Spezifischen Lyse der Tumorzellen in Korrelation gesetzt (D).

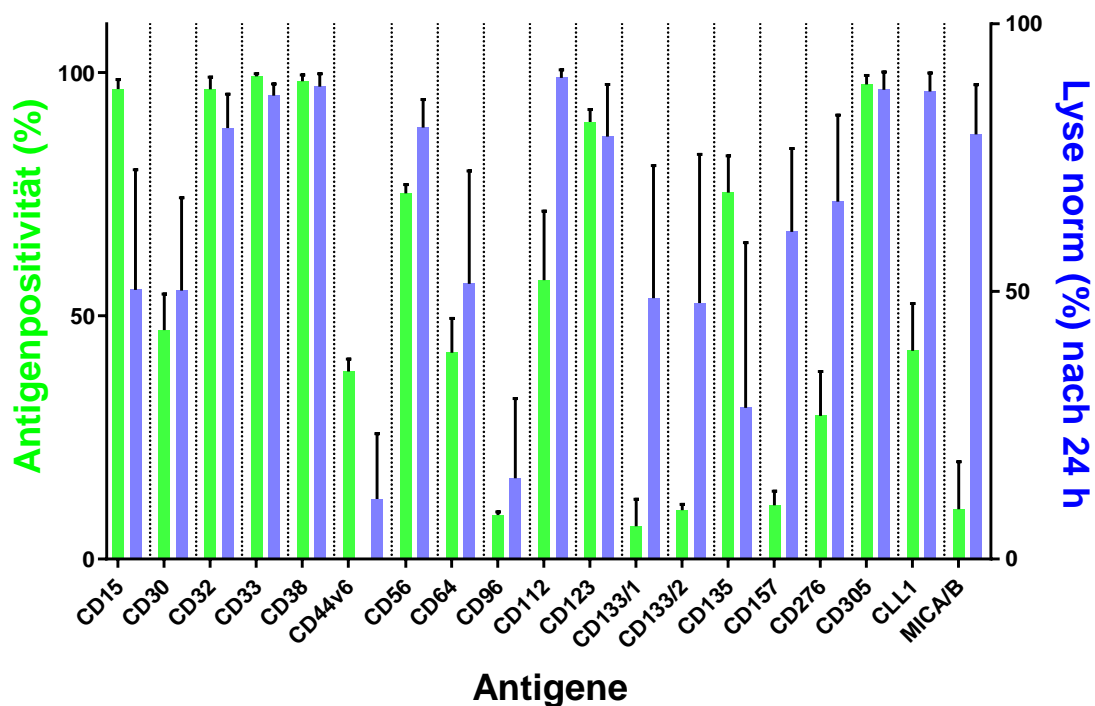


Abbildung 17: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Molm-13.

Die Antigenpositivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; grün; % Overton Positiv). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; blau; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 0,5:1.

Tabelle 12: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Molm-13. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	Antigenexpression in % (Overton%)	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	97 %	55 %
CD30	47 %	55 %
CD32	97 %	90 %
CD33	99 %	97 %
CD38	98 %	96 %
CD44v6	39 %	15 %
CD56	75 %	85 %
CD64	42 %	58 %
CD96	9 %	20 %
CD112	57 %	100 %
CD123	90 %	90 %
CD133/1	7 %	53 %
CD133/2	10 %	51 %
CD135	75 %	30 %
CD157	11 %	75 %
CD276	29 %	80 %
CD305	98 %	95 %
CLL1	43 %	94 %
MICA/B	10 %	85 %

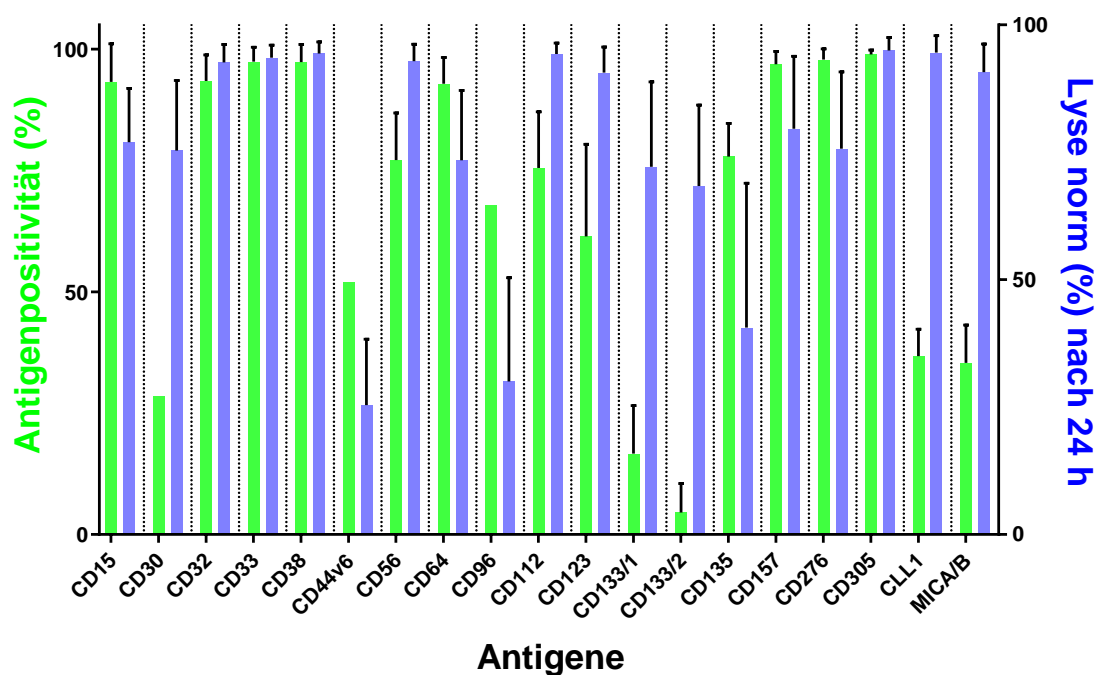


Abbildung 18: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie THP-1.

Die Antigenpositivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; grün; % Overton Positiv). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; blau; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 2,5:1.

Tabelle 13 : Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	Antigenexpression in % (Overton%)	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	93 %	82 %
CD30	29 %	80 %
CD32	93 %	98 %
CD33	97 %	99 %
CD38	97 %	100 %
CD44v6	52 %	27 %
CD56	77 %	97 %
CD64	93 %	78 %
CD96	68 %	32 %
CD112	76 %	99 %
CD123	61 %	97 %
CD133/1	17 %	80 %
CD133/2	5 %	77 %
CD135	78 %	46 %
CD157	97 %	85 %
CD276	98 %	80 %
CD305	99 %	99 %
CLL1	37 %	99 %
MICA/B	35 %	96 %

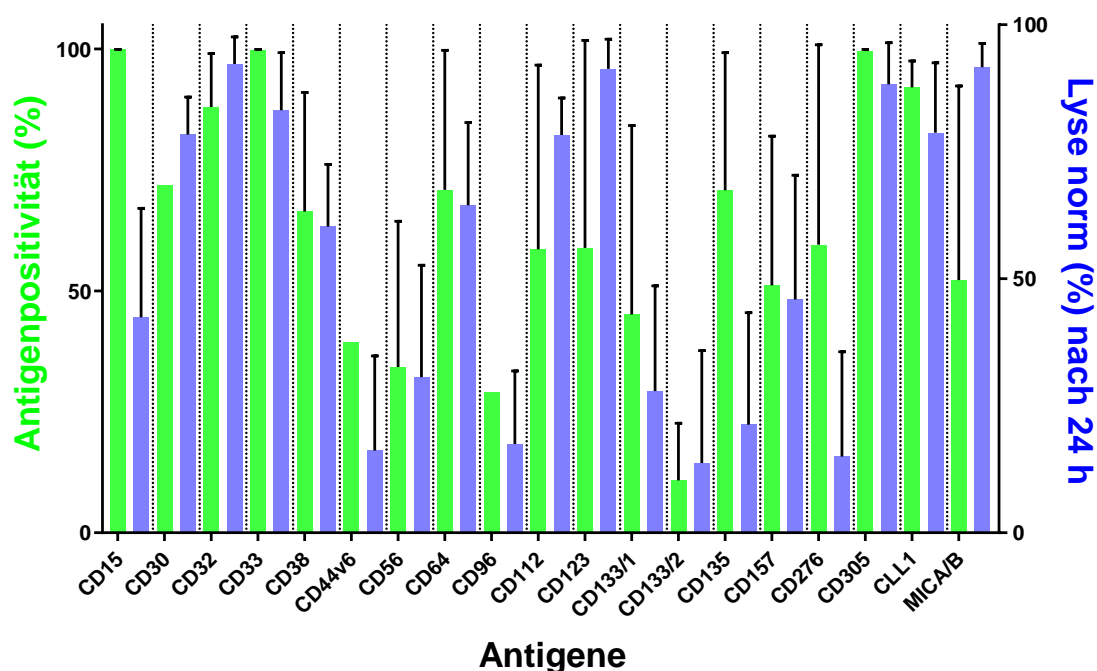


Abbildung 19: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie HL-60.

Die Antigenpositivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; grün; % Overton Positiv). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; blau; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 5:1.

Tabelle 14: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie HL-60. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	Antigenexpression in % (Overton%)	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	100 %	45 %
CD30	72 %	80 %
CD32	88 %	97 %
CD33	100 %	88 %
CD38	66 %	64 %
CD44v6	40 %	20 %
CD56	34 %	32 %
CD64	71 %	69 %
CD96	29 %	25 %
CD112	59 %	78 %
CD123	59 %	95 %
CD133/1	45 %	38 %
CD133/2	11 %	15 %
CD135	71 %	25 %
CD157	51 %	49 %
CD276	60 %	18 %
CD305	100 %	93 %
CLL1	92 %	80 %
MICA/B	52 %	97 %

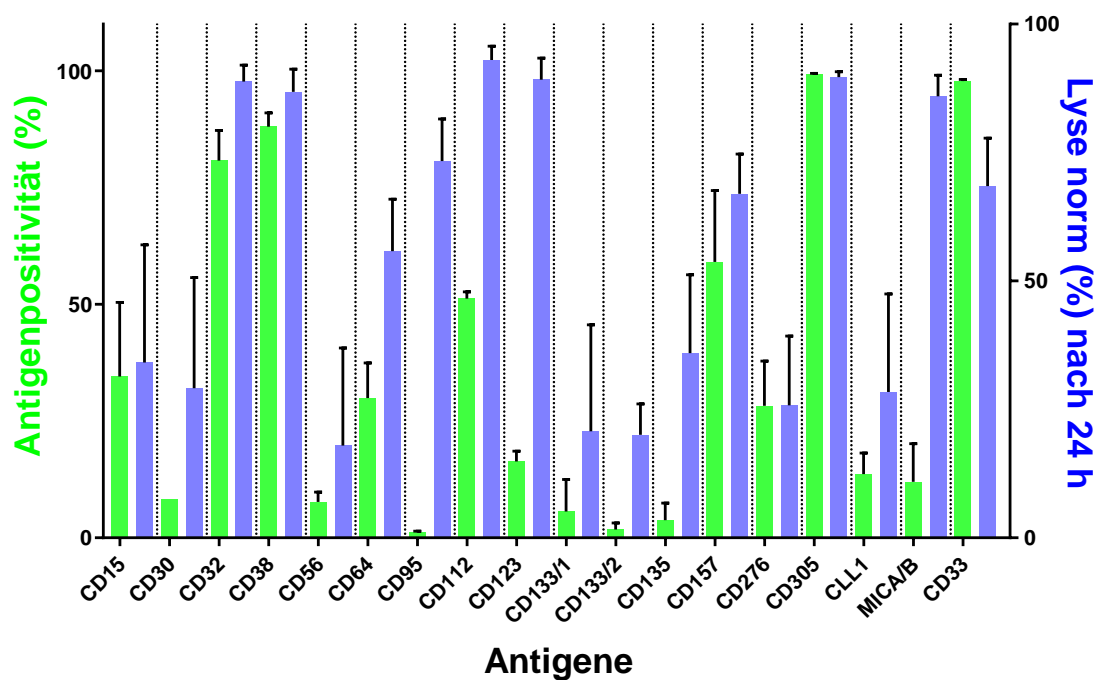


Abbildung 20: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie Kasumi-1.

Die Antigenpositivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; grün; % Overton Positiv). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; blau; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 10:1.

Tabelle 15: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie Kasumi-1- Werte gerundet auf Einer.

Antigen	Antigenexpression in % (Overton%)	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	35 %	38 %
CD30	8 %	30 %
CD32	81 %	96 %
CD33	98 %	75 %
CD38	88 %	93 %
CD56	8 %	20 %
CD64	30 %	60 %
CD112	51 %	100 %
CD123	16 %	97 %
CD133/1	6 %	25 %
CD133/2	2 %	24 %
CD135	4 %	40 %
CD157	59 %	70 %
CD276	28 %	29 %
CD305	99 %	100 %
CLL1	14 %	35 %
MICA/B	12 %	96 %

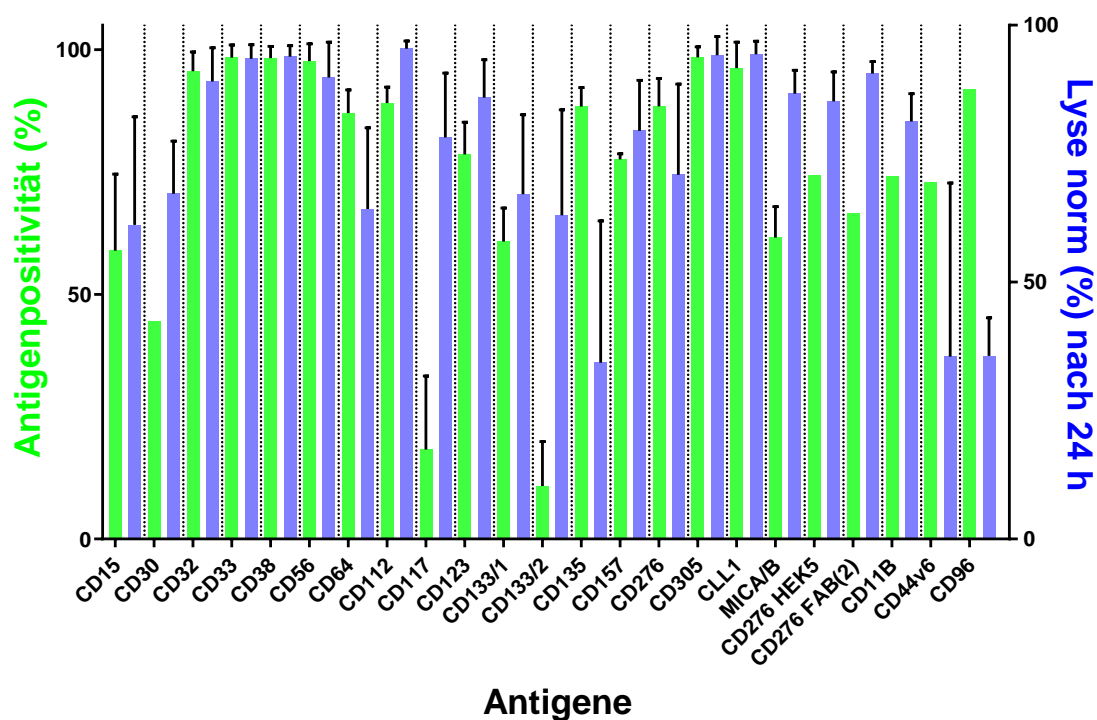


Abbildung 21: Antigenpositivität in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h der AML-Zelllinie U937.

Die Antigenpositivität wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; grün; % Overton Positiv). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; blau; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 1:1.

Tabelle 16: Antigenexpression in Prozent (Overton %) und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der AML-Zelllinie U937. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	Antigenexpression in % (Overton%)	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	59 %	63 %
CD30	45 %	70 %
CD32	96 %	91 %
CD33	98 %	98 %
CD38	98 %	98 %
CD44v6	73 %	40 %
CD56	98 %	91 %
CD64	87 %	67 %
CD96	92 %	40 %
CD112	89 %	100 %
CD123	79 %	85 %
CD133/1	61 %	72 %
CD133/2	11 %	68 %
CD135	88 %	40 %
CD157	78 %	80 %
CD276	88 %	78 %
CD305	98 %	100 %
CLL1	96 %	100 %
MICA/B	62 %	90 %

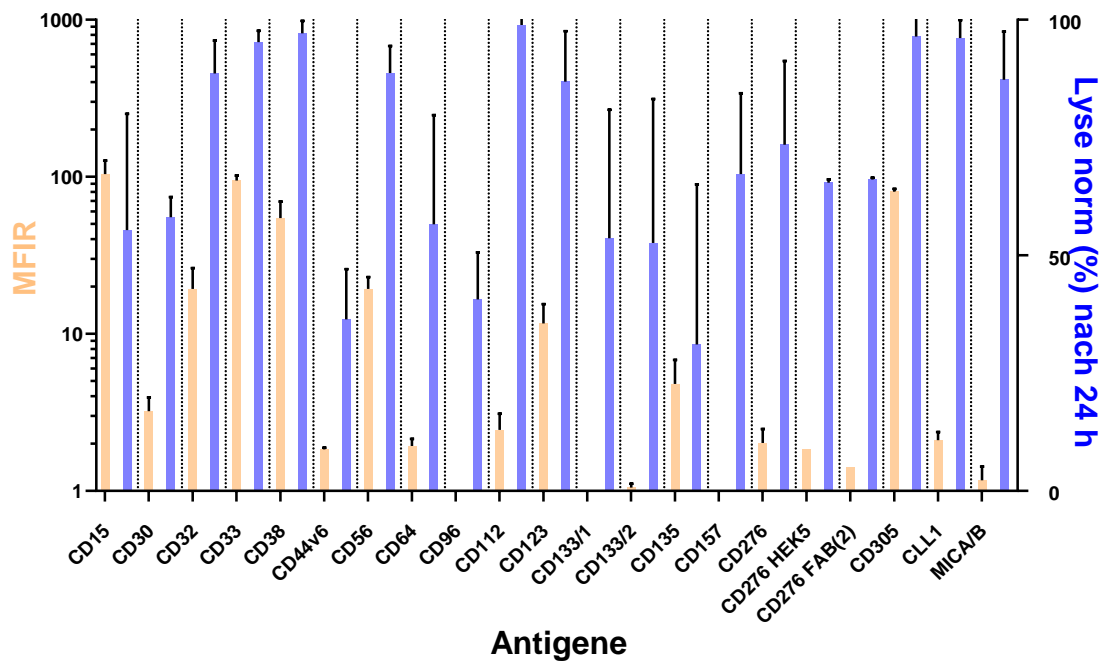


Abbildung 22: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Molm-13.

Die MFIR wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; orange; MFIR). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; violett; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 0,5:1.

Tabelle 17: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Molm-13. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	MFIR	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	104	55 %
CD30	3	60 %
CD32	19	90 %
CD33	95	95 %
CD38	55	98 %
CD44v6	2	40 %
CD56	19	87 %
CD64	2	58 %
CD96	1	45 %
CD112	2	100 %
CD123	12	86 %
CD133/1	1	55 %
CD133/2	1	53 %
CD135	5	30 %
CD157	1	70 %
CD276	2	75 %
CD276 HEK5	2	68 %
CD276 FAB2	1	69 %
CD305	80	98 %
CLL1	2	97 %
MICA/B	1	86 %

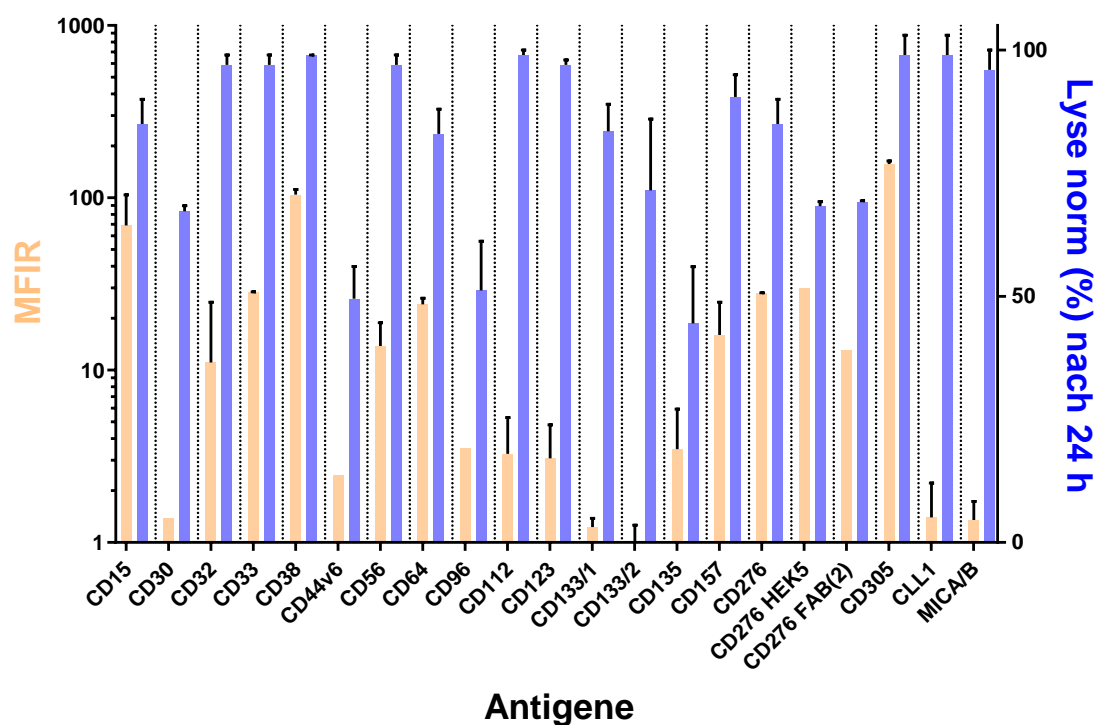


Abbildung 23: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1.

Die MFIR wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; orange; MFIR). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; violett; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 2,5:1.

Tabelle 18: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie THP-1. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	MFIR	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	69	80 %
CD30	1	90 %
CD32	14	96 %
CD33	27	98 %
CD38	104	99 %
CD44v6	3	65 %
CD56	14	96 %
CD64	19	75 %
CD96	4	68 %
CD112	4	100 %
CD123	3	95 %
CD133/1	1	71 %
CD133/2	1	69 %
CD135	4	45 %
CD157	19	80 %
CD276	19	77 %
CD276 HEK5	30	90 %
CD276 FAB2	13	92 %
CD305	157	99 %
CLL1	2	98 %
MICA/B	1	95 %

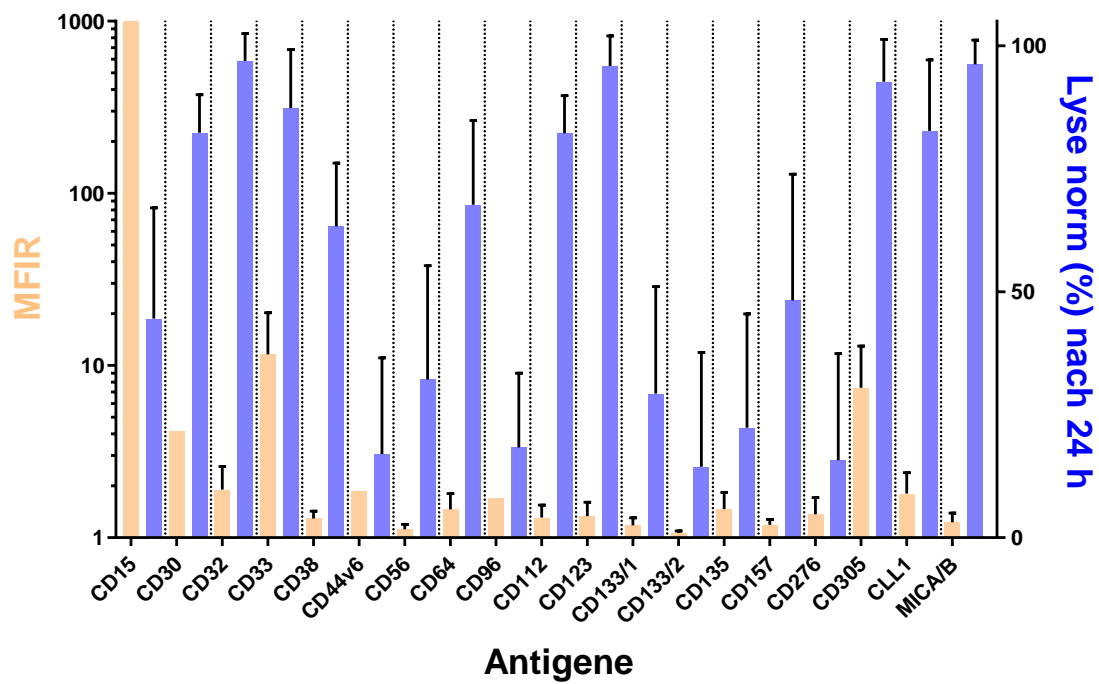


Abbildung 24: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie HL-60.

Die MFIR wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; orange; MFIR). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; violett; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 5:1.

Tabelle 19: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie HL-60. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	MFIR	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	144	45 %
CD30	4	80 %
CD32	10	98 %
CD33	37	90 %
CD38	4	63 %
CD44v6	2	20 %
CD56	2	35 %
CD64	6	67 %
CD96	2	78 %
CD112	4	23 %
CD123	4	95 %
CD133/1	3	30 %
CD133/2	1	15 %
CD135	6	25 %
CD157	3	48 %
CD276	5	18 %
CD276 HEK5	1	
CD276 FAB2	1	
CD305	31	92 %
CLL1	9	80 %
MICA/B	3	98 %

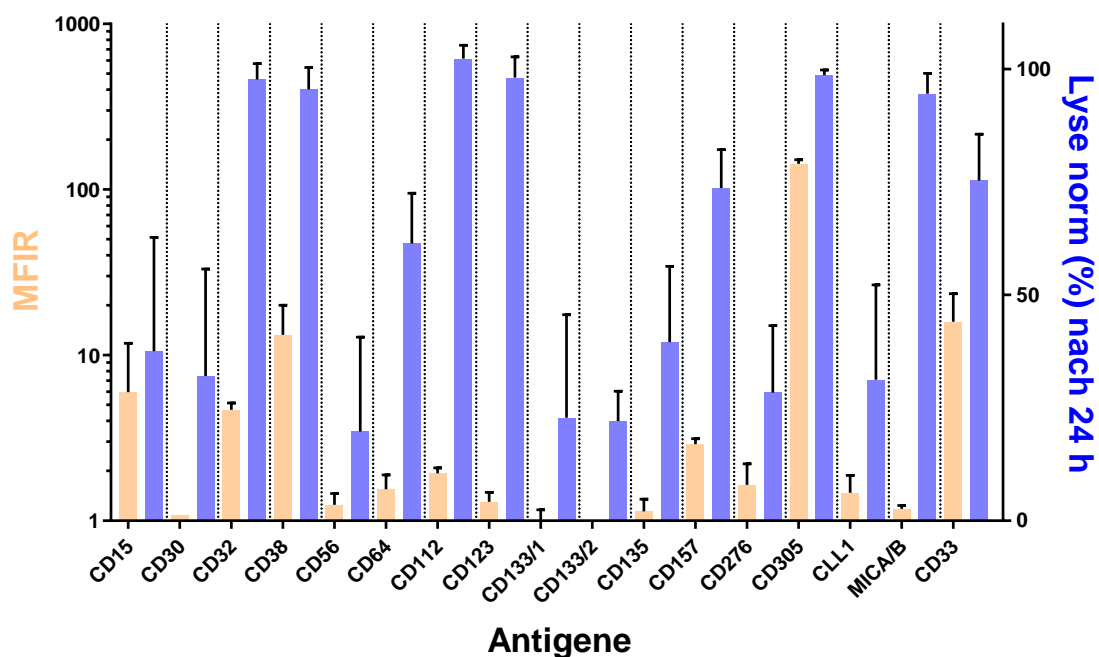


Abbildung 25: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Kasumi-1.

Die MFIR wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; orange; MFIR). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; violett; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 10:1.

Tabelle 20: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie Kasumi-1. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	MFIR	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	6	40 %
CD30	1	35 %
CD32	5	97 %
CD33	16	72 %
CD33 + Pembrolizumab		55 %
CD38	13	95 %
CD56	1	20 %
CD64	2	60 %
CD112	2	100 %
CD123	1	97 %
CD133/1	1	24 %
CD133/2	1	23 %
CD135	1	42 %
CD157	3	70 %
CD276	2	30 %
CD305	143	98 %
CLL1	2	32 %
MICA/B	1	94 %

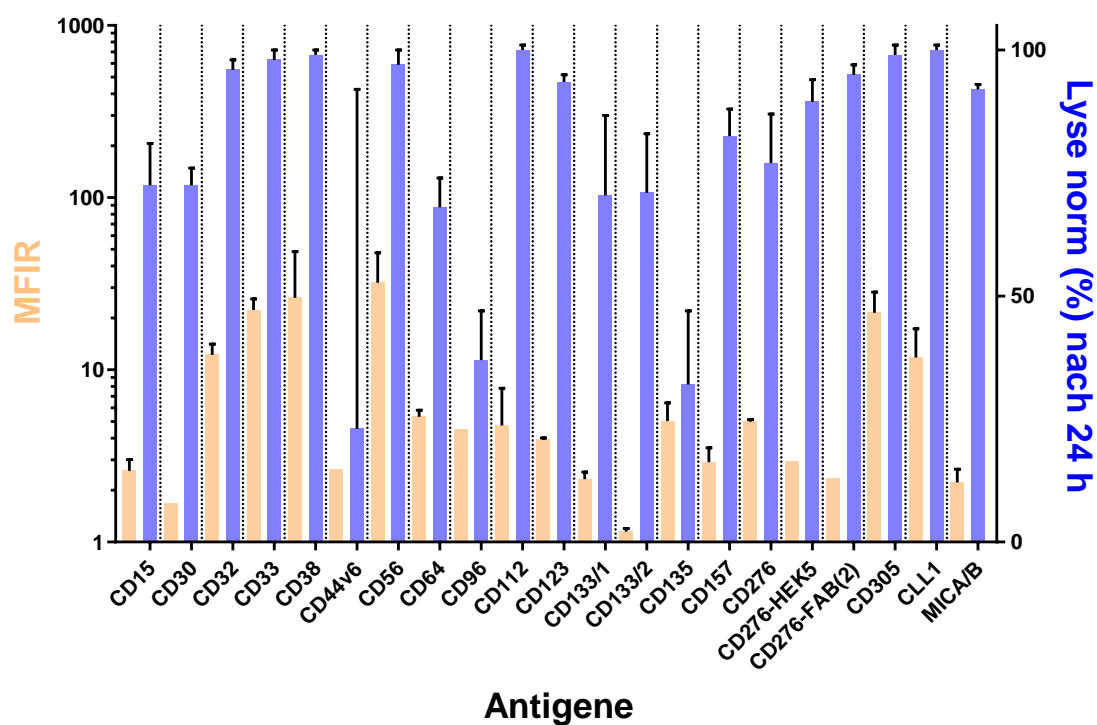


Abbildung 26: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie U937.

Die MFIR wurde durchflusszytometrisch ermittelt (links; orange; MFIR). Die Normalisierte Lyse der Zelllinie durch AdCAR-T-Zellen nach 24 h mit entsprechendem Adapter-Molekül wurde mittels Luciferase-Zytotoxizitätstest ermittelt (rechts; violett; 24 h Lyse normalisiert %). Balken zeigen Mittelwerte, Antennen zeigen Standardabweichung. N = 3, 2 Versuche / Spender; 3 Spender, E:T = 1:1.

Tabelle 21: Antigenexpression als MFIR und normalisierte Lyse nach 24 h in Prozent der Zelllinie U937. Werte gerundet auf Einer.

Antigen	MFIR	Normalisierte Lyse nach 24h in Prozent
CD15	3	63 %
CD30	2	70 %
CD32	11	95 %
CD33	22	98 %
CD38	32	98 %
CD44v6	3	40 %
CD56	35	95 %
CD64	5	66 %
CD96	5	40 %
CD112	5	100 %
CD123	4	90 %
CD133/1	2	70 %
CD133/2	1	68 %
CD135	5	37 %
CD157	3	80 %
CD276	5	73 %
CD276 HEK5	3	85 %
CD276 FAB2	2	96 %
CD305	20	99 %
CLL1	13	98 %
MICA/B	2	92 %

3.3.2.2 Korrelation der normalisierten Delta Lyse mit dem MFIR und mit der Antigenexpression in Prozent (= Overton Positivität %)

Das Ausmaß der Antigenexpression und die positive Korrelation mit der spezifischen Lyse wurde für alle AML-Zelllinien in einer Metaanalyse dargestellt. Diese Metaanalyse (Abb. 27 und 28) zeigt die Korrelation der spezifischen Lysewerte mit den Ergebnissen des auf Durchflusszytometrie beruhenden Antigenscreenings aller Tumorzelllinien. Jedes Antigen / Zelllinienpaar ist in den folgenden Punktdiagrammen als eigener Datenpunkt dargestellt. Dafür wurde der Mittelwert der spezifischen Lyse für jedes Antigen ermittelt und auf der y-Achse dargestellt, während die Adapterbindung der Zelllinien auf der x-Achse aufgetragen wurde. Der R²-Wert wurde berechnet und trifft eine Aussage darüber, wie passend das gewählte Modell die Korrelation beschreibt. Dabei bedeutet ein Wert von 1, dass die Werte und deren Korrelation sich zu 100% mit dem jeweiligen Modell beschreiben lassen.

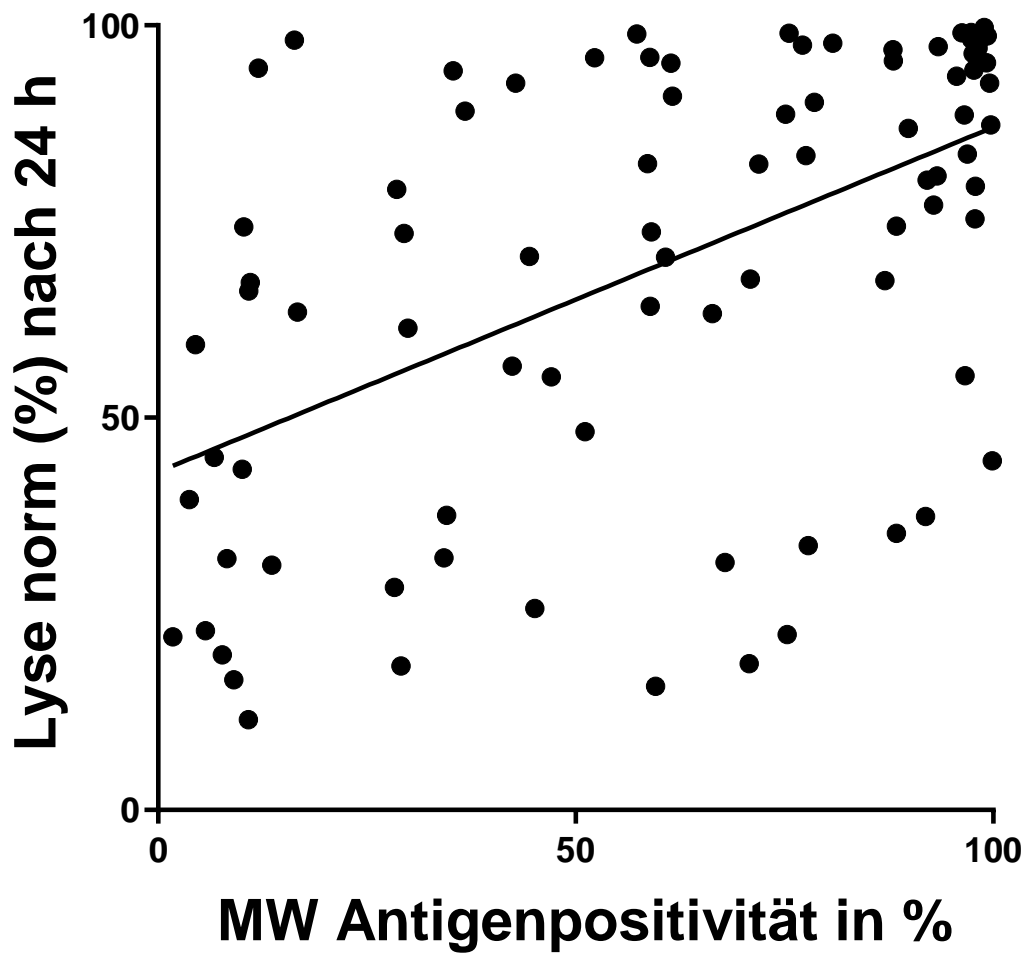


Abbildung 27: Darstellung der Korrelation der Overton-Positivität in Prozent und der über Antigenbindung-vermittelten Lyse der AML Zelllinien nach 24 h.

Mittelwerte der Antigenexpression (% Overton Positiv) für jedes der 21 Antigene. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender.

$R^2 = 0,2737$ (Max: 1 = 100%) und p-Wert $<0,0001$, $\alpha = 0,05$

95 % Confidence Intervall: 0,3534 bis 0,6596

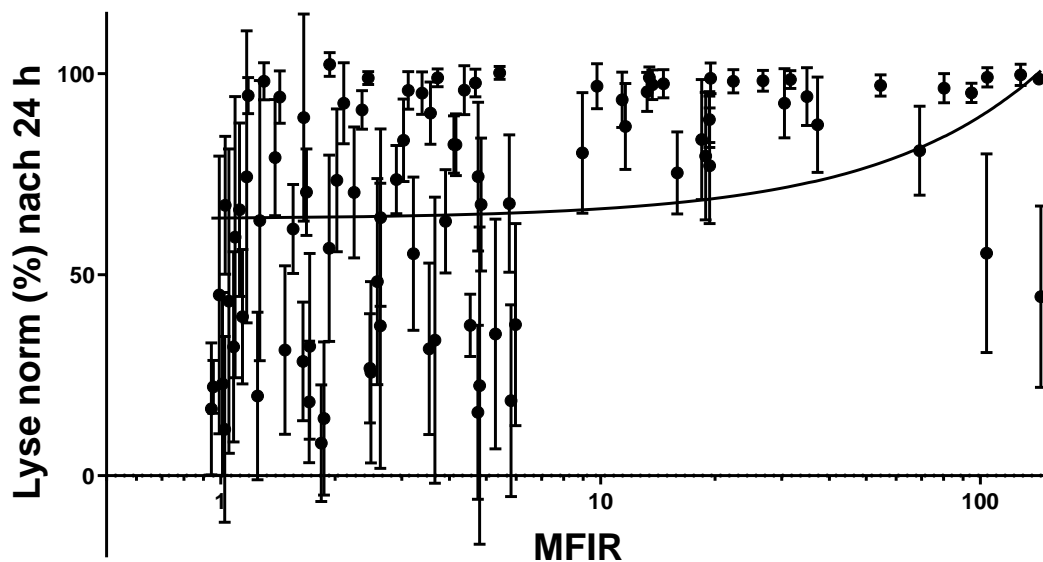


Abbildung 28: Korrelation der MFIR und der über Antigenbindung-vermittelten Lyse der AML Zelllinien nach 24 h.

Mittelwerte der MFIR für jedes der 21 Antigene. N = 3; 2 Versuche / Spender; 3 Spender.

$R^2 = 0,0742$ (Max: 1 = 100%) und p-Wert = 0,0083, $\alpha = 0,05$

95 % Confidence Intervall: 0,07273 bis 0,4511

Es konnte gezeigt werden, dass weder für die MFIR, noch für die Antigen Expression in Prozent (Overton %), eine Korrelation mit der Stärke der Lyse vorliegt. Ab einem unbekanntem Schwellenwert, welcher je nach Antigen unterschiedliche Werte (MFIR und Overton %) annehmen kann, wird eine Lyse vermittelt.

3.4 Vergleich der AML-Zelllinien

3.4.1 Vergleich der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Antigenexpression der fünf AML-Zelllinien

In den Heat Maps sind die Overton Positivität und die MFIR aller fünf AML-Zelllinien für alle 21 Antigene dargestellt. Die Zelllinien wurden abhängig von der Stärke der Antigenexpression fünf unterschiedlichen Gruppen zugeteilt. Anhand der Heat Map kann man direkt sehen, wie stark die Expression der einzelnen Antigene auf der Zelloberfläche der jeweiligen Tumorzelllinie ist. Die Zelllinie THP-1 exprimiert die meisten getesteten Antigene in hoher Menge, während die Zelllinie Kasumi-1 dieselben Antigene in weitaus geringerer Menge exprimiert.

Tabelle 22: Antigenexpression der AML-Zelllinien Molm-13, THP-1, U937, HL-60 und Kasumi-1 gemessen in der Overton Positivität (%).

Die Expression über 90 % ist rot markiert, zwischen 90 und 75 % dunkel-orange, zwischen 75 und 50 % hell-orange, zwischen 50 und 25% gelb und die Expression unter 25 % blau. Grau hinterlegt sind alle Expressionswerte unter 1 %. Die Expression eines jeden Antigens und einer jeden Zelllinie wurde mittels sekundärer FACS-Analyse und unter Einsatz eines sekundären FITC Antikörpers anstelle des Adaptermoleküls ermittelt und für jede Zelllinie jeweils dreimal durchgeführt (n=3).

Overton positivity	Cell line	Molm13	THP-1	U937	HL-60	Kasumi1
AML						
Antigen						
CD15	2	96,62	93,29	58,92	99,9	34,55
CD30	3	47,07	28,6	44,48	71,93	8,26
CD32	4	96,53	93,43	95,6	87,99	80,77
CD33	5	99,2	97,4	98,37	99,71	97,83
CD38	6	98,18	97,34	98,27	66,38	88,04
CD56	10	75,14	77,15	97,66	34,25	7,69
CD64	11	42,39	92,87	87,03	70,91	29,92
CD112	13	57,32	75,54	89,09	58,59	51,21
CD123	15	89,83	61,42	78,57	58,89	16,33
CD133/1	16	6,74	16,67	60,78	45,1	5,66
CD133/2	17	10,06	4,5	10,85	10,83	1,79
CD135	18	75,31	77,86	88,4	70,8	3,76
CD157	19	11,05	96,91	77,57	51,12	59,09
CD276	23	29,44	97,88	88,41	59,55	28,29
CD305	25	97,57	98,92	98,42	99,59	99,28
CLL1	27	42,8	36,75	96,25	92,08	13,63
MICA/B	29	10,24	35,35	61,6	52,25	12,01
CD276 HEK5	30	22,1	95,75	74,33	0,43	
CD276 FAB2	31	20,29	92,67	66,56	0,01	
CD44v6	33	38,55	51,95	72,78	39,47	
CD96	34	9,07	67,85	91,9	29,07	
>90	90-75	75-50	50-25	<25		

Tabelle 23: Darstellung der Antigenexpression der AML-Zelllinien Molm-13, THP-1, U937, HL-60 und Kasumi-1 gemessen in der MFIR.

Die MFI-Ratio zeigt den Unterschied in der Intensität der Probe bezogen auf die Isotypkontrolle. Die Expression über einer MFIR von 10 ist rot markiert, zwischen 10 und 5 gelb, zwischen 5 und 2 blau, zwischen 2 und 1,5 grau und die Expression unter 1,5 weiß. Die Expression eines jeden Antigens und einer jeden Zelllinie wurde mittels sekundärer FACS-Analyse und unter Einsatz eines sekundären FITC Antikörpers anstelle des Adaptermoleküls ermittelt und für jede Zelllinie jeweils dreimal durchgeführt (n=3).

MFIR AML	Cell line	Molm13	THP-1	U937	HL-60	Kasumi1
Antigen						
CD15	2	103,89	69,2	2,63	144,44	5,97
CD30	3	3,22	1,39	1,68	4,16	1,08
CD32	4	19,35	13,68	11,4	9,78	4,69
CD33	5	94,78	26,77	22,35	37,27	15,92
CD38	6	54,58	104,39	31,62	3,91	13,27
CD56	10	19,35	14,36	34,98	1,71	1,25
CD64	11	1,93	19,37	4,85	5,75	1,55
CD112	13	2,44	3,72	5,42	4,11	1,94
CD123	15	11,63	3,39	3,56	4,38	1,3
CD133/1	16	0,99	1,27	2,24	2,49	1,01
CD133/2	17	1,05	1,09	1,12	1,02	0,96
CD135	18	4,8	3,66	5,29	5,81	1,14
CD157	19	1,03	18,46	3,03	2,58	2,9
CD276	23	2,02	18,91	4,76	4,76	1,65
CD305	25	80,25	156,82	19,48	30,49	142,7
CLL1	27	2,11	1,65	13,44	8,96	1,48
MICA/B	29	1,17	1,43	2,35	3,12	1,18
CD276 HEK5	30	1,83	30,09	2,93	0,88	
CD276 FAB2	31	1,41	13,04	2,33	0,63	
CD44v6	33	1,84	2,47	2,63	1,87	
CD96	34	0,95	3,54	4,54	1,71	
>10	>5	>2	>1,5	<1,5		

4 Diskussion und Hypothese

4.1 Hypothese und Arbeitsplan

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich mithilfe des Adaptersystems AdCAR-T-Zellen entwickeln lassen, welche in Kombination mit unterschiedlichen Antikörpern und abhängig der Menge des gebundenen Antigens der Tumorzelle eine Lyse auslösen lässt.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der folgende Arbeitsplan aufgestellt (entspricht dem Arbeitsplan von Sarah Schröder, AG Lang):

- Zuerst müssen lentivirale Vektoren zur stabilen Integration des AdCAR Konstrukts in das Genom der T-Zelle hergestellt werden.
- Fünf unterschiedlich AML Tumorzelllinien sollten auf ihre Antigen-Expression (insgesamt 19 verschiedene Antigene) und die Expressionsstärke durch eine semiquantitative Analyse der Antikörperbindung mittels Durchflusszytometrie untersucht werden.
- Herstellung der AdCAR-T-Zellen aus den T-Zellen dreier unterschiedlicher, gesunder Spender
- Funktionelle Testung der AdCAR-T-Zellen für alle fünf AML-Zelllinien im Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassay, mit 19 unterschiedlichen Antigenen.
- Metaanalyse der Ergebnisse und anschließende Diskussion der Hypothese.

4.2 Bedarf neuer Therapieansätze für die AML

Die AML ist aktuell in einer beträchtlichen Anzahl der Patienten mittels der aktuellen Therapie nicht heilbar. Im Kindesalter kann ein 5-Jahres-Überleben von bis zu 60% erzielt werden, jedoch weisen diese Kinder eine hohe Rezidivrate auf. Im späteren Erwachsenenalter liegt das 5-Jahres-Überleben nur noch bei bis zu 10%. Eine Intensivierung der momentanen Therapie ist nicht möglich, da bereits die maximale Intensität vorliegt und lediglich die Rate an starken Nebenwirkungen zunehmen würde. Wie bereits in der Einleitung erwähnt,

reichen diese Nebenwirkungen bis zum Tod. Die aktuelle Forschung über neue und alternative Immuntherapien ist demnach von hoher Relevanz.

4.3 CAR-T-Zell Therapie

4.3.1 Bisheriger Einsatz der CAR-T-Zell Therapie

Aufgrund ihrer bemerkenswerten Anti-Tumor Aktivität in Studien wurden die ersten gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen am 27.8.2018 in Europa zugelassen. Tisagenlecleucel (Handelsname Kymriah®) und Axicabtagen Ciloleucel (Handelsname Yescarta®) sind CD19 spezifisch und binden das CD19 Antigen, welches auf allen Zellen der B-Zellreihe (ausgenommen hämatopoetische Stammzellen und Plasmazellen) vorkommt. Des Weiteren findet sich das CD19 Antigen abgesehen von der B-ALL auch auf Tumorzellen der CLL und auf Non-Hodgkin Lymphomen. In den USA sind diese Formen der CAR-T-Zell Therapie bereits seit Herbst 2017 zugelassen und werden dort seitdem erfolgreich klinisch eingesetzt. Tisagenlecleucel wird in der Therapie der rezidivierenden oder refraktären B-ALL im Kindes- und Jugendalter eingesetzt. Außerdem findet es Anwendung in der Therapie von Erwachsenen mit mehrfach behandeltem diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) (Union Register of medicinal products - European Commission 2018a). Axicabtagen Ciloleucel wird als alternative Therapie bei Erwachsenen mit mehrfach behandeltem DLBCL oder primär mediastinalem B-Zell-Lymphom (PMBCL) angewandt (Union Register of medicinal products - European Commission 2018b). Obwohl das CD19 Antigen lediglich auf B-Zellen und nicht auf anderen gesunden Geweben oder Organen des menschlichen Körpers vorkommt, können unter der Therapie mit CD19 CARs ernstzunehmende Nebenwirkungen auftreten. Beispielsweise das Cytokine-Release-Syndrom (CRS), welches mit einer übermäßigen Produktion von Zytokinen einhergeht, oder eine B-Zell-Aplasie. Beides ist jedoch gut behandelbar. Das CRS kann durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers Tocilizumab und die B-Zell-Aplasie mittels Immunglobulin-Infusionen therapiert werden. In mehreren Studien hat sich gezeigt, dass bei bis zu 90 % der unter bisheriger Therapie refraktären Patienten eine komplette Remission (CR) erzielt

werden konnte, welche mehrere Monate bis Jahre andauerte (Jain u. a. 2018; Shank u. a. 2017; Pang u. a. 2018).

4.3.2 CAR-T-Zell-Toxizität und die Notwendigkeit des Einsatzes eines Adaptersystems

Wie bereits in der Einleitung angesprochen, kann es durch die Aktivierung der CAR-T-Zelle nach Antigenerkennung zu starken Nebenwirkungen kommen. Die durch den Einsatz von CAR-T-Zellen gewünschte und vermittelte Tumorzellyse führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen und kann somit bei starker Ausprägung in ein CRS übergehen. Neben der intensivmedizinischen Betreuung der Patienten, welche ein CRS aufweisen, kommt Tocilizumab, ein Blocker des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6), zum Einsatz. IL-6 reguliert Entzündungsreaktionen und wurde bisher zusammen mit Methotrexat im Rahmen der Therapie der Rheumatoiden Arthritis verwendet. Durch Tocilizumab wird die Kaskade der inflammatorischen Signale verhindert (D. W. Lee u. a. 2014). Zusätzlich konnten neurotoxische Nebenwirkungen gezeigt werden, wobei ein ZNS Befall durch Tumorzellen zwar einen Risikofaktor darzustellen scheint, aber nicht zwangsläufig vorhanden sein muss (Santomasso u. a. 2018).

Die spezifische Lyse durch CAR-T-Zellen erfolgt über eine antigen-spezifische anti-Tumor Aktivität. In den Zytotoxizitätstests konnte gezeigt werden, dass nach Bindung des Antigens und Überschreitung eines unbekanntes Schwellenwertes eine Lyse der Tumorzellen erfolgte. Dabei war die Stärke der Lyse unabhängig von der exprimierten Antigenmenge auf der Zelloberfläche. Zusätzlich sollen die CAR-T-Zellen entsprechend ihrer physiologischen Form Gedächtniszellen bilden um somit lebenslang im Körper des Patienten persistieren zu können. Durch die lebenslange Persistenz könnten die CAR-T-Zellen bei Bedarf erneut expandiert werden. Aufgrund der Persistenz und der starken Lyse nach Überschreiten des Schwellenwertes muss bei der Auswahl des Zielantigens darauf geachtet werden, ob es auf der Oberfläche anderer gesunder Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Die CAR-T-Zellen können nicht zwischen den Tumorzellen und gesunden Zellen differenzieren. Dieser Vorgang wird als „on Target, off Tumor“ Toxizität bezeichnet und kann in einer hohen Letalität resultieren. Als

Beispiel hierfür eignen sich die bereits zugelassenen anti-CD19-CARs, durch deren Einsatz es zu B-Zell Aplasie kommen kann. Welche wie bereits im vorherigen Kapitel angesprochen mittels der Gabe von Immunglobulinen therapiert werden kann (Davila u. a. 2013).

Bei einer „on target/on tumor“ Toxizität, d.h. sowohl Tumorzellen als auch gesunde Zellen werden angegriffen, können lebensbedrohliche Komplikationen auftreten. Als Beispiele lassen sich das Tumorlysesyndrom, das CRS, das Makrophagenaktivierungssyndrom oder neurologische Dysfunktionen aufgrund ZNS-Toxizität nennen (Bonifant u. a. 2016). Die „on target/off tumor“ Toxizität hingegen löst Aplasie aus und es können starke Gewebeschädigungen im gesamten Körper auftreten (Brudno und Kochenderfer 2016). Das Problem ist hierbei, dass die ursprünglichen CAR-T-Zellen zwar lebenslang im menschlichen Körper persistieren können, jedoch nicht „abgeschaltet“, und somit deren Aktivität nicht kontrolliert werden können. Um dieses Problem zu überkommen, wurden unterschiedliche Konzepte zu an- und abschaltbaren CAR-T-Zell Konstrukten entworfen (Holzinger, Barden, und Abken 2016). Beispiele hierfür sind die Studien über einen Einbau von steuerbaren Suizidgenen (Gargett und Brown 2014), den Einsatz von pharmakologisch steuerbaren Schaltern (Wu u. a. 2015; Sakemura u. a. 2016) oder die transiente, über mRNA gesteuerte CAR-Expression (Zhao u. a. 2010). Bei diesen beschriebenen Mechanismen zur Regulation der Aktivität der CAR-T-Zellen traten jedoch einige limitierende Nachteile auf. Die im Folgenden genannten Nachteile sollen durch den Einsatz von AdCARs überkommen werden. Zum Beispiel erfordert die Verwendung der HSV-Thymidin Kinase (HSV-tk) oder der induzierten Caspase S (iCS), als Suizidgene, den nachfolgenden Einsatz von der Virostatika Ganciclovir oder CID (chemically inert inducer of dimerization) Prodrugs. Dieser Schaltermechanismus wurde ursprünglich zur Kontrolle der Alloreaktivität von T-Zellen bei GvHD nach HSCT entwickelt (Bonini u. a. 1997). Die anderen genannten Mechanismen zur Regulation der CAR-T-Zell-Aktivität beruhen auf dem Abtöten der CAR-T-Zellen nach deren Einsatz und erfordern bei Bedarf die Gewinnung neuer T-Zellen des Patienten mit erneuter Transduktion des CAR-Konstrukts in diese. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Adaptersystem getestet, wodurch sich die verwendeten

CAR-T-Zellen, durch Zugabe oder Weglassen des Adapters regulieren lassen. Das Adaptersystem beruht auf zwei Molekülen, der CAR-T-Zelle, sowie dem Adapter. Der Adapter besteht aus einem Antikörper oder einem Antikörperfragment, welches mit der variablen Region spezifisch an das gewünschte Zielantigen bindet. An der konstanten Region sind sie mit Biotin verknüpft. Die AdCAR-T-Zellen binden spezifisch an die Verbindung zwischen dem Biotin und dem Adapter. Die Erkennung der Zielzellen erfolgt demnach indirekt und kann nur nach der Zugabe eines passenden Adaptermoleküls erfolgen. Ohne Adapterzugabe kann keine spezifische Lyse der Tumorzellen stattfinden. Die AdCAR-T-Zellen sind dann inaktiviert. Dies kann bei Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen lebensrettend sein. Wie lange der Adapter im Blut verweilt, wenn keine erneute Zugabe erfolgt, ist noch unklar. Durch den Einsatz dieses speziell entwickelten Adaptersystems könnten die Nachteile der in der Literatur beschriebenen Adaptersysteme umgangen werden. Bei jahrelanger Persistenz der inaktivierten AdCAR-T-Zellen im menschlichen Körper, welche bei Bedarf durch Zugabe von Adaptermolekülen aktiviert und expandiert würden, könnten den Einsatz von AdCAR-T-Zellen als Therapieform kostengünstiger und erträglicher für den Patienten machen. Statt für jeden Einsatz der CAR-T-Zellen neue T-Zellen vom Patienten gewinnen zu müssen, verblieben diese, nach einmaliger Anreicherung mit dem CAR-T-Zell Konstrukt, im Körper des Patienten. Die eingesetzten Adaptermoleküle sind vom Patienten in dem Maße unabhängig, dass sie nicht individuell für jeden Patienten angepasst werden müssen. Geplant ist die Entwicklung verschiedener universeller Adaptermoleküle, die gegen häufige Antigene der AML Blasten gerichtet sind. Im Zuge dessen können auch mehrere Adaptermoleküle zeitgleich zum Einsatz kommen, um damit den Immune Escape Mechanismus der Tumorzellen zu umgehen. Zusätzlich kann die Aktivierung der AdCAR-T-Zellen durch langsames Auftitrieren der AK Dosis moduliert und reguliert werden. Nebenwirkungen könnten frühzeitig erkannt und reduziert werden. Ziel der Arbeit war es Antigene zu finden, welche lediglich zu einem geringen Maß auf gesunden Körperzellen vorkommen. Mittels Literaturrecherche wurden Antigene selektioniert, welche auf AML-Blasten exprimiert werden und die AdCAR-T-Zell vermittelte Lyse dieser

getestet. Es konnten jedoch keine Antigene ermittelt werden, welche nur auf der Oberfläche der Tumorzellen vorkommen. Dem Einsatz des Adaptersystems kann zusätzlich Bedeutung beigemessen werden, wenn man beachtet, dass nach Überschreiten eines teils geringen Schwellenwertes für Antigen-Expression eine starke Lyse durch die AdCAR-T-Zellen vermittelt wurde. Eine geringe Expression des Oberflächenantigens bspw. CD 123 (MFIR < 5) war bereits ausreichend, um diese Schwelle zu überkommen. Demnach würden auch gesunde Körperzellen, die geringe Mengen des Antigens exprimieren, erkannt und lysiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Lyse bereits bei geringerer Antigenkonzentration ausgelöst werden kann, als in der angewandten sekundären FACS-Färbung dieser Arbeit gemessen werden kann.

4.3.3 Effektivität der CAR-T-Zell Therapie

Vor allem die Steuerbarkeit und die daraus resultierende Sicherheit sind maßgebend für den klinischen Einsatz von CAR-T-Zellen. Jedoch stellt auch die mangelnde Effektivität einen limitierenden Faktor für die Therapie dar. Die Effektivität ist zum einen abhängig von der Funktion bzw. Fehlfunktion der CAR-T-Zellen selbst. D.h. falls die CAR-T-Zellen vom patienteneigenen Immunsystem abgestoßen werden und demnach keine Gedächtniszellen ausbilden, kann es zu einem fehlenden Ansprechen der Therapie kommen. Nicht selten ist das Auftreten von frühen Rezidiven die Folge. Nach Long et al. kann es zu Aneinanderlagerungen der scFv Regionen und somit zur Ausbildung von Clustern der CAR-T-Zellen kommen. Die Clusterbildung resultiert in einer antigenunabhängigen Aktivierung der CAR-T-Zellen. Die CAR-T-Zellen erschöpfen dadurch schneller und zeigen einen Proliferationsstopp, eine Erhöhung der PD-1 Expression und verminderte Zytokinproduktion (Davila u. a. 2013). Hierbei kann die Anwendung des AdCAR-Systems von Vorteil sein, da die spezifische Bindung der AdCARs an den Adapter bereits auf deren Effektivität getestet ist und keine neuen CAR-Konstrukte für jedes neue Antigen entwickelt werden müssen. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist der Einsatz der AdCARs kostengünstiger verglichen mit anderen CAR-T-Zell Konstrukten, da die Herstellung der benötigten biotinylierten Antikörper als Adapter bereits etabliert

ist. Der Aufwand ist weitaus geringer, als ein vollkommen neues CAR-T-Zell-Konstrukt für jedes Antigen herstellen zu müssen.

Zum anderen ist die Effektivität vom Mechanismus der Immunevasion der Tumorzellen abhängig. In Studien wurde dieser Mechanismus anhand eines Falles einer gegen anti-CD19-CAR resistenten B-ALL gezeigt, bei welcher die Tumorzellen die CD19 Expression herunterregulierten, jedoch mittels gegen CD22 gerichteten CAR-T-Zellen eine Remission erzielt werden konnte (Fry u. a. 2018). Werden mehrere Tumorantigene als Zielantigene verwendet, wird dies als „multiple targeting“ bezeichnet. Dies ermöglicht es, bei Verlust eines Zielantigens, auf ein alternatives Zielantigen auszuweichen. Die Flexibilität des AdCAR Systems bietet also einen erheblichen Vorteil gegenüber konventionellen CAR-T-Zell Therapien, da ein schneller Wechsel auf ein alternatives Zielantigen möglich ist. Alternativ könnte mittels alternativen Spleißen das Epitop gewechselt werden, wodurch bei Verlust eines Zielantigens ein anderes Antigen angegriffen werden könnte. Es liegen jedoch noch keine ausreichenden Daten für diese Hypothesen vor. *In vitro* war das in dieser Arbeit verwendete AdCAR-System mit den getesteten Antigenen kompatibel. Eine Aussage über die *in vivo* Kompatibilität kann dadurch jedoch nicht getroffen werden.

4.3.4 Bereits in Studien verwendete Zielantigene für CAR-T-Zellen bei AML und zusätzliche potentielle Antigene

Tabelle 24: Potentielle Zielantigene für die CAR-T-Zell Therapie bei der AML und bisherige Daten aus präklinischen und klinischen Studien.

Hellgrün: Antigene, welche bereits in präklinischen und klinischen CAR-T-Zell Studien getestet werden. Dunkelgrün: Die in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Antigene, die als potentielle Zielantigene *in vivo* eingesetzt werden können. Auch wenn bereits zu weiteren Antigenen präklinische Studien existieren, sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Antigene aufgelistet. Die Bestandteile und Eigenschaften der einzelnen Antigene sind im Anhang aufgeführt.

Antigen	Expression	Zytokinproduktion in <i>in vitro</i> Studien/ Risiko eines CRS	<i>In vivo</i> Studien	Potentielle Toxizität und bereits beob. Toxizität in laufenden Studien
CD15	B-Zellen, Knochenmark, Stammzellen, Epithelien, Niere, Langerhanszellen, Leukämie-Zellen, Lunge, Monozyten, Myeloische Zellen, Reed-Sternberg-Zellen, T-Zellen	n/a	n/a	Lymphodepletion, Toxizität der Haut, Schädigungen des Nierenepithels, und des Lungenepithels, Panzytopenie
CD30	B-Zellen, Granulozyten, Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Plasmazellen, Induzierte pluripotente Stammzellen, Embryonale Stammzellen, T-Zellen, Thymozyten	n/a	n/a	Lymphodepletion, Myeloablation, Thrombozytopenie, ggf. teratogen
CD32	B-Zellen, Dendritische Zellen, Endothelien, Langerhanszellen, Lymphozyten, Makrophagen, Myeloische Zellen, NK-Zellen, Plazenta, Plasmazellen	n/a	n/a	Lymphodepletion, Myeloablation, Thrombozytopenie, ggf. teratogen
CD33	Dendritische Zellen, Langerhanszellen, Kupferzellen, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, Myeloische Zellen, NK-Zellen, T-Zellen	GM-CSF, IFN- γ , IL-2, MIP1 α , MIP1 β	MM und AML PDX Modelle (Dutour u. a. 2012; Pizzitola u. a. 2014; Kenderian u. a. 2015) Ein Patient bisher behandelt (Q. Wang u. a. 2015)	Depletion hämatopoetischer Zellen, Sinusoidales Obstruktions Syndrom
CD38	B-Zellen, Knochenmark, ZNS, Niere, Leukozyten, Ovar, Pankreas-CA, Plazenta, Plasmazellen, Erythrozyten, Skelletmuskelzellen, T-Zellen, Thymozyten	IFN- γ , IL-2, TNF- α	MM PDX Model (Drent u. a. 2016; Yoshida u. a. 2016)	Lymphodepletion, Neurotoxizität, ggf. teratogen
CD44v6	Hämatopoetische Zellen, Fibroblasten	IFN- γ , IL-2	MM und AML PDX Modelle (Casucci u. a. 2013)	Monozytopenie und Toxizität der Haut
CD56	Dendritische Zellen, neurales und neuroendokrines Gewebe, NK-Zellen, T-Zellen,	n/a	n/a	Immunsuppression, Neurotoxizität
CD64	Dendritische Zellen, Myeloische Zellen, Monozyten, Makrophagen	n/a	n/a	Immunsuppression
CD96	Epithelien, T-Zellen, NK-Zellen	n/a	n/a	Lymphodepletion, Epithelschädigung
CD112	Endothelien, Epithelien, Leukozyten, Hoden	n/a	n/a	Endothel- und Epithelschädigung, Myeloablation, Lymphodepletion

Antigen	Expression	Zytokinproduktion in <i>in vitro</i> Studien/ Risiko eines CRS	<i>In vivo</i> Studien	Potentielle Toxizität und bereits beob. Toxizität in laufenden Studien
CD123	B-Zellen, Myeloische Zellen, Knochenmark, ZNS, Endothelien, Leukämiezellen, Makrophagen, Mastzellen, Megakaryozyten, Myeloische Zellen, Erythrozyten, Plazenta	GM-CSF, IFN- γ , IL-2, MIP1 α , MIP1 β	AML PDX Model (Mardiros u. a. 2013; Tasian u. a. 2017; Tettamanti u. a. 2013; Gill u. a. 2014), Insgesamt wurden bereits bis zum Jahr 2018 11 Patienten behandelt (Budde, Song, und Kim 2017; Cummins, Frey, und Nelson 2017)	Depletion normaler hämatopoetischer Zellen in <i>in vivo</i> Studien, Schädigungen des Herzendothels
CD133/1	ZNS, Endothelien, Epithelien, Herz, Hämatopoetische Stammzellen, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Plazenta, Embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen, Erythrozyten	n/a	n/a	Schädigung von Epithel und Endothel, Toxizität verschiedener Organe, teratogen, Anämie
CD133/2	ZNS, Endothelien, Epithelien, Herz, Hämatopoetische Stammzellen, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen, Erythrozyten	n/a	n/a	Schädigung von Epithel und Endothel, Toxizität verschiedener Organe, teratogen, Anämie
CD135	Hämatopoetische Stammzellen, Dendritische Zellen, Neurone, Hoden	IFN- γ , IL-2	AML PDX Model (Chien u. a. 2016; Sauter u. a. 2016; Chen u. a. 2017; Jetani u. a. 2018)	Depletion normaler hämatopoetischer Zellen in <i>in vivo</i> Studien, Neurotoxizität, Schädigung des Hodengewebes
CD157	Endothelien, Granulozyten, Knochenmark, Bindegewebszellen, Makrophagen, Monozyten	n/a	n/a	KM-Suppression, Immunsuppression, Endothelschäden
CD276	B-Zellen, Dendritische Zellen, Epithelien, Herz, Leber, Monozyten, NK-Zellen, Pankreas, Plazenta, Dünndarm, T-Zellen	n/a	n/a	Lymphodepletion, Schädigungen am Herzen, an Leber, Pankreas und Dünndarm, teratogen, Toxizität der Haut

Antigen	Expression	Zytokinproduktion in <i>in vitro</i> Studien/ Risiko eines CRS	<i>In vivo</i> Studien	Potentielle Toxizität und bereits beob. Toxizität in laufenden Studien
CD305	B-Zellen, Basophile, Dendritische Zellen, Eosinophile, Mastzellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thymozyten	n/a	n/a	Lymphodepletion, Myeloablation, Immunsuppression
CLL1	Dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten, Neutrophile	GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-13, MIP1 α , TNF- α	AML PDX Model, kein Effekt auf Hämatopoetische Stammzellen (Laborda u. a. 2017; J. Wang u. a. 2018)	Myeloablation
MICA/B	Endothelzellen, in stressinduzierten Epithelzellen, Fibroblasten	n/a	n/a	Schädigungen von Endothelien und Epithelien

In bisherigen präklinischen Studien zum Einsatz von CAR-T-Zellen für die Therapie der AML zeigte sich eine hohe Heterogenität in der Antigenexpression verschiedener AML Zelllinien. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Wie der Heat-Map (Kapitel 4.4.1) zu entnehmen ist, sind die Antigene nicht zu gleichem Maße auf den AML Zelllinien exprimiert. Das bedeutet eine hohe Variabilität bezogen auf den Einsatz von CAR-T-Zellen in Patienten. Es ist davon auszugehen, dass die Heterogenität nicht nur zwischen den AML Zelllinien besteht, sondern dass die Antigenexpression auch in jedem Patienten unterschiedlich ist. Demzufolge kann für die CAR-T-Zell Therapie kein universal anwendbares Therapieprotokoll erstellt werden, sondern es müssen bei jedem Patienten individuelle Antigenuntersuchungen der Tumorzellen erfolgen. Aufgrund von Immune Escape Mechanismen ist es sinnvoll, diese Antigenuntersuchungen im Therapieverlauf zu wiederholen. Die in dieser Arbeit entwickelte Immunphänotypisierung ist demnach notwendig für die Charakterisierung der Antigenexpression und somit für die Individualisierung und Anpassung der AdCAR Therapie an den Patienten. Mittels der Immunphänotypisierung ist außerdem die Möglichkeit eines universellen und multiplen Targeting gegeben.

Bisher lassen sich lediglich Hypothesen für den Einsatz des AdCAR-Systems in klinischen Studien aufstellen. In den *in vitro* Versuchen zeigte sich keine Korrelation zwischen der Antigenexpression und der Stärke der Tumorlyse. Es

konnte lediglich gezeigt werden, dass ab Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes, welcher je nach Antigen und Zelllinie variabel ist, eine Lyse erfolgt. Das könnte bedeuten, dass auch bei sehr geringer Antigenexpression auf gesunden Zellen des menschlichen Körpers eine starke Lyse ausgelöst werden könnte, weshalb bei klinischen Studien zukünftig vermehrt auf das Auftreten von Nebenwirkungen aufgrund der Schädigung gesunder Zellen geachtet werden sollte. Es bedeutet aber auch, dass selbst Tumorzellen mit einer geringen Antigenexpression spezifisch erkannt und lysiert werden könnten. Somit könnte die Anzahl an verbleibenden Blasten nach der Therapie drastisch reduziert und die Rezidivrate vermindert werden. Unklar ist, ob eine höhere Zielantigenexpression im menschlichen Körper zu einer drastischen Zunahme in der Stärke der Stimulation der AdCAR-T-Zellen resultiert. Interessant wäre es zu testen, ob eine Regulation der AdCAR-T-Zellen durch die verfügbare Menge des Adaptermoleküls möglich ist, um gesundes Gewebe zu schützen. Vor allem für Gewebe, welche das Antigen zwar teilen, aber nicht überexprimieren könnte dies ein sinnvoller Ansatz zur Reduktion der potenziellen Nebenwirkungen durch den „on target/off tumor“ Effekt sein.

Dementsprechend ist es von Vorteil viele diverse Antigene als potenzielle Angriffspunkte für die AdCAR-T-Zellen ausfindig zu machen. Zusätzlich zu den Antigenen, welche bereits in präklinischen und klinischen Studien getestet werden, wurden in dieser Arbeit weitere potentielle Antigene *in vitro* evaluiert. Diese wurden durch die Forschungsgruppe AG Lang auch *in vivo* in einem NSG Mausmodell getestet. Dies erweitert das Spektrum potenzieller Antigene und ermöglicht eine Strategie des multiplen „Targetings“. In der Klinik ist es von Vorteil, viele verschiedenen Antigene angreifen zu können, um den Mechanismus der Immunevasion zu überkommen.

4.3.5 Methode und die Lyse beeinflussende Faktoren

In dieser Arbeit wurden fünf käuflich erworbene AML-Tumorzelllinien zunächst mittels Durchflusszytometrie immunphänotypisiert. Die exprimierten Antigene wurden anschließend als Zielantigene in Luciferase-basierten Zytotoxizitätstest genutzt. Die Sekundärfärbung der Tumorzellen für die Durchflusszytometrie

diente hierbei nicht nur der Expressionsanalyse der Antigene, sondern stellte auch den ersten Schritt der funktionellen Testung, durch Ermittlung des später zu bindenden Antigens des Adaptersystems, dar. Die Adapter wurden als Primärantikörper verwendet und die antigenbindende Region (scFv) der Sekundärantikörper, entspricht der antigenbindenden Region der AdCARs. Für die Überprüfung der Hypothese reichte es aus, die Expression semiquantitativ zu bestimmen, da es lediglich relevant war, ob ein Antigen exprimiert wird oder nicht. Die Semiquantitative Bestimmung war außerdem ausreichend um eine Aussage über eine potenzielle Korrelation zwischen der Dichte der exprimierten Antigene und der Effektivität der AdCARs stellen zu können. Die Effektivität der AdCARs wurde mittels Zytotoxizitätstest weiter untersucht. Die Idee, dass die Höhe der Antigenexpression direkt mit der Stärke der Lyse korreliert, erwies sich als nicht nachweisbar. Stattdessen konnte selbst eine geringe Antigenexpression eine starke Lyse von über 90% auslösen (beispielsweise für die Antigene CD112 und CD30). Der Schwellenwert, welcher für die Aktivierung der AdCAR-T-Zellen nötig ist, könnte in folgenden Arbeiten für alle Tumorzelllinien individuell quantitativ ermittelt werden, um so auch das System modulieren zu können. In dieser Arbeit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ab welchem Punkt der Schwellenwert überschritten wurde und demnach auch keine darüber, wie viel gebundene Adaptermenge tatsächlich benötigt wird, um die AdCAR-T-Zellen zu aktivieren und eine spezifische Lyse zu vermitteln. Zusätzlich kann die Immunphänotypisierung der Antigene lediglich eine Momentaufnahme der Antigenexpression zeigen, d.h. dass sich das Muster der Antigenexpression bis zum Zeitpunkt der funktionellen Testung bereits verändert haben kann. Für die ausbleibende Korrelation zwischen Expression und Lyse könnte die veränderte Antigenexpression eine Erklärung sein. Falls zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie wenig Antigenexpression vorlag, zum Zeitpunkt der funktionellen Testung jedoch mehr, könnte dies die teilweise starke Lyse erklären. Dies müsste in folgenden Arbeiten weiter untersucht werden, um die Schwellenwerttheorie zu stützen oder zu widerlegen.

Diese Arbeit hingegen beschäftigt sich ausschließlich mit der *in vitro* Testung des Adaptersystems und hierfür waren die ausgewählten Methoden passend.

Inwiefern die Ergebnisse der Arbeit für die Anwendung *in vivo* translatiert werden können, muss in weiteren Arbeiten erforscht werden und das AdCAR-System unter Berücksichtigung weiterer Forschungsergebnisse für den klinischen Gebrauch angepasst werden. Eine Studie mit primären CD20 CAR-T-Zellen, zeigte, dass nach Überschreiten eines Schwellenwertes (ca. 200 Moleküle eines Zielantigens pro Zielzelle) eine durch CAR-T-Zellen vermittelte Lyse beobachtet werden konnte. Die Zunahme der Dichte um den Faktor 10 führte zur Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, welche die Aktivität der CAR-T-Zellen und auch deren Proliferation und dadurch die vermittelte Lyse weiter steigern (Watanabe u. a. 2015; Hudecek u. a. 2013; Walker u. a. 2017).

Trotz der fehlenden Korrelation zwischen Antigenexpression und Ausmaß der AdCAR-T-Zell-vermittelten Lyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Vorhandensein eines Antigens auf der Zelloberfläche eine Lyse stattfindet. Grundlegende Bedingung für die Vermittlung der Lyse scheint zu sein, ob ein Antigen exprimiert wird oder nicht. Nach 24h Inkubation war die Lyse in der funktionellen Testung bei passender E:T Ratio erreicht. Ab diesem Zeitpunkt war die Lyse abnehmend. Dies könnte daran liegen, dass die AdCAR-T-Zellen und die Tumorzellen sich zu diesem Zeitpunkt maximal vermehrt haben und ein Mediumwechsel notwendig wäre. Dieser konnte im Rahmen der Untersuchungsbedingungen jedoch nicht gewährleistet werden. Die Effektivität der AdCAR-T-Zellen könnte unter angepassten Umgebungsbedingungen vermutlich auch nach den 24 h weiter gesteigert werden. Demnach könnte eine 100 % Lyse beispielsweise erst nach 48 h erfolgen. Die E:T Ratio wurde für die Versuche so ausgewählt, dass starke Lyse der Tumorzellen von statten gehen konnte. Dabei konnte auch eine geringere Lyse mancher Antigene festgestellt werden. Wäre die E:T Ratio zu hoch ausgewählt worden, hätte wahrscheinlich aufgrund der stärkeren Lyse eine noch geringere Korrelation zwischen Antigendichte und spezifischer Lyse festgestellt werden können. Angelehnt an Literaturergebnisse lassen sich die ermittelten Ergebnisse wie folgt interpretieren: Die AdCAR-vermittelte Lyse benötigt einen gewissen Schwellenwert an Antigenexpression, um ausgelöst zu werden. Eine einzelne Bindung einer AdCAR-T-Zelle an einen Adapter, welcher ein Ag auf der Zielzelle

gebunden hat, scheint nicht auszureichen, um die AdCAR-T-Zelle zu aktivieren. Vielmehr braucht es vermutlich eine gewisse Anzahl an Bindungen. Dadurch kommen mehrere „aktivierte“ AdCAR-T-Zellen in räumliche Nähe, wodurch das Signal für die Aktivierung der Zelle stark genug wird um eine Lyse auszulösen (Arcangeli u. a. 2017). Jede Zelle der Population, die diesen Schwellenwert überschreitet, wird von den AdCAR-T-Zellen erkannt und lysiert. Falls eine Zellpopulation eine homogene Antigenexpression aufweist bedeutet dies demnach, dass die gesamte Population lysiert werden kann. Die Geschwindigkeit der Lyse ist abhängig von der Aktivität und Menge der AdCAR-T-Zellen. Wie bereits erwähnt, sollte, laut Literatur, sowohl die Menge, welche durch Proliferation entsteht, als auch die Aktivität von CAR-T-Zellen von der Dichte der Antigene und der Ausschüttung immunmodulatorischer Zytokine abhängig sein.

Um in der Klinik schwere Nebenwirkungen reduzieren zu können, muss die Aktivität der AdCAR-T-Zellen regulierbar sein. Bei dem Einsatz der AdCAR-T-Zellen ist diese Regulation durch die Menge an zugegebenen Adaptermolekülen möglich. Essenziell hierbei ist jedoch, dass die Aktivierung spezifisch, also nur in Anwesenheit der passenden Adaptermoleküle, erfolgt. Die Aussage über die Spezifität, der durch die AdCAR-T-Zell-vermittelten Lyse lässt, sich anhand des Vergleiches zwischen Immunphänotypisierung und der funktionellen Testung treffen. Bei Nichtnachweisbarkeit eines Antigens nach Adaptermolekülzugabe in der Immunphänotypisierung, fand keine Lyse in der funktionellen Testung statt. Dies wurde zusätzlich untersucht, indem die Lyse der AdCAR-T-Zellen unter Zugabe des Antigens CD33 bei den Titrationsversuchen beobachtet wurde. Ohne die Zugabe von CD33 fand keine starke unspezifische Lyse statt. Durch die nachgewiesene Spezifität der AdCARs kann die Unwirksamkeit bestimmter Adapter bei Fehlen bzw. nicht Erkennen von Antigenen vorausgesagt werden.

Die Lyse scheint jedoch von mehreren Faktoren, als nur von der Dichte der Antigene bzw. dem Schwellenwert abhängig zu sein. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass keine direkte Korrelation besteht. Abgesehen von Messungenauigkeiten oder Fehlern seitens des Untersuchers, ist das CAR Konstrukt an sich zu berücksichtigen. Diverse Variablen, wie bspw. die Länge

des Spacers (bezüglich derer bereits Versuche von der AG Lang durchgeführt wurden) oder anderer Teile, die für den strukturellen Aufbau der AdCARs nötig sind und die Affinität des Adapters, scheinen die Lyse zu beeinflussen. Die Größe eines Zielantigens und die Lage des Epitops sind weitere die Lyse beeinflussende Faktoren, da dadurch der Abstand zwischen AdCAR-T-Zelle und Zielzelle variiert. Die Affinität ist zusätzlich von der Heterogenität der verschiedenen AML-Zelllinien abhängig. Bei allen verwendeten Tumorzelllinien war eine individuelle Anpassung der E:T Ratio nötig. Der Grund für die unterschiedliche Sensibilität der Tumorzelllinien auf die Aktivität der AdCAR-T-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Sekretion hemmender Zytokine (bspw. IL-4, IL-6 und IL-10) oder die Expression von bestimmten Oberflächenproteinen (bspw. $TNF\alpha$), welche die Immunantwort hemmen, wurden als mögliche Ursache diskutiert (Yeku u. a. 2017).

5 Zusammenfassung

Die Behandlung der rezidierten Akuten Myeloischen Leukämie (AML) stellt auch heute noch eine große Herausforderung dar. Die Therapie ist mit starken Nebenwirkungen verbunden und häufig nicht ausreichend, um eine komplette Remission (CR) zu erzielen. In den meisten Fällen resultiert die rezidivierende AML im Tod. CAR-T-Zellen, welche als Zielantigen CD19 angreifen, zeigten ein außergewöhnliches therapeutisches Potential bei Patienten mit einer Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL). Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der CAR-T-Zell Technologie auf die AML. Im Kontrast zur Verwendung von CD19 bei der ALL, sind AML-stammzellassoziierte Antigene auf gesunden Vorläuferzellen der Hämato- und Leukopoese ko-exprimiert. Dadurch kann es durch die vollständige Depletion dieser Zellen zur Knochenmarksinsuffizienz kommen. Um dies zu Umgehen wurde in Kooperation mit der Firma Miltenyi Biotec ein Adaptersystem (AdCARs) entwickelt. Die AdCARs erkennen einen Marker (Biotin), welcher an ein Adaptermolekül (bspw. Bestehend aus einem Antikörper oder einem FAB-Molekül) konjugiert vorliegt, anstatt das Zielantigen direkt zu binden. Der Adapter fungiert hierbei als Mediator der spezifischen Aktivierung der AdCARs. Die Vorteile hierbei sind zum einen die vorübergehende Aktivierung und Inaktivierung der AdCARs zur Reduktion der CAR-T-Zell-Zytotoxizität und zum anderen das synchrone und multiple Angreifen verschiedener Antigene zur Verhinderung des Immune Escape Mechanismus der Tumorzellen. In dieser Arbeit wurden die Antigenexpression der Tumorzellen, sowie die spezifische Lyse durch AdCAR-T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass keine Korrelation zwischen Antigenexpression und spezifischer Lyse besteht.

6 Literaturverzeichnis

- Alford, Kate A., Katarina Reinhardt, Catherine Garnett, Alice Norton, Katarina Böhmer, Christine von Neuhoff, Alexandra Kolenova, u. a. 2011. „Analysis of GATA1 Mutations in Down Syndrome Transient Myeloproliferative Disorder and Myeloid Leukemia“. *Blood* 118 (8): 2222–38. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342774>.
- Amado, R. G., und I. S. Chen. 1999. „Lentiviral Vectors--the Promise of Gene Therapy within Reach?“ *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428): 674–76. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.674>.
- „Antibodies - MACS Flow Cytometry - Products - Miltenyi Biotec - USA“. o. J. Zugegriffen 3. April 2020. <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/macs-flow-cytometry/antibodies.html>.
- Arcangeli, Silvia, Maria Caterina Rotiroti, Marco Bardelli, Luca Simonelli, Chiara Francesca Magnani, Andrea Biondi, Ettore Biagi, Sarah Tettamanti, und Luca Varani. 2017. „Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia“. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (8): 1933–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.017>.
- Baron, Jeffrey, und Eunice S. Wang. 2018. „Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia“. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11 (6): 549–59. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1478725>.
- Bonifant, Challice L., Hollie J. Jackson, Renier J. Brentjens, und Kevin J. Curran. 2016. „Toxicity and Management in CAR T-Cell Therapy“. *Molecular Therapy Oncolytics* 3: 16011. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.11>.
- Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti, P. Servida, E. Zappone, L. Ruggieri, M. Ponzoni, u. a. 1997. „HSV-TK Gene Transfer into Donor Lymphocytes for Control of Allogeneic Graft-versus-Leukemia“. *Science (New York, N.Y.)* 276 (5319): 1719–24. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1719>.
- Böyum, A. 1968. „Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. Isolation of Monuclear Cells by One Centrifugation, and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g“. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum* 97: 77–89.
- Brudno, Jennifer N., und James N. Kochenderfer. 2016. „Toxicities of Chimeric Antigen Receptor T Cells: Recognition and Management“. *Blood* 127 (26): 3321–30. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-703751>.
- Büchner, Thomas, Wolfgang E. Berdel, Bernhard Wörmann, Claudia Schoch, Torsten Haferlach, Susanne Schnittger, Wolfgang Kern, u. a. 2005. „Treatment of Older Patients with AML“. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 56 (2): 247–59. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.09.010>.
- Büchner, Thomas, Wolfgang Hiddemann, Wolfgang E. Berdel, Bernhard Wörmann, Claudia Schoch, Christa Fonatsch, Helmut Löffler, u. a. 2003. „6-Thioguanine, Cytarabine, and Daunorubicin (TAD) and High-Dose Cytarabine and Mitoxantrone (HAM) for Induction, TAD for Consolidation, and Either Prolonged Maintenance by Reduced Monthly TAD or TAD-HAM-TAD and One Course of Intensive Consolidation by Sequential HAM in Adult Patients at All Ages with de Novo Acute Myeloid Leukemia (AML): A Randomized Trial of the German AML Cooperative Group“. *Journal of Clinical Oncology: Official*

- Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (24): 4496–4504. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.133>.
- Budde, L. Elizabeth. 2019. „Chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: targeting CD123.“ *1st European CAR T Cell Meeting, Paris, France.*, Februar.
- Budde, L. Elizabeth, Joo Y Song, und Young Kim. 2017. „Remissions of Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Following Treatment with CD123-Specific CAR T Cells: A First-in-Human Clinical Trial“ *Blood* 130 (Supplement 1: 81).
- Burnett, Alan K., Nigel H. Russell, Robert K. Hills, Ann E. Hunter, Lars Kjeldsen, John Yin, Brenda E.S. Gibson, Keith Wheatley, und Donald Milligan. 2013. „Optimization of Chemotherapy for Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results of the Medical Research Council AML15 Trial“. *Journal of Clinical Oncology* 31 (27): 3360–68. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.4874>.
- Casucci, Monica, Benedetta Nicolis di Robilant, Laura Falcone, Barbara Camisa, Margherita Norelli, Pietro Genovese, Bernhard Gentner, u. a. 2013. „CD44v6-Targeted T Cells Mediate Potent Antitumor Effects against Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma“. *Blood* 122 (20): 3461–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-493361>.
- Chen, L., H. Mao, J. Zhang, J. Chu, S. Devine, M. A. Caligiuri, und J. Yu. 2017. „Targeting FLT3 by Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia“. *Leukemia* 31 (8): 1830–34. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.147>.
- Chien, Christopher Daniel, Christopher Tor Sauter, Kazusa Ishii, Sang Minh Nguyen, Feng Shen, Sarah K Tasian, Weizao Chen, Dimiter S Dimitrov, und Terry J Fry. 2016. „Preclinical Development of FLT3-Redirected Chimeric Antigen Receptor T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia“. *Blood* 128 (22): 1072–1072. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1072.1072>.
- Cornelissen, Jan J., Alois Gratwohl, Richard F. Schlenk, Jorge Sierra, Martin Bornhäuser, Gunnar Juliusson, Zdenek Ráčil, u. a. 2012. „The European LeukemiaNet AML Working Party Consensus Statement on Allogeneic HSCT for Patients with AML in Remission: An Integrated-Risk Adapted Approach“. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 9 (10): 579–90. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.150>.
- Cornelissen, Jan J., Wim L. J. van Putten, Leo F. Verdonck, Matthias Theobald, Emanuel Jacky, Simon M. G. Daenen, Marinus van Marwijk Kooy, u. a. 2007. „Results of a HOVON/SAKK Donor versus No-Donor Analysis of Myeloablative HLA-Identical Sibling Stem Cell Transplantation in First Remission Acute Myeloid Leukemia in Young and Middle-Aged Adults: Benefits for Whom?“ *Blood* 109 (9): 3658–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-025627>.
- Creutzig, Ursula, Claudia Rössig, Michael Dworzak, Jan Stary, Arend von Stackelberg, Wilhelm Wössmann, Martin Zimmermann, und Dirk Reinhardt. 2016. „Exchange Transfusion and Leukapheresis in Pediatric Patients with AML With High Risk of Early Death by Bleeding and Leukostasis“. *Pediatric Blood & Cancer* 63 (4): 640–45. <https://doi.org/10.1002/pbc.25855>.
- Cummins, Katherine D., Noelle Frey, und Anne Marie Nelson. 2017. „Treating Relapsed / Refractory (RR) AML with Biodegradable Anti-CD123 CAR Modified T Cells“ *Blood* 130 (Supplement 1: 1359).

- Davila, Marco L., Christopher C. Kloss, Gertrude Gunset, und Michel Sadelain. 2013. „CD19 CAR-Targeted T Cells Induce Long-Term Remission and B Cell Aplasia in an Immunocompetent Mouse Model of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia“. *PloS One* 8 (4): e61338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061338>.
- Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, u. a. 2017. „Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel“. *Blood* 129 (4): 424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- Drent, Esther, Richard W. J. Groen, Willy A. Noort, Maria Themeli, Jeroen J. Lammerts van Bueren, Paul W. H. I. Parren, Jürgen Kuball, u. a. 2016. „Pre-Clinical Evaluation of CD38 Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Multiple Myeloma“. *Haematologica* 101 (5): 616–25. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.137620>.
- Dutour, A., V. Marin, I. Pizzitola, S. Valsesia-Wittmann, D. Lee, E. Yvon, H. Finney, u. a. 2012. „In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia“. *Advances in Hematology* 2012: 683065. <https://doi.org/10.1155/2012/683065>.
- Fathi, Amir T., und Yi-Bin Chen. 2014. „Treatment of Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation“. *Current Hematologic Malignancy Reports* 9 (2): 186–92. <https://doi.org/10.1007/s11899-014-0209-2>.
- Finney, Helene M., Arne N. Akbar, und Alastair D. G. Lawson. 2004. „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“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (1): 104–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104>.
- Fry, Terry J., Nirali N. Shah, Rimas J. Orentas, Maryalice Stetler-Stevenson, Constance M. Yuan, Sneha Ramakrishna, Pamela Wolters, u. a. 2018. „CD22-Targeted CAR T Cells Induce Remission in B-ALL That Is Naive or Resistant to CD19-Targeted CAR Immunotherapy“. *Nature Medicine* 24 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1038/nm.4441>.
- Funaro, Ada, Erika Ortolan, Bruna Ferranti, Lucia Gargiulo, Rosario Notaro, Lucio Luzzatto, und Fabio Malavasi. 2004. „CD157 Is an Important Mediator of Neutrophil Adhesion and Migration“. *Blood* 104 (13): 4269–78. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2129>.
- Gallo, Molly Megan, und Hillard M. Lazarus. 2016. „Midostaurin: An Emerging Treatment for Acute Myeloid Leukemia Patients“. *Journal of Blood Medicine* 7: 73–83. <https://doi.org/10.2147/JBM.S100283>.
- Gargett, Tessa, und Michael P. Brown. 2014. „The Inducible Caspase-9 Suicide Gene System as a ‚Safety Switch‘ to Limit on-Target, off-Tumor Toxicities of Chimeric Antigen Receptor T Cells“. *Frontiers in Pharmacology* 5: 235. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00235>.
- Gee, T. S., K. P. Yu, und B. D. Clarkson. 1969. „Treatment of Adult Acute Leukemia with Arabinosylcytosine and Thioguanine“. *Cancer* 23 (5): 1019–32. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196905\)23:5<1019::aid-cncr2820230506>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196905)23:5<1019::aid-cncr2820230506>3.0.co;2-n).

- Gill, Saar, Sarah K. Tasian, Marco Ruella, Olga Shestova, Yong Li, David L. Porter, Martin Carroll, u. a. 2014. „Preclinical Targeting of Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells“. *Blood* 123 (15): 2343–54. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-529537>.
- Gilliland, D. Gary, und Martin S. Tallman. 2002. „Focus on Acute Leukemias“. *Cancer Cell* 1 (5): 417–20. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00081-8](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00081-8).
- Greaves, Mel. 2003. „Pre-Natal Origins of Childhood Leukemia“. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* 7 (3): 233–45.
- Grimwade, D., H. Walker, F. Oliver, K. Wheatley, C. Harrison, G. Harrison, J. Rees, u. a. 1998. „The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered into the MRC AML 10 Trial. The Medical Research Council Adult and Children’s Leukaemia Working Parties“. *Blood* 92 (7): 2322–33.
- Gross, G., T. Waks, und Z. Eshhar. 1989. „Expression of Immunoglobulin-T-Cell Receptor Chimeric Molecules as Functional Receptors with Antibody-Type Specificity“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (24): 10024–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10024>.
- Grupp, Stephan A., Michael Kalos, David Barrett, Richard Aplenc, David L. Porter, Susan R. Rheingold, David T. Teachey, u. a. 2013. „Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia“. *The New England Journal of Medicine* 368 (16): 1509–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>.
- Herzenberg, L. A., R. G. Sweet, und L. A. Herzenberg. 1976. „Fluorescence-Activated Cell Sorting“. *Scientific American* 234 (3): 108–17. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0376-108>.
- Hills, Robert K., Sylvie Castaigne, Frederick R. Appelbaum, Jacques Delaunay, Stephen Petersdorf, Megan Othus, Elihu H. Estey, u. a. 2014. „Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy in Adult Patients with Acute Myeloid Leukaemia: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from Randomised Controlled Trials“. *The Lancet. Oncology* 15 (9): 986–96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70281-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70281-5).
- Holzinger, Astrid, Markus Barden, und Hinrich Abken. 2016. „The Growing World of CAR T Cell Trials: A Systematic Review“. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 65 (12): 1433–50. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1895-5>.
- Hudecek, Michael, Maria-Teresa Lupo-Stanghellini, Paula L. Kosasih, Daniel Sommermeyer, Michael C. Jensen, Christoph Rader, und Stanley R. Riddell. 2013. „Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (12): 3153–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0330>.
- Jain, Michael D., Christina A. Bachmeier, Vania H. Phuoc, und Julio C. Chavez. 2018. „Axicabtagene Ciloleucel (KTE-C19), an Anti-CD19 CAR T Therapy for the Treatment of Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma“. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 14: 1007–17. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S145039>.
- Jetani, Hardikkumar, Irene Garcia-Cadenas, Thomas Nerreter, Simone Thomas, Julian Rydzek, Javier Briones Meijide, Halvard Bonig, u. a. 2018. „CAR T-Cells Targeting FLT3 Have Potent Activity against FLT3-ITD+ AML and Act

- Synergistically with the FLT3-Inhibitor Crenolanib“. *Leukemia* 32 (5): 1168–79. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0009-0>.
- Jones, Dan. 2010. *Neoplastic Hematopathology, Experimental and Clinical Approaches*. Springer.
- Kaatsch, P, D Gabrow, und C Spix. 2018. „German Child hood Cancer Registry - Annual Report 2017 (1980-2016)“. Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz. http://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/22605/0/bd894cced68c7950a69875dc2588a29281fd6fbc/jb2017_s.pdf.
- Kaspers, Gertjan J. L., Martin Zimmermann, Dirk Reinhardt, Brenda E. S. Gibson, Rienk Y. J. Tamminga, Olga Aleinikova, Hortensia Armendariz, u. a. 2013. „Improved Outcome in Pediatric Relapsed Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Trial on Liposomal Daunorubicin by the International BFM Study Group“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (5): 599–607. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.7384>.
- Kenderian, S. S., M. Ruella, O. Shestova, M. Klichinsky, V. Aikawa, J. J. D. Morrisette, J. Scholler, u. a. 2015. „CD33-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit Potent Preclinical Activity against Human Acute Myeloid Leukemia“. *Leukemia* 29 (8): 1637–47. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.52>.
- Kharfan-Dabaja, Mohamed A., Mehdi Hamadani, Tea Reljic, Rachel Pyngolil, Rami S. Komrokji, Jeffrey E. Lancet, Hugo F. Fernandez, Benjamin Djulbegovic, und Ambuj Kumar. 2013. „Gemtuzumab Ozogamicin for Treatment of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukaemia: A Systematic Review and Meta-Analysis“. *British Journal of Haematology* 163 (3): 315–25. <https://doi.org/10.1111/bjh.12528>.
- Kiyoi, H., T. Naoe, Y. Nakano, S. Yokota, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, u. a. 1999. „Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia“. *Blood* 93 (9): 3074–80.
- Klusmann, Jan-Henning, Frank J. Godinho, Kirsten Heitmann, Aliaksandra Maroz, Mia Lee Koch, Dirk Reinhardt, Stuart H. Orkin, und Zhe Li. 2010. „Developmental Stage-Specific Interplay of GATA1 and IGF Signaling in Fetal Megakaryopoiesis and Leukemogenesis“. *Genes & Development* 24 (15): 1659–72. <https://doi.org/10.1101/gad.1903410>.
- Klusmann, Jan-Henning, Zhe Li, Katarina Böhmer, Aliaksandra Maroz, Mia Lee Koch, Stephan Emmrich, Frank J. Godinho, Stuart H. Orkin, und Dirk Reinhardt. 2010. „MiR-125b-2 Is a Potential OncomiR on Human Chromosome 21 in Megakaryoblastic Leukemia“. *Genes & Development* 24 (5): 478–90. <https://doi.org/10.1101/gad.1856210>.
- Laborda, Eduardo, Magdalena Mazagova, Sida Shao, Xinxin Wang, Herlinda Quirino, Ashley K. Woods, Eric N. Hampton, u. a. 2017. „Development of A Chimeric Antigen Receptor Targeting C-Type Lectin-Like Molecule-1 for Human Acute Myeloid Leukemia“. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112259>.
- Laport, Ginna G., Bruce L. Levine, Edward A. Stadtmauer, Stephen J. Schuster, Selina M. Luger, Stephan Grupp, Nancy Bunin, u. a. 2003. „Adoptive Transfer of Costimulated T Cells Induces Lymphocytosis in Patients with Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma Following CD34+-Selected

- Hematopoietic Cell Transplantation“. *Blood* 102 (6): 2004–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0095>.
- Lee, Daniel W., Rebecca Gardner, David L. Porter, Chrystal U. Louis, Nabil Ahmed, Michael Jensen, Stephan A. Grupp, und Crystal L. Mackall. 2014. „Current Concepts in the Diagnosis and Management of Cytokine Release Syndrome“. *Blood* 124 (2): 188–95. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729>.
- Lee, Yong Gu, Isaac Marks, Madduri Srinivasarao, Ananda Kumar Kanduluru, Sakkarapalayam M. Mahalingam, Xin Liu, Haiyan Chu, und Philip S. Low. 2019. „Use of a Single CAR T Cell and Several Bispecific Adapters Facilitates Eradication of Multiple Antigenically Different Solid Tumors“. *Cancer Research* 79 (2): 387–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1834>.
- Li, Zhong. 2013. „CD133: A Stem Cell Biomarker and Beyond“. *Experimental Hematology & Oncology* 2 (1): 17. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-17>.
- Linette, Gerald P., Edward A. Stadtmauer, Marcela V. Maus, Aaron P. Rapoport, Bruce L. Levine, Lyndsey Emery, Leslie Litzky, u. a. 2013. „Cardiovascular Toxicity and Titin Cross-Reactivity of Affinity-Enhanced T Cells in Myeloma and Melanoma“. *Blood* 122 (6): 863–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490565>.
- Lo Buono, Nicola, Rossella Parrotta, Simona Morone, Paola Bovino, Giulia Nacci, Erika Ortolan, Alberto L. Horenstein, Alona Inzhutova, Enza Ferrero, und Ada Funaro. 2011. „The CD157-Integrin Partnership Controls Transendothelial Migration and Adhesion of Human Monocytes“. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (21): 18681–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227876>.
- Loke, J., J. N. Khan, J. S. Wilson, C. Craddock, und K. Wheatley. 2015. „Mylotarg Has Potent Anti-Leukaemic Effect: A Systematic Review and Meta-Analysis of Anti-CD33 Antibody Treatment in Acute Myeloid Leukaemia“. *Annals of Hematology* 94 (3): 361–73. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2218-6>.
- Loskog, A., V. Giandomenico, C. Rossig, M. Pule, G. Dotti, und M. K. Brenner. 2006. „Addition of the CD28 Signaling Domain to Chimeric T-Cell Receptors Enhances Chimeric T-Cell Resistance to T Regulatory Cells“. *Leukemia* 20 (10): 1819–28. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404366>.
- Malavasi, Fabio, Silvia Deaglio, Rajendra Damle, Giovanna Cutrona, Manlio Ferrarini, und Nicholas Chiorazzi. 2011. „CD38 and Chronic Lymphocytic Leukemia: A Decade Later“. *Blood* 118 (13): 3470–78. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-275610>.
- Mardiros, Armen, Cedric Dos Santos, Tinisha McDonald, Christine E. Brown, Xiuli Wang, L. Elizabeth Budde, Lauren Hoffman, u. a. 2013. „T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects against Human Acute Myeloid Leukemia“. *Blood* 122 (18): 3138–48. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-474056>.
- Mayer, R. J., R. B. Davis, C. A. Schiffer, D. T. Berg, B. L. Powell, P. Schulman, G. A. Omura, J. O. Moore, O. R. McIntyre, und E. Frei. 1994. „Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. Cancer and Leukemia Group B“. *The New England Journal of Medicine* 331 (14): 896–903. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311402>.
- Metzeler, Klaus H., Tobias Herold, Maja Rothenberg-Thurley, Susanne Amler, Maria C. Sauerland, Dennis Görlich, Stephanie Schneider, u. a. 2016. „Spectrum and

- Prognostic Relevance of Driver Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia“. *Blood* 128 (5): 686–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-693879>.
- Morgan, Richard A, James C Yang, Mio Kitano, Mark E Dudley, Carolyn M Laurencot, und Steven A Rosenberg. 2010. „Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2“. *Molecular Therapy* 18 (4): 843–51. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.24>.
- Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, und D. Trono. 1996. „In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector“. *Science (New York, N.Y.)* 272 (5259): 263–67. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>.
- Pang, Yanyu, Xiaoyang Hou, Chunsheng Yang, Yanqun Liu, und Guan Jiang. 2018. „Advances on Chimeric Antigen Receptor-Modified T-Cell Therapy for Oncotherapy“. *Molecular Cancer* 17 (1): 91. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0840-y>.
- Papaemmanuil, Elli, Hartmut Döhner, und Peter J. Campbell. 2016. „Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia“. *The New England Journal of Medicine* 375 (9): 900–901. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1608739>.
- Parigger, J., C. M. Zwaan, D. Reinhardt, und G. J. L. Kaspers. 2016. „Dose-Related Efficacy and Toxicity of Gemtuzumab Ozogamicin in Pediatric Acute Myeloid Leukemia“. *Expert Review of Anticancer Therapy* 16 (2): 137–46. <https://doi.org/10.1586/14737140.2016.1129903>.
- Pizzitola, I., F. Anjos-Afonso, K. Rouault-Pierre, F. Lassailly, S. Tettamanti, O. Spinelli, A. Biondi, E. Biagi, und D. Bonnet. 2014. „Chimeric Antigen Receptors against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in Vivo“. *Leukemia* 28 (8): 1596–1605. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.62>.
- Puumala, Susan E., Julie A. Ross, Richard Aplenc, und Logan G. Spector. 2013. „Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia“. *Pediatric Blood & Cancer* 60 (5): 728–33. <https://doi.org/10.1002/pbc.24464>.
- Reinhardt, D., S. Diekamp, G. Fleischhack, C. Corbacioglu, H. Jürgens, M. Dworzak, G. Kaspers, U. Creutzig, und C. M. Zwaan. 2004. „Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) in Children with Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia“. *Onkologie* 27 (3): 269–72. <https://doi.org/10.1159/000075606>.
- Röllig, Christoph, Hubert Serve, Andreas Hüttmann, Richard Noppeney, Carsten Müller-Tidow, Utz Krug, Claudia D. Baldus, u. a. 2015. „Addition of Sorafenib versus Placebo to Standard Therapy in Patients Aged 60 Years or Younger with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukaemia (SORAML): A Multicentre, Phase 2, Randomised Controlled Trial“. *The Lancet. Oncology* 16 (16): 1691–99. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00362-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00362-9).
- Röllig, Christoph, Hubert Serve, Andreas Hüttmann, Richard Noppeney, Carsten Müller-Tidow, Utz Krug, Claudia D. Baldus, u. a. 2017. „The Addition of Sorafenib to Standard AML Treatment Results in a Substantial Reduction in Relapse Risk and Improved Survival. Updated Results from Long-Term Follow-up of the Randomized-Controlled Soraml Trial.“ *Blood* 130 (Supplement 1: 721). <https://ashpublications.org/blood/article/130/Supplement%201/721/83399/The-Addition-of-Sorafenib-to-Standard-AML?searchresult=1>.
- Sakemura, Reona, Seitaro Terakura, Keisuke Watanabe, Jakrawadee Julamanee, Erina Takagi, Kotaro Miyao, Daisuke Koyama, u. a. 2016. „A Tet-On Inducible System

- for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration“. *Cancer Immunology Research* 4 (8): 658–68. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0043>.
- Santomasso, Bianca D., Jae H. Park, Darin Salloum, Isabelle Riviere, Jessica Flynn, Elena Mead, Elizabeth Halton, u. a. 2018. „Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-Cell Therapy in Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia“. *Cancer Discovery* 8 (8): 958–71. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1319>.
- Sauter, Christopher Tor, Christopher Daniel Chien, Feng Shen, Sarah K Tasian, und Terry J Fry. 2016. „Evaluating On-Target Toxicity of Hematopoietic-Targeting Cars Demonstrates Target-Nonspecific Suppression of Marrow Progenitors“. *Blood* 128 (22): 3357–3357. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.3357.3357>.
- Savoldo, Barbara, Carlos Almeida Ramos, Enli Liu, Martha P. Mims, Michael J. Keating, George Carrum, Rammurti T. Kamble, u. a. 2011. „CD28 Costimulation Improves Expansion and Persistence of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Lymphoma Patients“. *The Journal of Clinical Investigation* 121 (5): 1822–26. <https://doi.org/10.1172/JCI46110>.
- Saxena, Renu. 2019. *Hematopathology: Advances in Understanding*. Springer.
- Schröder, Sarah, M. 2020. „Etablierung einer In Vitro Screeningplattform für individualisiertes Immuntargeting (SPIIT) soldier Tumoren, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin“. Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen.
- Sekeres, Mikkael A., Paul Elson, Matt E. Kalaycio, Anjali S. Advani, Edward A. Copelan, Stefan Faderl, Hagop M. Kantarjian, und Elihu Estey. 2009. „Time from Diagnosis to Treatment Initiation Predicts Survival in Younger, but Not Older, Acute Myeloid Leukemia Patients“. *Blood* 113 (1): 28–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157065>.
- Shank, Brandon R., Bryan Do, Adrienne Sevin, Sheree E Chen, Sattva S. Neelapu, und Sandra B. Horowitz. 2017. „Chimeric Antigen Receptor T Cells in Hematologic Malignancies“. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 37 (3): 334–45. <https://doi.org/10.1002/phar.1900>.
- Siegenthaler, Walter, und Hubert E. Blum, Hrsg. 2006. *Klinische Pathophysiologie*. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-004-134448>.
- Smuga-Otto, K. 2016. „Midostaurin + Chemo Ups AML Survival“. *Cancer Discovery* 6 (2): OF2. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2015-177>.
- Southam, C. M., L. F. Craver, H. W. Dargeon, und J. H. Burchenal. 1951. „A Study of the Natural History of Acute Leukemia with Special Reference to the Duration of the Disease and the Occurrence of Remissions“. *Cancer* 4 (1): 39–59. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195101\)4:1<39::aid-cncr2820040105>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195101)4:1<39::aid-cncr2820040105>3.0.co;2-g).
- Tasian, Sarah K., Saad S. Kenderian, Feng Shen, Marco Ruella, Olga Shestova, Miroslaw Kozlowski, Yong Li, u. a. 2017. „Optimized Depletion of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Murine Xenograft Models of Human Acute Myeloid Leukemia“. *Blood* 129 (17): 2395–2407. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736041>.
- Tettamanti, Sarah, Andrea Biondi, Ettore Biagi, und Dominique Bonnet. 2014. „CD123 AML Targeting by Chimeric Antigen Receptors: A Novel Magic Bullet for AML Therapeutics?“ *Oncoimmunology* 3: e28835. <https://doi.org/10.4161/onci.28835>.

- Tettamanti, Sarah, Virna Marin, Irene Pizzitola, Chiara F. Magnani, Greta M. P. Giordano Attianese, Elisabetta Cribioli, Francesca Maltese, u. a. 2013. „Targeting of Acute Myeloid Leukaemia by Cytokine-Induced Killer Cells Redirected with a Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor“. *British Journal of Haematology* 161 (3): 389–401. <https://doi.org/10.1111/bjh.12282>.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. „Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia“. *New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
- Thiede, Christian, Christine Studel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schäkel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, u. a. 2002. „Analysis of FLT3-Activating Mutations in 979 Patients with Acute Myelogenous Leukemia: Association with FAB Subtypes and Identification of Subgroups with Poor Prognosis“. *Blood* 99 (12): 4326–35. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.12.4326>.
- Union Register of medicinal products - European Commission. 2018a. „EU-Zulassung Kymriah (Tisagenlecleucel)“. 27. August 2018. <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1297.htm>.
- Union Register of medicinal products - European Commission. 2018. „EU-Zulassung Yescarta (Axicabtagene Ciloleucel)“. 27. August 2018. <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1299.htm>.
- Van Schandevyl, Steven, und Tessa Kerre. 2020. „Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Design Improvements and Therapeutic Strategies in Cancer Treatment“. *Acta Clinica Belgica* 75 (1): 26–32. <https://doi.org/10.1080/17843286.2018.1545373>.
- Walker, Alec J., Robbie G. Majzner, Ling Zhang, Kelsey Wanhainen, Adrienne H. Long, Sang M. Nguyen, Paola Lopomo, u. a. 2017. „Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase“. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (9): 2189–2201. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.008>.
- Wang, Jinghua, Siyu Chen, Wei Xiao, Wende Li, Liang Wang, Shuo Yang, Weida Wang, u. a. 2018. „CAR-T Cells Targeting CLL-1 as an Approach to Treat Acute Myeloid Leukemia“. *Journal of Hematology & Oncology* 11 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0553-5>.
- Wang, Quan-shun, Yao Wang, Hai-yan Lv, Qing-wang Han, Hui Fan, Bo Guo, Li-li Wang, und Wei-dong Han. 2015. „Treatment of CD33-Directed Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in One Patient with Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia“. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (1): 184–91. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.164>.
- Watanabe, Keisuke, Seitaro Terakura, Anton C. Martens, Tom van Meerten, Susumu Uchiyama, Misa Imai, Reona Sakemura, u. a. 2015. „Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 ζ Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8⁺ T Cells“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (3): 911–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402346>.
- Wu, Chia-Yung, Kole T. Roybal, Elias M. Puchner, James Onuffer, und Wendell A. Lim. 2015. „Remote Control of Therapeutic T Cells through a Small Molecule-Gated Chimeric Receptor“. *Science (New York, N.Y.)* 350 (6258): aab4077. <https://doi.org/10.1126/science.aab4077>.
- Yeku, Oladapo O., Terence J. Purdon, Mythili Koneru, David Spriggs, und Renier J. Brentjens. 2017. „Armored CAR T Cells Enhance Antitumor Efficacy and

- Overcome the Tumor Microenvironment“. *Scientific Reports* 7 (1): 10541. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10940-8>.
- Yoshida, Tetsumi, Keichiro Mihara, Yoshifumi Takei, Kazuyoshi Yanagihara, Takanori Kubo, Joyeeta Bhattacharyya, Chihaya Imai, Tatsuji Mino, Yoshihiro Takihara, und Tatsuo Ichinohe. 2016. „All-Trans Retinoic Acid Enhances Cytotoxic Effect of T Cells with an Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor in Acute Myeloid Leukemia“. *Clinical & Translational Immunology* 5 (12): e116. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.73>.
- Zhao, Yangbing, Edmund Moon, Carmine Carpenito, Chrystal M. Paulos, Xiaojun Liu, Andrea L. Brennan, Anne Chew, u. a. 2010. „Multiple Injections of Electroporated Autologous T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor Mediate Regression of Human Disseminated Tumor“. *Cancer Research* 70 (22): 9053–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2880>.
- Zwaan, C. Michel, Edward A. Kolb, Dirk Reinhardt, Jonas Abrahamsson, Souichi Adachi, Richard Aplenc, Eveline S. J. M. De Bont, u. a. 2015. „Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (27): 2949–62. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.8289>.

7 Anhang

7.1 Antigene

CD15, ist ein Kohlenhydrat-Struktur-3-Fucosyl-N-Acetyl-Laktosamin Adhäsionsmolekül, es spielt eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion und der daraus folgenden Vermittlung von Phagozytose und Chemotaxis. Exprimiert wird es von Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen. Außerdem auf den Tumorzellen der akuten Leukämien und den Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms.

CD30 (TNFRSF8) ist ein Zellmembranprotein der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor- Rezeptoren (TNFR). Der Rezeptor findet sich vorwiegend auf aktivierten B- und T-Zellen. Nach Interaktion mit dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren 1,2,3 und 5 (TRAF 1,2,3 und 5) kommt es zur Aktivierung des NF- κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) und zu der daraus resultierenden Apoptose. In der Literatur wird beschrieben, dass diese Aktivierung die Proliferation von autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen limitieren kann (Siegenthaler und Blum 2006 S 521 f). CD30 wird von verschiedenen Lymphomen exprimiert und kann zusammen mit CD15 auf den Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin Lymphoms gefunden werden.

CD32 (FCGR2A = FC fragment of IgG receptor 2a) ist ein Oberflächenrezeptorprotein, welches von phagozytären Zellen, wie Makrophagen und Neutrophilen, exprimiert wird und am Abbau von Immunkomplexen beteiligt ist. Zusätzlich wird es von B-Zellen als Ko-Rezeptor exprimiert und reguliert die Signaltransduktion dieser. Die Interaktion zwischen IgG und CD32 resultiert in einer Runterregulierung der Antikörperproduktion. Aufgrund eines Feedback-Mechanismus wird die IgG Produktion der B-Zellen verringert.

CD33 (p67, Siglec-3), ist ein Transmembranrezeptor, der von myeloischen Zellen und teilweise von lymphatischen Zellen exprimiert wird. Er stammt aus der SIGLEC Familie der Lektine und bindet Sialinsäure. CD33 kann die zelluläre Aktivität mittels einem intrazellulären Tyrosin-Immunrezeptor-basierten Motiv

hemmen. CD33 spielt bereits eine wichtige Rolle in der Therapie der AML als Zielantigen des mAB Gemtuzumab Ozogamicin (GO, Handelsname Mylotarg®) welcher in den USA seit 2017 zugelassen ist (Baron und Wang 2018). Die Intensität der Expression von CD33 ist abhängig von der Reifungsstufe der leukämischen Blasten bzw. der hämatopoetischen Zellen und verringert sich im fortgeschrittenen Reifestadium. Das Antigen wurde von allen fünf in dieser Arbeit verwendeten AML-Zelllinien stark exprimiert, ebenso wie CD32.

CD38 (cyclic ADP ribose hydrolase) ein Typ 2 Transmembranglykoprotein mit einer extrazellulären Domäne, welche als Ektoenzym dient. Es katalysiert die Reaktionen von NAD⁺ (nicotinamid adenine dinucleotid) in Nikotinamid und von ADPR (adenosine diphosphate ribose) in zyklisches ADPR. Vorwiegend exprimiert wird es von Leukozyten wie B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen. Des Weiteren spielt es eine Rolle in der Zelladhäsion, in der Signaltransduktion und dem Signalweg von Calcium (die Regulierung von intrazellulärem Calcium benötigt ADPR). CD38 schützt Keimzellen vor Apoptose und ist ein Marker für die Prognose von Leukämien. Bei der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) ist das Auftreten von CD38 mit einer schlechten Prognose assoziiert (Malavasi u. a. 2011). Dieses Antigen wird ebenfalls stark von den fünf AML-Zelllinien dieser Arbeit exprimiert (am schwächsten von HL-60 mit 66 %).

CD56 (NCAM1 = neutral cell adhesion molecule) gehört der Immunoglobulin Superfamilie an und bindet aufgrund seiner Homophilie Glykoproteine. Exprimiert wird das Antigen von hämatopoetischen Zellen, vor allem NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, aktivierten CD8⁺ T-Zellen, dendritischen Zellen und zusätzlich von Neuronen, Gliazellen und Skelettmuskelzellen. Es spielt eine Rolle in der Zelladhäsion (auch während der embryonalen Entwicklung), dem Auswuchs von Neuriten und der Formierung von plastischen Synapsen und hält die Langzeithämatopoese aufrecht. Außerdem ist das Antigen ein prototypischer Marker von NK-Zellen während der Hämatopoese.

CD64 (FCGR1A = Fc fragment of the IgG receptor 1A) ist ein integrales Membranglykoprotein bzw. ein Fc-Rezeptor, welcher monomere IgG AK bindet und dadurch die Funktion einer common- γ -chain erhält, die wiederum eine

Aktivierung von Zellen Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv auslöst. Es kommt auf Makrophagen und Monozyten vor, kann aber nach Behandlung von Leukozyten mit den Zytokinen INF- γ und G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) auch auf deren Oberfläche exprimiert werden.

CD112 (NECTIN2 = nectin cell adhesion molecule 2) ist ein Singlepass-Transmembranprotein Typ 1 (N-Terminus liegt demnach extrazellulär) mit zwei Ig-ähnlichen C2 Domänen und einer Ig-ähnlichen V-Typ Domäne. Es ist Bestandteil von Zell-Zell-Verbindungen und demnach wichtig für die Zelladhäsion. Zusätzlich erhält es die Bezeichnung Poliovirus Rezeptor-ähnliches Molekül, da es Viren (beispielsweise dem Herpes-simplex Virus) bei der Penetration der Zellwand und der Verbreitung des viralen Genoms unterstützt.

CD123 (IL3RA = interleukin 3 receptor subunit α) ist eine Interleukin-3-spezifische Untereinheit eines heterodimeren Zytokinrezeptors. Der Rezeptor besteht aus einer α -Untereinheit, welche den Liganden bindet und der β -Untereinheit für die Signaltransduktion. Beide Untereinheiten binden IL-3, wodurch die β -Untereinheit aktiviert und die Signaltransduktion ausgelöst wird. Durch die Signaltransduktion werden Zellwachstum und Differenzierung dieser ausgelöst. Vorwiegend exprimiert wird CD123 auf basophilen Granulozyten und plasmatischen Dendritischen Zellen (zu einer geringen Menge kann es auch auf Eosinophilen, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Monozyten und myeloischen Dendritischen Zellen vorkommen). Es gibt bereits mehrere Studien zu anti-CD123 CAR-T-Zellen als Therapieoption für AML Patienten (Mardiros u. a. 2013; Tettamanti u. a. 2014). Am „City of Hope National Medical Center“ der USA haben bereits zwölf AML Patienten im Rahmen einer Studie gegen CD123 gerichtete CAR-T-Zellen erhalten. Die Studie wurde im Rahmen des ersten Europäischen CAR-T-Zell Meetings 2019 in Paris vorgestellt (Budde 2019). CD123 ist auf allen fünf getesteten AML-Zelllinien dieser Arbeit stark exprimiert, außer auf Kasumi-1 (16 %).

CD133/1 (PROM1 = prominin 1) ist ein Transmembranglykoprotein. Der CD133/1 AK bindet das Epitop 1 des CD133 Antigens. Es dient der Aufrechterhaltung von

Stammzeleigenschaften durch die Unterdrückung der Differenzierung in adulte Stammzellen. Die Expression dieses Antigens ist mit verschiedenen malignen Erkrankungen vergesellschaftet (Li 2013).

CD133/2 ist ebenso ein 5-Transmembranoberflächenantigen wie CD133/1. Der CD133/2 AK ist demnach gegen das Epitop 2 des CD133 Antigen gerichtet.

CD135 (FLT-3 = fms like tyrosine kinase 3 bzw. Receptor-type tyrosin-protein-kinase FLT3) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase der Klasse 3 Zytokinrezeptoren und bindet den FLT-3 Liganden. Es ist an der Entwicklung und Reifung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt und logischerweise auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. FLT-3 ist eines der am häufigsten mutierten Gene bei der AML und die Mutationsrate scheint mit einer schlechteren Prognose zu korrelieren (Kiyoi u. a. 1999; Thiede u. a. 2002). Bei Bindung des Liganden bildet CD135 einen homodimeren Komplex und die Kinasefunktion wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Die aktivierte Tyrosinkinase induziert mehrere Signaltransduktionswege durch Phosphorylierung von Effektormolekülen. Die Signale sind wichtig für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Lymphozyten.

CD157 (BST1 oder ADP ribosylcyclase 2) ist ein mit Glykosylphosphatidylinositol (= GPI) verankertes Protein, ähnlich CD38, welches meistens von Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Der Rezeptor spielt eine große Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts und bei Veränderungen der Zellform. Die durch CD157 vermittelten Signale entstehen durch die Modulation der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration. Verschiedenen Quellen zufolge ist die Aktivität des Rezeptors von der Interaktion zwischen CD157 und $\beta 2$ -Integrin (= CD18) abhängig (Funaro u. a. 2004; Lo Buono u. a. 2011). CD157 scheint außerdem bei der Adhäsion an der extrazellulären Matrix von Neutrophilen Granulozyten beteiligt zu sein. Exprimiert wird CD157 auch von B- und T-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und anderen Granulozyten.

CD276 (B7-H3) reguliert die Immunantwort von T-Zellen. Es handelt sich um ein Checkpoint Molekül, welches auf soliden Tumoren und anderem Tumorgewebe,

jedoch auch omnipräsent auf gesundem Gewebe vorkommt. Bei CD276 FAB (2) handelt es sich lediglich um das FAB (2) Fragment eines spezifischen Antikörpers für CD276, nicht um den ganzen Antikörper. Das FAB-(2)-Fragment löst aufgrund des fehlenden FC-Fragments keine zytotoxische Reaktion durch die Aktivierung des Komplementsystems aus. Für Kasumi-1 wurden keine Daten für das FAB (2) Fragment erhoben.

CD305 (LAIR-1 = leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1) ist ein hemmender Rezeptor auf mononuklearen Zellen (B-, T- und NK-Zellen, Basophile und Eosinophile Granulozyten, Monozyten, monozytäre Dendritische Zellen und Mastzellen), welche durch die Regulation der Immunantwort die Zelllyse vermitteln. Dies geschieht über eine Vernetzung zwischen CD305 und z.B. NK-Zellen, wodurch die Zelllyse von aktivierten und inaktivierten NK-Zellen gehemmt wird. Durch den Crosslink mit CD3 wird die zytotoxische Aktivität von T-Zellen verhindert. Durch CD305 kann die Ig- und Zytokinproduktion von B-Zellen herunterreguliert werden.

CLL-1 (CD371 oder CLEC12A = c-type lectin domain family 12 member A) ist der CTL/CTLD (= c-type lectin/ c-type lectin domain) Superfamilie zugehörig, die eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Signaltransduktion von Glykoproteinen und der Vermittlung der Immunantwort oder der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Es hemmt zudem die Funktionen von Granulozyten und Monozyten.

CD44v6 ist eine Isoform von CD44 und vermittelt die Interaktion und Adhäsion von Zellen, Aktivierung von Lymphozyten, Migration und Homing und spielt eine Rolle im Ablauf der Hämatopoese und Metastasierungsvorgängen. CD44 interagiert mit Hyaluronsäure, Osteoponin, Kollagen und Matrix Metalloproteasen. In Tumoren scheint CD44 in Vorgängen der Proliferation, Differenzierung, Migration, Angiogenese, Überleben der Tumorzellen und die Präsentation von Chemokinen und Zytokinen mitbeteiligt zu sein. CD44v6 ist vor allem auf hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten exprimiert. Für Kasumi-1 wurden keine Daten erhoben.

CD96 (Tactile = T-cell activation, increase late expression) ähnelt CD226 und wird von T- und NK-Zellen exprimiert. Der Rezeptor gehört als Typ 1 Transmembranglykoprotein der Immunoglobulin Superfamilie an. Die Funktionsweise ist noch nicht völlig geklärt, jedoch scheint CD96 an der Antigenpräsentation und Adhäsion von aktivierten T- und NK-Zellen beteiligt zu sein. Für Kasumi-1 wurden keine Daten erhoben.

Antigenliste zusammengestellt mittels Lehrbuchliteratur und Informationen über die einzelnen Antigene durch unseren Kooperationspartner Miltenyi Biotec. (Jones 2010) (Saxena 2019) („Antibodies - Miltenyi Biotec - USA“)

7.2 Protokolle

7.2.1 Virusherstellung

Transfektion: Die HEK293 T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion aufgetaut. Bis zur Transfektion wurden sie im Stickstofftank der Kinderklinik kryokonserviert. Es wurden jeweils $1,5 \cdot 10^7$ Zellen in 20ml Standardlösung ohne Pen/Strep in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu 70-90% konfluent gewachsen sein. Kultiviert wurden die HEK293 T-Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Mittels Lipofectamin wurde die Transfektion der HEK293 T-Zellen erleichtert. Lipofectamin bildet doppelschichtige Lipidhüllen um die zu transportierenden Plasmide und durch Verschmelzung der Lipidvesikel mit der Zellmembran können die Plasmide in das Zytoplasma der HEK293 T-Zellen eindringen. Im Folgenden wird das angepasste Herstellerprotokoll für eine T175 Zellkulturflasche gezeigt:

Lösung A: 4 ml Opti MEM + 9,4 µg Plasmid A + 39,2 µg Plasmid B + 31,4 µg Plasmid C

Lösung B1: 2 ml Opti MEM + 64 µl Lipofectamin – gut vortexen

Lösung B2: 2 ml Opti MEM + 130 µl Lipofectamin – gut vortexen

Die eine Hälfte der Lösung A mit der Lösung B1 und die andere Hälfte mit der Lösung B2 mischen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

Währenddessen das Kulturmedium von den HEK293 T-Zellen entfernen

Nach den 15 min 19 ml DMEM Medium und die inkubierten Lösungen A/B1 und A/B2 in die T175 Zellkulturflasche zu den HEK293 T-Zellen hinzugeben

Die transfizierten Zellen werden im Brutschrank gelagert und nach 6 h wird 3 ml FCS h.i. hinzugegeben

Nach 24 h, 48 h und 72 h werden die Viren durch Abnahme des Zellkulturmediums und Ersatz mit 20 ml VLE DMEM geerntet. Dem VLE DMEM wurden 10 % FCS h.i. und 1 mM HEPES hinzugefügt

Virusernte: Wie bereits oben erwähnt, wurden die Viren nach 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion geerntet. Nachdem das Medium durch VLE DMEM ersetzt wurde, fanden die folgenden Schritte unter Kühlung statt.

Die Überstände, welche beim Austausch des Zellkulturmediums anfallen, werden in 50 ml Falcons überführt und bei 4°C und 500g für 10 min zentrifugiert um eventuelle Zellreste zu entfernen. In diesem Überstand sind die viralen Vektoren enthalten.

Der Überstand wird im Anschluss an die Zentrifugation durch einen 0,45 µm Filter in ein frisches Falcon überführt.

Nach Filtration wird der Überstand mit dem LentiX-Concentrator Reagent im Verhältnis 1:4 gemischt und über ca. 12 h inkubiert.

Nach der Inkubation wird der Überstand bei Programm 8 zentrifugiert

Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das angefallene Viruspellet in 4 °C kühlem PBS resuspendiert

Der Virustiter wird durch Aufnahme in einem Hundertstel des ursprünglichen Volumens auf das 100-fache aufkonzentriert

Für die Kryokonservierung die Virussuspension in 100 µl pro Kryoröhrchen aliquotieren

7.2.2 AdCAR-T-Zell Expansion:

Tag 0: Gewinnung und Stimulation der T-Zellen gesunder Spender

Blutentnahme: Die Blutentnahme erfolgt mittels 50 ml Spritzen, welchen 0,1 ml Natrium-Heparin pro 10 ml Vollblut zugesetzt wurden

Dichtegradientenzentrifugation/Ficoll: Das Blut wird im Verhältnis 1:1 mit sterilem PBS gemischt (keine Kühlung notwendig, Raumtemperatur ausreichend). Jeweils ein 50 ml Falcon wird mit 20 ml steriler Biocoll-Lösung befüllt und in jedes Falcon vorsichtig 30 ml Blut/Biocoll Gemisch pipettiert. *CAVE:* Mischung der Phasen unbedingt verhindern. Anschließend erfolgt die Zentrifugation mit Programm 1. Nach der ersten Zentrifugation werden die PBMC (Ring überhalb der Biocoll Phase) abpipettiert und in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Das restliche Volumen mit PBS auffüllen und mit Programm 2 zentrifugieren. Nach erfolgter zweiter Zentrifugation, Überstand entfernen und verwerfen. Pellet in PBS resuspendieren und Volumen abermals mit PBS auf 50 ml auffüllen. Es erfolgt eine letzte Zentrifugation, diesmal mit Programm 3. Danach die Zellen mit RPMI Medium resuspendieren und in insgesamt 10 ml Volumen aufnehmen. Die Zellen nach Aufnahme in RPMI Medium mithilfe ADVIA zählen.

MACS CD4⁺/CD8⁺: Die benötigte Zellzahl (50 % der PBMC T-Zellen, CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis ca. 2:1) entnehmen und mit Programm 5 zentrifugieren. Danach den Überstand entnehmen und das Zellpellet in kaltem (Kühlschranktemp.) MACS Puffer resuspendieren. Benötigtes Volumen MACS Puffer berechnet sich wie folgt: 100 µl pro 10⁷ Zellen. Pro 10⁷ Zellen 20 µl anti-CD8 Microbeads hinzugeben, gut mischen und für bei 4°C für 15 min inkubieren lassen. Im Anschluss mit ca. 1-2 ml MACS Puffer zentrifugieren und Überstand entfernen. LS Säule mittels MACS Magneten fixieren und mit 3 ml MACS Puffer spülen. Nach der Spülung die Zellsuspension mit den T-Zellen in die Säule geben. Die unmarkierten Zellen, darunter die CD4-positiven T-Zellen, unterhalb der Säule mit einem 50 ml Falcon auffangen. Anschließend insgesamt drei Mal je 3 ml MACS Puffer in die Säule geben, bis der Puffer ganz durchgelaufen ist. Die Säule über einem frischen Falcon aus dem Magnet entfernen und weitere 5 ml des

MACS Puffers in die Säule geben. Die markierten Zellen werden mit dem restlichen MACS Puffer mittels eines Stempels in das frische Falcon überführt. Die CD8-positiven T-Zelle im Falcon zählen und insgesamt dreimal mit je 50 ml RPMI Medium zentrifugieren, um eventuelle EDTA Reste zu entfernen. Mit den unmarkierten Zellen werden alle Schritte nach Zugabe von anti-CD4 Microbeads wiederholt.

Stimulation: Die mittels MACS Verfahren gewonnenen T-Zellen werden in eine 24kV Zellkulturplatte überführt. Pro kV werden je 1 Mio CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in insgesamt 2 ml Stammlösung/Medium aufnehmen und in jedes kV 20 µl TransAct zugeben.

Tag 1: Transduktion der T-Zellen

Die Zentrifuge wird auf 32 °C vorgeheizt und zur Ausbalancierung eine Tara Platte vorbereitet. Pro kV werden jeweils 1 ml Medium entfernt. *CAVE:* T-Zellen nicht aspirieren. In jedes zu transduzierende kV werden je 50 µl Virusüberstand pipettiert und im Anschluss mit Programm 7 zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen zurück in den Inkubator gestellt und für zwei Tage kultiviert und expandiert.

Tag 3: Verdünnung des TransAct

Am dritten Tag wird aus jedem kV 0,5 ml Medium entnommen und im S2 Müll entsorgt. *CAVE:* Zellen nicht aspirieren. Zu dem Restvolumen von 0,5ml pro kV wird warmes Medium bis zur kompletten Füllung der kV hinzugegeben.

Tag 4: Verdreifachung des Mediums

Für die Expansion und Kultivierung der transduzierten T-Zellen wird das Medium am vierten Tag verdreifacht.

Tag 7: Anreicherung und Quantifizierung des AdCAR-T-Zellen

LNGFR MACS: Dieses Verfahren entspricht dem des an Tag 0 durchgeführten CD4⁺/CD8⁺ MACS Verfahren. Dabei werden jedoch LNGFR-positive Microbeads verwendet. Die dabei anfallenden unmarkierten Zellen können im Anschluss

verworfen worden. Die positiv selektierten T-Zellen werden zentrifugiert und anschließend in 1 ml warmem Medium pro 1 Mio Zellen aufgenommen.

Durchflusszytometrischer Nachweis der LNGFR-positiven T-Zellen: Der Nachweis der transduzierten AdCARs erfolgt indirekt über den Nachweis von LNGFR mittels Durchflusszytometrie. Dies wird durch die äquimolare Koexpression der Proteine gewährleistet. Für den Nachweis werden ungefärbte MOCK-T-Zellen (*unstained* Probe), mit Mastermix angefärbte MOCK-T-Zellen (MOCK) und transduzierte, mit Mastermix gefärbte AdCAR-T-Zellen benötigt. Für die Ansätze MOCK und AdCARs werden je 0,25 Mio Zellen in je ein FACS Röhrchen gefüllt und mit je 2 ml kaltem MACS Puffer mit Programm 4 zentrifugiert. Für den Mastermix werden pro Röhrchen 3 µl anti-CD4 BUV395, 5 µl anti-CD8 APC vio 770 und 5 µl anti-LNGFR FITC gemischt und gevortext. Die zentrifugierten MOCK-Zellen und AdCARs werden in 50 µl MACS Puffer resuspendiert und mit je 13 µl Mastermix pro Röhrchen für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Das Ganze wird abermals mit je 2 ml kaltem MACS Puffer mit Programm 4 zentrifugiert. Anschließend kann die Messung analog der im Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt werden.

Tag 9: Expansion der AdCAR-T-Zellen

Die Zelldichte sollte während der gesamten Zeit der Expansion auf 1 Mio AdCARs pro ml eingestellt sein. Das Medium kann, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der AdCARs, alle zwei Tage verdoppelt oder zur Hälfte durch frisches Medium ersetzt werden.

7.2.3 Antigen screening der AML-Tumorzelllinien, Sekundärfärbung

- Zellzählung und Überführen von je 250.000 Zellen in FACS-Röhrchen.
- Verdünnung der Zellen pro FACS-Röhrchen mit je 2 ml kaltem MACS Puffer.
- Zentrifugation der Zellen mit Programm 4 und komplette Entfernung des Überstandes

- Die Zellen werden in je 50 µl MACS Puffer pro Röhrchen resuspendiert und mit je 1 µl humanem IgG (c = 10%), welcher als FcR-Block dient, versehen.
- Zuerst den primären AK hinzufügen und die gesamte Suspension vortexen.
- Die Zellsuspension wird 15 min bei 4°C inkubiert und im Anschluss mit je 2 ml MACS Puffer (auch 4°C) verdünnt. Im Anschluss das Ganze wieder mit Programm 4 zentrifugieren und den kompletten Überstand abermals entfernen.
- Die gesamten Zellen in 50 µl MACS Puffer aufnehmen und je 2,5 µl anti-Biotin-AK (=FITC) dazugeben. Suspension vortexen.
- Inkubation der Suspension wieder bei 4°C für 15 min.
- Nach der Inkubation mit je 2 ml MACS Puffer (4°C) verdünnen und mit Programm 4 zentrifugieren.
- Gesamten Überstand nach Zentrifugation verwerfen, restliche Suspension vortexen. Im direkten Anschluss erfolgt die Messung mittels Durchflusszytometrie.

7.2.4 Luciferase-basierte Zytotoxizitätstests

Entsprechend dem unten gezeigten Schema wurden die Luciferase-basierten Zytotoxizitätstests durchgeführt. Das Schema wurde für die verschiedenen Versuche an die Anzahl der Antigene, den Einsatz vor AdCARs und dem E:T Verhältnis entsprechend verändert und angepasst. Bei allen Versuchen blieben die Reihen 1, 8 und 12 Kontrollen, welche nur aus Targets, Medium und Luciferrin bestanden. In den Reihen 9-11 befand sich bei jedem Versuch die Titrationsreihe. Für die Versuche mit AdCARs wurde pro Platte jeweils eine Dreierreihe mit AdCARs ohne Antigenzugabe als zusätzliche Kontrolle verwendet, um die unspezifische Lyse durch die AdCARs abschätzen zu können. Diese Kontrolle bestand aus 50µl AdCARs + 50µl Zielzellen/Targets + 50µl Medium + 50µl Luciferrin.

Luciferase kill												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control: 100µl Media + 50µl target + 50µl luciferin	50µl CD33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 10:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 10:1) + 50µl luciferin				Control: 100µl Media + 50µl target + 50µl luciferin		100µl Media + 50µl 100% Target + 50µl luciferin	Control: 100µl Media + 50µl target + 50µl luciferin		
B		50µl CD33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 5:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 5:1) + 50µl luciferin						100µl Media + 50µl 75% Target + 50µl luciferin			
C		50µl CD33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 2,5:1) + 50µl luciferin	50µl Media+ 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 2,5:1) + 50µl luciferin						100µl Media + 50µl 50% Target + 50µl luciferin			
D		50µl CD 33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 1:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 1:1) + 50µl luciferin						100µl Media + 50µl 25% Target + 50µl luciferin			
E		50µl CD33 + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,5:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,5:1) + 50µl luciferin						100µl Media + 50µl 10% Target + 50µl luciferin			
F		50µl CD33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,25:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,25:1) + 50µl luciferin						MEDIUM 150µl + LUCIFERIN ONLY 50µl			
G		50µl CD33 mAB + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,1:1) + 50µl luciferin	50µl Media + 50µl Target+ 50µl Effector (E:T 0,1:1) + 50µl luciferin						control:100µl Media + 50µl Target + 50µl luciferin			
H		control:100µl Media + 50µl Target + 50µl luciferin	control:100µl Media + 50µl Target + 50µl luciferin						control:100µl Media + 50µl Target + 50µl luciferin			

Tumormedium:	Effector cells: CARS	Target cells:	Luciferin:
500ml RPMI 1640 (Biochrom) + 20% heat inactivated FCS (50ml) + 1mM Natrium-Pyruvat + 100 U/ml \triangle 100µg/ml Pen/Strep (5ml) + 1% L-Glut (5ml)	Donor: x Thawing date: x No of passages: x Last passage: x Appearance ok?	Cell line: x- LUCmCherry Thawing date: x No of passages: x Last pasage: Appearance ok?	Stock: 10mg in 25ml DMSO Stockconcentration: 400µg/µl bzw. 0,4mg/ml Dilution: 1:100; 50µl with 5ml of media, 1:4 in well Well concentration: 1:400; 4µg/ml bzw. 0,004mg/ml Storage in 55 µl aliquots (-20°C)

7 times Luciferin
needed: 35ml required
and 7 aliquots luciferin =
350µl luciferin

E:T-Ratio

How to do: inclusive AdCARS only Kontrolle! Total: 26,775 mio (for example)			
10:1 Effector cells:	=500.000 /50µl	--> gesamt: 24,5 mio in 2450µl	
5:1 Effector cells:	=250.000 /50µl	--> gesamt: 12,25 mio in 2450µl	
2,5:1 Effector cells:	=125.000 /50µl	--> gesamt: 6,125 mio in 2450µl	
1:1 Effector cells:	= 50.000 /50µl	--> 2,45 mio in 2450µl	
0,5:1 Effector cells:	= 25.000 /50µl	-->1,225mio in 2450µl	
0,25:1 Effector cells:	= 12500 /50µl	-->0,6125mio in 2450µl	
0,1:1 Effector cells:	= 5.000 /50µl	-->0,245mio in 2450µl	
1. Take "Volume from Stock"	2. centrifuge (Prog. 9)	3. exchange and resuspend with "volume of wells"	4. ready for use

Target dilution:

Usual target concentration = 1×10^6 /ml = 50.000 /50µl = 100% Target

1. Take "Volume from Stock" 2. centrifuge (Prog. 9) 3. exchange and resuspend with (volume of wells) 4. ready for use

5. Take "Volume from Stock" and place into wells

6. Add 350µl media and tke 50µl of this dilution

7. Add 700µl media and tke 50µl of this dilution

8. Add 1050µl media and tke 50µl of this dilution

9. Add 1260µl media and tke 50µl of this dilution

Targets with Titration TOTAL (for every cell line!!!)

calculated for 113 wells in total: 5,65 mio cells in 5650µl

Media for mAB TOTAL (20 µl + 980 µl media) -->per Plate: 16mAB possible

10 mAB:10ml media required -->media in 15 ml Falcon

8 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit entstand unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Lang und in Zusammenarbeit mit Dr. med. Christian Seitz und Dr. med. Patrick Schlegel an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen.

Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Sarah M. Schröder eigenständig durchgeführt. Die Einarbeitung erfolgte durch die Labormitglieder der AG Lang. Die wichtige Vorarbeit für die Versuche, wie bspw. Die Zellsortierung der mCherry-positiven Tumorzellen, wurde von Stephanie Zug, MTA, geleistet.

Die Auswertung der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit und nach Anleitung durch Dr. med. Patrick Schlegel.

Hiermit versichere ich, die Versuche eigenständig durchgeführt zu haben und die Verfasserin dieses Manuskriptes zu sein. Die von mir verwandten Quellen wurden alle zitiert oder entsprechen dem aktuellem Lehrbuchwissen.

Esslingen, den 05.09.2020

9 Danksagung

Besonderer Dank geht an die AG Lang, welche mich während der gesamten Durchführung dieser Arbeit unterstützt und gefördert haben. Insbesondere hervorzuheben sind mein Doktorvater Prof. Dr. med. Peter Lang, Dr. med. Christian Seitz und Dr. med. Patrick Schlegel.

Ich bedanke mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner Miltenyi Biotec und für die Unterstützung des Studienkollegs IZKF der Universitätsklinik Tübingen.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Sarah Schröder. Ohne dich wäre meine Arbeit in diesem Umfang nicht zustande gekommen. Vielen Dank für die großartige Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Felix Kettemann, der mich vor allem während der Schreibphase unterstützt und motiviert hat, diese Arbeit zu Ende zu bringen.