

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Prof. Dr. Konrad Reinshagen

***In vitro* Vergleich bispezifischer GD2-Antikörperkonstrukte und GD2-CAR-T Zellen gegen Neuroblastomzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Nadia Paasburg
aus Hamburg

Hamburg 2022

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.03.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Nolte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Konrad Reinshagen

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Lokalisation und klinische Symptome	1
1.1.4 Diagnostik	2
1.1.5 Einteilung in Krankheitsstadien und Risikogruppen	3
1.1.6 Therapie.....	3
1.1.6.1 Operative Therapie.....	4
1.1.6.2 Chemotherapie.....	4
1.1.6.3 ¹³¹ I-mIBG Therapie.....	5
1.1.6.4 Strahlentherapie	5
1.1.6.5 Immuntherapie	6
1.1.6.6 Neuartige Therapieansätze	6
1.1.7 Prognose.....	7
1.2 Tumor-Immunoediting.....	8
1.3 Problem der Therapieresistenz: das Tumor-Mikroenvironment	8
1.4 Die Rolle des GD2.....	9
1.4.1 Biochemische Eigenschaften	10
1.4.2 GD2 als Target für monoklonale Antikörper	10
1.4.3 GD2 als Target für CAR-T Zellen und bispezifische Antikörper	11
1.5 Die Entwicklung und Funktion der T-Zelle	15
1.6 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Geräte und Softwareprodukte.....	18
2.2 Materialien	18
2.3 Chemikalien/Reagenzien/Puffer	19
2.4 Fluoreszenzantikörper	20
2.5 Biologisches Material.....	20

2.6	Zellkultur	21
2.7	Zellkultivierung.....	21
2.7.1	Bestimmung der Zellzahl.....	22
2.8	Verwendung der CAR-T Zellen und aktivierten T-Zellen	23
2.9	Lagerung der bispezifischen Antikörper.....	23
2.10	Quantifizierung von GD2 auf der Oberfläche der Tumorzellen	24
2.11	Vorversuche	24
2.11.1	Lymphozytenisolation mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	25
2.11.2	Untersuchung der passenden Konzentration der bispezifischen Antikörper.....	26
2.12	Durchflusszytometrische Untersuchung von Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen.....	26
2.12.1	Bestimmung der korrekten PHA-Konzentration	27
2.12.2	Fluoreszenz Minus One Kontrollen (FMO).....	27
2.12.3	Versuchsaufbau	27
2.12.4	Oberflächenfärbung der Effektorzellen.....	30
2.12.5	Auswertung der Ergebnisse und Gating-Strategie	31
2.13	Analyse der Zytokinausschüttung der Effektorzellen	33
2.13.1	Versuchsaufbau	34
2.13.2	Messung der Proben im Durchflusszytometer	36
2.13.3	Auswertung der Zytokinprofile.....	36
2.14	Bestimmung der Tumorviabilität mittels Luciferaseassay	36
2.14.1	Versuchsaufbau	37
2.14.2	Messung der Mikrotiterplatten im Mikroplattenreader	38
2.14.3	Auswertung der Tumorviabilität.....	38
2.15	Statistik.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Verteilung der GD2-Oberflächenmoleküle je nach Tumorzelllinie	42
3.2	Titration der bispezifischen Antikörper.....	44
3.3	Aktivierung der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien	45
3.3.1	Expression von CD25 ⁺	46
3.3.2	Expression von CD69 ⁺	49
3.3.3	Expression von CD25 ⁺ /CD69 ⁺	52
3.4	Zytokinausschüttung der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien.....	56
3.4.1	Stimulation mit LS	56

3.4.2	Stimulation mit LAN-1	60
3.5	Proliferation der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien	64
3.6	Vergleich der lytischen Wirkung der Behandlungsansätze auf NB-Zelllinien	67
3.6.1	Viabilität der Tumorzellen nach 48 Stunden bei unterschiedlichen E/T-Ratios und Behandlungsansätzen.....	67
3.6.2	Tumorviabilität im Zeitverlauf: Vergleich unterschiedlicher E/T-Ratios je nach Behandlung	69
3.6.2.1	LS.....	70
3.6.2.2	LAN-1	71
3.6.2.3	SHSY5Y	72
3.6.3	Tumorviabilität im Zeitverlauf: Vergleich unterschiedlicher Behandlungen je nach E/T-Ratio	74
3.6.3.1	LS.....	74
3.6.3.2	LAN-1	76
3.6.3.3	SHSY5Y	78
4	Diskussion.....	80
4.1	GD2 als potentes Target für immuntherapeutische Strategien	80
4.2	Funktionalität und Effektivität der bispezifischen GD2-Antikörper	82
4.3	Die Effektorzellfunktion: Vergleich der Aktivierung und Proliferation	83
4.3.1	CD3-GD2	84
4.3.2	CD28-GD2	86
4.3.3	Kombinationstherapie CD3-GD2 + CD28-GD2.....	87
4.3.4	CAR-T Zellen	88
4.3.5	Außerordentliche Proliferation der Effektorzellen.....	91
4.3.6	Stellenwert der Unterscheidung zwischen CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen	93
4.4	Das Problem des Zytokinsturmes.....	94
4.5	Die Tumorlyse als Maß der Therapieeffektivität	95
4.6	Allgemeiner Vergleich von CAR-T Zellen und bispezifischen Antikörpern..	97
4.7	Weiterführende Therapieoptionen	99
4.8	Abschließende Gegenüberstellung beider Therapieansätze	100
5	Zusammenfassung	103
6	Abstract	104
	Literaturverzeichnis	105

Danksagung.....	116
Eidesstattliche Erklärung	117

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Engl. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = Antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ALL	Akut Lymphatische Leukämie
aTc	Engl. Activated T cell = aktivierte T-Zelle
BCMA	B-Zell Maturation Antigen
CAR	Engl. Chimeric antigen receptor = chimärer Antigenrezeptor
CD	Engl. Cluster of differentiation = Differenzierungsantigene
E/T-Ratio	Effektorzell-/Tumorzell-Ratio
EFS	Engl. Event-free survival = Ereignisfreies Überleben
FCM	Engl. Flow cytometry = Durchflusszytometrie
FMO	Engl. Fluorescence minus one
FSC	Engl. Forward Scatter = Vorwärts-Streulicht
FVS	Fixable Viability Stain
GD2	Disialogangliosid 2
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor
HAMA	Humane Anti-Maus Antikörper
IDRF	Engl. Image defined risk factors = Bild definierte Risikofaktoren
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
INPN	International Neuroblastoma Pathological Classification
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IPT	Immunphänotypisierung
LDH	Laktatdehydrogenase
mAK	Monoklonale Antikörper

MFI-R	Engl. Median fluorescence intensity - ratio = Mediane Fluoreszenzintensitäts - Ratio
MHC	Engl. Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
NB	Neuroblastom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OS	Engl. Overall survival = Gesamtüberleben
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PHA	Phytohemagglutinin
RLU	Relative Lichteinheit
RPM	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	Engl. Side Scatter = Seitwärts-Streulicht
TCR	T-Zellrezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSA	Tumorspezifisches Antigen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Aufbau der CARs der ersten, zweiten und dritten Generation.....	12
Abbildung 2: Aufbau eines bispezifischen Antikörpers	14
Abbildung 3 : Lymphozytenisolierung mittels Ficoll	25
Abbildung 4: Exemplarische Gatingstrategie.....	32
Abbildung 5: Gating Strategie: Differenzierung der Populationen je nach CD4 und CD8.....	32
Abbildung 6: Gatingstrategie der Proliferation	33
Abbildung 7: Vorbereitung der Capture Beads und des Detection Reagents	35
Abbildung 8: Darstellung der Lumineszenzabnahme und daraus resultierende Korrekturformel im Zytotoxizitätsassay	39
Abbildung 9: Berechnung des Korrekturfaktors der Lumineszenz.....	39
Abbildung 10: Lyseformel auf Grundlage der Verdünnungsreihe	40
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der GD2-Expression auf NB-Zelllinien.....	42
Abbildung 12: Overlay-Darstellung des Bindungsvermögens von Anti-GD2 Antikörpern bei NB-Zelllinien im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle.	43
Abbildung 13: Viabilität der NB-Zelllinie LS in Abhängigkeit von bispezifischen Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen.....	44
Abbildung 14: Pilotexperiment zur Untersuchung der zeitlichen Expression von CD25 ⁺ , CD69 ⁺ und CD25 ⁺ /CD69 ⁺ bei unterschiedlichen Behandlungsansätzen im Zeitverlauf für die Zelllinie LAN-1	45
Abbildung 15: Expression von CD25 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS	46
Abbildung 16: Expression von CD25 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1	47
Abbildung 17: Expression von CD25 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y	48
Abbildung 18: Expression von CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS	49
Abbildung 19: Expression von CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1.....	50

Abbildung 20: Expression von CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y	51
Abbildung 21: Expression von CD25 ⁺ /CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS.....	52
Abbildung 22: Expression von CD25 ⁺ /CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1	53
Abbildung 23: Expression von CD25 ⁺ /CD69 ⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y	55
Abbildung 24: Ausschüttung von IFN- γ bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS	56
Abbildung 25: Ausschüttung von IL-2 bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS	58
Abbildung 26: Ausschüttung von TNF- α bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS	59
Abbildung 27: Ausschüttung von IFN- γ bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1.....	60
Abbildung 28: Ausschüttung von IL-2 bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1.....	61
Abbildung 29: Ausschüttung von TNF- α bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1.....	62
Abbildung 30: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS.....	64
Abbildung 31: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1	65
Abbildung 32: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y	66
Abbildung 33: Viabilität der NB-Zelllinie LS nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen	67
Abbildung 34: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen	68
Abbildung 35: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen	69
Abbildung 36: Viabilität der NB-Zelllinie LS im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1	70

Abbildung 37: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1	71
Abbildung 38: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung in Abhängigkeit, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1.	73
Abbildung 39: Viabilität der NB-Zelllinie LS im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1	74
Abbildung 40: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1	76
Abbildung 41: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1	78
Abbildung 42: Schematische Darstellung der Aktivierung in drei Schritten von CAR-T Zellen durch GD2 auf Tumorzellen sowie von T-Zellen durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD28-GD2 sowie GD2 auf Tumorzellen.....	91

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Herkunft der humanen Neuroblastomzelllinien	20
Tabelle 2: Verdünnungen der Antikörper.....	24
Tabelle 3: Vorbereitung der Reagenzien im Aktivierungs- und Proliferationsassay ..	29
Tabelle 4: Inhalt der Ansätze in 48-Well Platten im Aktivierungs- und Proliferationsassay	29
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix zur Immunphänotypisierung.....	30
Tabelle 6: Inhalt der Ansätze für den Zytokinassay vor Inkubation	34
Tabelle 7: Inhalt der Ansätze in 96-Well Platten im Luciferaseassay	38
Tabelle 8: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie LS	71
Tabelle 9: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie LAN-1.....	72
Tabelle 10: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie SHSY5Y.....	73

1 Einleitung

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland erkrankten nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters 2019 etwa 120 Kinder unter 18 Jahren jährlich am Neuroblastom, die standardisierte Inzidenz beträgt 11,1 Neuerkrankungen pro 1 Million Kinder pro Jahr. Mit diesen Zahlen macht das Neuroblastom insgesamt 5,5% aller Krebserkrankungen aus. Das mediane Alter zum Diagnosezeitpunkt beträgt 14 Monate, die meisten Kinder erkranken bis zum 4. Lebensjahr. Jungen sind 40% häufiger betroffen als Mädchen (Kaatsch P 2020). Insgesamt macht das Neuroblastom 15% aller Krebs-assoziierten Todesfälle bei Kindern aus (Tomolonis, Agarwal, & Shohet 2018).

1.1.2 Ätiologie

Das Neuroblastom kann sowohl familiär mit autosomal-dominanter Vererbung als auch sporadisch auftreten. Mosse et al. identifizierten 2008 eine aktivierende Mutation in der Domäne der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) als wichtigste Ursache des familiären Neuroblastoms (Mosse et al. 2008). Darüber hinaus konnten beim familiären Neuroblastom loss-of-function Mutationen im Homeobox-Gen des PHOX2B vor allem bei Kindern mit Grunderkrankungen wie Morbus Hirschsprung oder dem Kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndrom nachgewiesen werden (Mosse et al. 2004; Trochet et al. 2004).

Als häufigste Ursache des sporadischen Neuroblastoms kann in 22% der Fälle eine Amplifikation von MYCN ausgemacht werden, welche gleichzeitig mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist (Brodeur 2003). Darüber hinaus wurde eine Vielzahl an DNA-Polymorphismen identifiziert, welche die Suszeptibilität für diese Erkrankung erhöhen (Capasso et al. 2009; Diskin et al. 2009; Maris et al. 2008).

1.1.3 Lokalisation und klinische Symptome

Als sehr heterogene Tumorentität sind beim Neuroblastom einerseits spontane Regressionen in fortgeschrittenen Stadien keine Seltenheit, andererseits treten häufig behandlungsrefraktäre, metastasierende Verläufe mit Todesfolge auf (Tomolonis et al. 2018).

Da es sich um eine Neoplasie des sympathischen Nervengewebes handelt, finden sich die Primärmanifestationen meist in der Nebennierenloge, paravertebral oder in der abdominalen Mittellinie. Zu den unspezifischen Allgemeinsymptomen gehören Fieber, Leistungseinschränkungen, Knochenschmerzen und Blässe, welche vor allem bei Patienten mit metastasiertem Neuroblastom auftreten. Die meisten Neuroblastome werden zufällig bei Vorsorgeuntersuchungen, Bagatelltraumen oder Infekten diagnostiziert. Die spezifische Symptomatik hängt vom Manifestationsort ab. Im Folgenden sind die Wichtigsten aufgelistet:

- Beschwerden durch Tumorschwellung oder Metastasenschwellung
- Inkomplette/komplette Querschnittssymptomatik bei Einwachsen eines paravertebral gelegenen Tumors in die Neuroforamina
- Horner-Syndrom mit Miosis, Ptosis und Enophthalmus bei zervikal oder thorakal gelegenem Tumor
- Opsoklonus-Myoklonus-Ataxie-Syndrom im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms
- Brillenhämatom bei Infiltration der Orbita

Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 50% der Patienten bereits Fernmetastasen auf. Diese befinden sich meist im Knochenmark, dem Knochen, in Lymphknoten und in der Leber (Thorsten Simon 2019).

1.1.4 Diagnostik

Eine exakte, initiale Diagnostik ist der Grundbaustein für eine korrekte, risikoadaptierte Therapie. Grundlegend gehört dazu die körperliche Untersuchung samt Bestimmung der Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin sowie der Neuronenspezifischen Enolase (NSE) und der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum (T. Simon et al. 2017). Zu den diagnostischen Maßnahmen von radiologischer Seite gehören eine Röntgenaufnahme des Thorax, eine sonographische Untersuchung von Hals, Abdomen und Becken, eine MRT oder Multidetector-CT der Tumorregion sowie bei Vorliegen eines metastasierten Stadiums ein MRT des Schädels zum Ausschluss von Hirnmetastasen (Thorsten Simon 2019). Von großer Relevanz ist weiterhin die Knochenmarksuntersuchung mit molekulargenetischer Testung, da diese therapieentscheidend sein kann (Burchill et al. 2017). Empfehlenswert ist zusätzlich die Durchführung einer Immunzytologie samt Markierung des Gangliosids Disialogangliosid (GD2), um

auch kleinere Tumorzellnester ausfindig zu machen (Burchill et al. 2017; Swerts et al. 2005).

Die endgültige Diagnose des Neuroblastoms kann jedoch nur durch eine histologische Sicherung im Rahmen einer Tumorbiopsie oder bei nachweislichem Knochenmarksbefall und zeitgleich erhöhten Katecholamin-Metaboliten im Urin oder Blut gestellt werden (Brodeur et al. 1993).

1.1.5 Einteilung in Krankheitsstadien und Risikogruppen

Die Stadieneinteilung des Neuroblastoms wird heutzutage auf Grundlage von zwei unterschiedlichen Systemen vorgenommen: nach dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) sowie nach dem *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS).

Die Einteilung nach INSS bezieht sich dabei auf die initiale Tumorausdehnung, das Metastasierungsverhalten, die Lymphknoteninfiltration und das Ausmaß der Tumorresektion zu Beginn. Es werden vier Stadien unterschieden, wobei die Stadien 1-3 ein lokalisiertes und das Stadium 4 ein metastasiertes Tumorgeschehen beschreiben. Das vierte Stadium kann in eine weitere Gruppe, das Stadium 4S, unterteilt werden, welches das metastasierte Säuglingsneuroblastom beschreibt (Brodeur et al. 1993).

Im Vergleich zum INSS bezieht sich das neuere INRGSS auf radiologisch definierte Kriterien, den sogenannten Image Defined Risk Factors (IDRF). Sie wurde entwickelt, um unabhängig vom initialen, operativen Eingriff die Ausdehnung des Neuroblastoms erfassen zu können. Die Stadien L1 und L2 entsprechen einem lokalisierten Tumorstadium mit oder ohne IDRF, die Stadien M und MS entsprechen weitestgehend den Stadien 4 und 4S der INSS (Brisse et al. 2011; Monclair et al. 2009).

1.1.6 Therapie

Nach erfolgter Risikostratifizierung und Einteilung des Tumors entweder in die niedrige Risikogruppe, mittlere Risikogruppe oder Hochrisikogruppe wird die Behandlung nach einem multimodalen Konzept durchgeführt. Es werden chirurgische, chemotherapeutische, strahlentherapeutische und neuartige Therapieansätze verfolgt, letztere häufig im Rahmen von klinischen Studien.

Bei Einschluss in die niedrige Risikogruppe steht die operative Entfernung im Vordergrund. Beim Vorliegen tumorassoziierter Symptome ist die Durchführung einer Chemotherapie erforderlich.

Wird der Patient in die mittlere Risikogruppe eingeordnet, so besteht die Behandlung aus einer Tumorexstirpation mit anschließender Chemotherapie und ggf. Strahlentherapie.

Nach Eingruppierung eines Patienten in die Hochrisikogruppe erfolgt die Durchführung einer aggressiven multimodalen Therapie. Diese beinhaltet eine Tumorresektion, Induktionschemotherapie, eine konsolidierende Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation und eine folgende Post-Konsolidierungstherapie (Thorsten Simon 2019).

1.1.6.1 Operative Therapie

Bei Diagnosestellung ist zunächst eine Tumorbiopsie zur feingeweblichen Untersuchung durchzuführen. Bei Bestätigung sollte anschließend eine möglichst vollständige Tumorexstirpation angestrebt werden. Der Eingriff kann in der niedrigen Risikogruppe konventionell offen oder minimalinvasiv erfolgen. Aufgrund einer häufig zu beobachtenden Spontanregression und damit guten Prognose von Resttumoren ist eine extensive, operative Entfernung bei niedrigem Risiko nicht indiziert. Analog zu dieser Vorgehensweise verhält es sich in der mittleren Risikogruppe: eine komplette Resektion ist hier nur gerechtfertigt, wenn diese unproblematisch durchgeführt kann. In der Hochrisikogruppe erfolgt die Resektion meist im Rahmen einer Induktionschemotherapie im Sinne einer *gross total resection* (Resektion von mehr als 95% des Primärtumors). Nur in Ausnahmefällen kann bei der initialen Operation eine komplette Resektion erfolgen (Thorsten Simon 2019). Hochriskante Eingriffe mit verstümmelnden Folgen zur vollständigen Tumorentfernung sollten nicht durchgeführt werden, da diese in Studien keinen Vorteil zeigen (T. Simon, Haberle, Hero, von Schweinitz, & Berthold 2013).

1.1.6.2 Chemotherapie

Die Zytostatikatherapie stellt neben der operativen Therapie eine wichtige Säule in der Behandlung des Neuroblastoms dar. Dauer und Intensität wird je nach Risikoprofil des Patienten festgelegt.

Bei Niedrigrisikopatienten ist die Gabe von Zytostatika auf das Auftreten von tumorassozierten Symptomen beschränkt. Es erfolgen maximal vier Zyklen des N4 Protokolls gemäß den Deutschen Neuroblastomstudien, welches die Substanzen Doxorubicin, Vincristin und Cyclophosphamid enthält. Die Chemotherapie sollte beendet werden, sobald die Symptome verschwunden sind. (T. Simon et al. 2017). Die Standardchemotherapie bei Patienten in der mittleren Risikogruppe besteht aus einer 6 Zyklen langen Induktionschemotherapie, bei welcher sich die Zyklen N5c (Carboplatin, Etoposid, Vindesin) und N6 (Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid, Doxorubicin) abwechseln. Es folgt eine Erhaltungstherapie mit oralem Cyclophosphamid im Sinne des N7 Zyklus (T. Simon et al. 2017).

In der Hochrisikogruppe beginnt die Zytostatikatherapie ebenfalls mit einer Induktionschemotherapie aus sechs alternierenden Zyklen N5 (Cisplatin, Etoposid, Vindesin) und N6 (Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid, Doxorubicin). Es folgt eine Hochdosischemotherapie mit Busulfan und Melphalan und eine anschließende autologe Stammzelltransplantation (Thorsten Simon 2019).

1.1.6.3 ^{131}I -mIBG Therapie

Die Therapie mit ^{131}I -mIBG sollte nach der Induktions- und vor der Hochdosischemotherapie erfolgen und ist nur sinnvoll, wenn zuvor mIBG-positives Tumorgewebe mit Hilfe einer ^{123}I -mIBG-Szintigraphie nachgewiesen werden konnte. Über das Norepinephrin-Transporter-System wird das Nukleotid aufgenommen und schädigt selektiv die umgebenden Tumorzellen. Um Komplikationen und Nebenwirkungen zu vermeiden, wird die Einhaltung eines therapiefreien Intervalls von mindestens 6 Wochen vor der folgenden myeloablativen Chemotherapie empfohlen (Thorsten Simon 2019).

1.1.6.4 Strahlentherapie

Eine weitere Säule in der Behandlung des Neuroblastoms ist die Strahlentherapie. Während sie in der niedrigen Risikogruppe kaum eine Rolle spielt, besteht die Empfehlung einer konsolidierenden Strahlentherapie mit 36 bis 40 Gy bei inoperablem Resttumor nach Chemotherapie für die mittlere Risikogruppe. Für Patienten mit Hochrisikoneuroblastom wird generell eine Bestrahlung des Primärtumors mit circa 20 Gy und eines möglichen Resttumors mit einem

Tumorboost bis 36 Gy empfohlen. Die Bestrahlung von Metastasen sollte nur in Einzelfällen nach individueller Abwägung erfolgen (Thorsten Simon 2019).

1.1.6.5 Immuntherapie

Im Rahmen der Post-Konsolidierungstherapie wird für die Behandlung des Hochrisikoneuroblastoms in Europa eine Immuntherapie mit dem Anti-GD2-Antikörper Dinutuximab beta in Kombination mit Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierendem-Faktor (GM-CSF) und Interleukin-2 (IL-2) empfohlen (T. Simon et al. 2017), da Studien eine Verbesserung des Outcomes nach zwei Jahren bei Hochrisiko-Neuroblastomen nachweisen konnten (Yu et al. 2010). Diese Therapie birgt jedoch einige Nebenwirkungen. So wurden zum einen bei 25% der Behandelten Hypersensitivitätsreaktionen beobachtet, zum anderen gaben 52% der mit Dinutuximab behandelten Patienten starke neuropathische Schmerzen der Grade 3 und 4 an; bei 23% der Behandelten wurde ein Capillary-Leak-Syndrom festgestellt. Fieber, Elektrolytentgleisungen, Leberdysfunktion und Hypotension stellten weitere toxische Nebenwirkungen dar (Yu et al. 2010).

Neue Studien weisen nach, dass bei etwa 12% der am Neuroblastom erkrankten Patienten nur wenig GD2 auf Tumorzellen exprimiert wird (Schumacher-Kuckelkorn et al. 2017). Ergebnisse von Terzic et al. zeigen, dass bei einem Drittel der Patienten mit Therapieversagen nach Dinutuximab-Therapie eine geringe GD2-Expression vorlag. Dies legt einen Zusammenhang zwischen Tumorrückfall und niedriger GD2-Expression nahe, dabei liegt die Problematik vor allem in der hohen Nebenwirkungsrate ohne therapeutischen Effekt (Terzic et al. 2018). Aus diesem Grund wird nach weiteren Therapiemodifizierungen zur Optimierung der Nebenwirkungen und Mitbehandlung GD2-negativer/ wenig exprimierender Neuroblastomzelllinien geforscht.

1.1.6.6 Neuartige Therapieansätze

Im Zentrum der aktuellen Neuroblastomforschung stehen gegen GD2 gerichtete Therapiemöglichkeiten. Dazu gehören bispezifische Antikörper, welche sowohl gegen GD2 auf Tumorzellen als auch gegen CD3 auf T-Zellen gerichtet sind. Sie führen zu einer Vernetzung von Tumorzellen und T-Zellen, ohne dass hierfür eine Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen benötigt wird. Nach demselben Prinzip

funktionieren CAR-T Zellen. Deren T-Zell-Rezeptor wurde genetisch so verändert, dass er das GD2 auf Tumorzellen ohne Antigenpräsentation erkennt. Mit Hilfe von costimulatorischen Molekülen kann die Funktion und das Überleben der CAR-T Zellen verbessert werden (Suzuki & Cheung 2015).

Neben Anti-GD2 Antikörpern beschäftigt sich die aktuelle Forschung auch mit der Erprobung von gegen andere Antigene gerichteten Antikörpern.

Ein solches potenzielles Target stellt B7-H3 (CD276) dar, ein wichtiges Immun-Checkpoint Molekül (Picarda, Ohaegbulam, & Zang 2016). Aufgrund des Erfolges von Checkpoint-Inhibitoren scheinen monoklonale Antikörper gegen B7-H3 ebenfalls erfolgsversprechend zu sein (Picarda et al. 2016). Studien zeigen, dass solche Antikörper die antikörperabhängige, zellvermittelte Toxizität (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = ADCC) hervorrufen und somit als Alternative oder zusätzliches Target bei Versagen einer Anti-GD2-Therapie genutzt werden können (Handgretinger R 2018).

Ein weiteres Antigen stellt GPC2 dar, welches essenziell für die Tumorpheriferation ist und in einer Vielzahl auf Neuroblastomzellen, jedoch kaum auf normalem kindlichem Gewebe zu finden ist. Erste Antikörper-Medikamenten Konjugate scheinen einen zytotoxischen Effekt auf GPC2-exprimierende Tumorzellen zu haben (Bosse et al. 2017).

1.1.7 Prognose

Das Neuroblastom weist mit einer 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 80% und einer 15-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 77% eine recht gute Prognose auf. Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung im Stadium IV haben jedoch weiterhin eine schlechte Prognose, obwohl seit den 1980er Jahren erhebliche Fortschritte in der Behandlung des Hochrisiko-Neuroblastoms erzielt worden sind. Interessanterweise stellte sich im Gegensatz dazu heraus, dass sich das Neuroblastom vor allem bei Erkrankten bis zum zweiten Geburtstag in niedrigen Stadien spontan zurückbilden kann (Kaatsch P 2020).

Ein in den Jahren 1995 bis 2000 durchgeführtes Projekt zur Früherkennung führte zwar zum Anstieg der Erkrankungszahlen, ergab jedoch keine Senkung der im Endstadium erkrankten Patienten oder der Mortalität, sodass das Screening wieder eingestellt wurde (Schilling et al. 2003).

1.2 Tumor-Immunoediting

Schon in den späten 1950er Jahren wurde in der Krebstherapie die Vermutung über eine „Immunosurveillance“ aufgestellt: es beinhaltet die Theorie, dass das menschliche Immunsystem in der Lage ist, körpereigene, transformierte Zellen zu erkennen und zu bekämpfen. Im Lauf der Jahre wurde diese Theorie erweitert und mit dem Begriff des „Tumor-Immunoeditings“ versehen. Neue Daten belegen, dass sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle in der Tumorerkennung und -bekämpfung spielt (Vanichapol, Chutipongtanate, Anurathapan, & Hongeng 2018).

Das gegenwärtige Model des Tumor-Immunoediting besteht aus drei Phasen. In der ersten Phase steht das Erkennen von prozessierten, tumorassoziierten Antigenen auf MHC Klasse I Molekülen durch CD8⁺-T-Zellen und die Bindung von NK-Zellen an spezifische Liganden der Targetzellen im Mittelpunkt. Es folgt eine Zerstörung der meisten Tumorzellen in der sogenannten Eliminierungsphase. Einige wenige Zellvarianten können dieser Immunantwort allerdings entkommen, sie schaffen den Schritt in die Gleichgewichtsphase. Wie lange die Zellen dort verweilen, hängt von der Immuntoleranz der Tumorzellen und der Potenz der antitumoralen Immunantwort ab. Im Optimalfall verbleiben die malignen Zellen ein Leben lang in dieser immunvermittelten Tumordormancy. Allerdings besteht bei den Tumorzellen weiterhin eine genetische Instabilität und epigenetische Alterationen, sodass diese über eine verringerte Immunogenität dem Immunsystem entkommen und in die Escape-Phase übergehen. Nun kann der Tumor langsam beginnen zu wachsen, ein immunsuppressives Mikroenvironment aufzubauen und zu einem klinisch relevanten Tumor werden (Vanichapol et al. 2018).

1.3 Problem der Therapieresistenz: das Tumor-Mikroenvironment

Trotz aller Bemühungen, neue potente Therapieansätze zur Behandlung des Hochrisiko-Neuroblastoms zu finden, bleibt das Problem der Therapieresistenz bestehen. Dies hat den Ursprung vor allem in den Immun Escape Mechanismen der Tumorzellen. Durch verstärktes Tumorwachstum und ein neues Blutgefäßsystem kommt es zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel in der Umgebung des Tumors. Des Weiteren führen unbekannte Prozesse zum sogenannten Warburg-Effekt: die veränderten, tumorösen Zellen schalten von einer mitochondrialen, oxidativen

Verstoffwechslung zur anaeroben Glykolyse. In diesem Prozess wird Laktat gebildet, welches zu einem Abfall des pHs führt, es entsteht ein immunsuppressives Mikroenvironment (Vanichapol et al. 2018).

Auf zellulärer Ebene sind die Neuroblastomzellen in der Lage, bestimmte Komponenten der HLA Klasse I Moleküle und andere Adhäsionsmoleküle herunter zu regulieren (Cheung & Dyer 2013). Dadurch werden sie für Neuroblastom-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten unsichtbar und entkommen deren Erkennungsmechanismen. Zusätzlich haben die Tumorzellen die Möglichkeit, verschiedene immunsuppressive Moleküle wie TGF β 1 und IL-10 zu sezernieren, welche die Effektivität von Immuneffektorzellen wie T-, B- und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) schwächen. Zuletzt ermöglichen sie durch Rekrutierung immunsuppressiver Zellen eine Schwächung der antitumoralen Immunantwort (Pistoia et al. 2013). Die Zusammenschau der genannten Mechanismen wird in der Literatur als Tumor-Mikroenvironment betitelt.

Ironischerweise sind die Neuroblastomzellen jedoch ebenfalls in der Lage, die HLA-Moleküle erneut auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, wenn sie dadurch dem NK-Zellen vermitteltem ADCC bei Behandlung mit monoklonalen Antikörpern entkommen können (Cheung et al. 2012; Tarek et al. 2012). Diese Plastizität der Tumorzellen verdeutlicht umso mehr die Problematik, geeignete Therapieansätze zu entwickeln, welche nicht durch das Tumor-Mikroenvironment und Immune-Escape-Mechanismen gestört werden können. (Cheung & Dyer 2013). Immuntherapeutische Ansätze können nur dann *in vivo* wirksam sein, wenn sie in der Lage sind, das Tumor-Mikroenvironment zu durchbrechen. Insgesamt stellen diese weitreichenden Vorgänge die aktuelle Forschung vor große Herausforderungen.

1.4 Die Rolle des GD2

Das Disialogangliosid GD2 ist ein Oberflächenantigen, welches neben dem Neuroblastom noch auf vielen weiteren Tumorentitäten exprimiert ist (Suzuki & Cheung 2015). Daneben findet es sich auf neuronalen Stammzellen (Yanagisawa, Yoshimura, & Yu 2011), mesenchymalen Stammzellen (Jin et al. 2010) sowie auf peripheren, sympathoadrenergen Progenitorzellen (Saxena et al. 2013). Der große Vorteil, den dieses Antigen als Target für immuntherapeutische Ansätze bildet, ist

die hohe Dichte auf Tumorzellen (bis zu 10^7 Moleküle pro Zelle) (Z. L. Wu, Schwartz, Seeger, & Ladisch 1986) im Gegensatz zur sehr geringen Dichte auf gesundem, menschlichen Gewebe (Lammie, Cheung, Gerald, Rosenblum, & Cordoncardo 1993). Während vermutet wird, dass GD2 wichtig für die Erhaltung und Reparatur von Nervenzellen ist, bleibt die exakte Funktion weiterhin unklar (Suzuki & Cheung 2015). Vorteilhaft ist ebenfalls die Homogenität des Antigens innerhalb und zwischen unterschiedlichen Neuroblastomen sowie der seltene Verlust des Antigens (Cheung & Dyer 2013).

1.4.1 Biochemische Eigenschaften

GD2 gehört zur Klasse der Ganglioside und besteht aus Glycosphingolipiden sowie aus zwei N-Acetylneuraminsäuren. Es entsteht aus GD3 durch Modifizierung mit Hilfe der GM2/GD2-Synthase. O-Acetyl-GD2 wird ein Derivat genannt, wenn es an der terminalen Sialinsäure eine 9-O-Acetyl-Modifikation aufweist (Suzuki & Cheung 2015). Die meisten Anti-GD2-Antikörper führen zu einer Kreuzreaktion mit O-Acetyl-GD2, einige wenige Antikörper weisen diese Reaktion nicht auf (Ye & Cheung 1992). Studien zeigen, dass solche Antikörper ebenfalls weniger mit normalen Nervenzellen kreuzreagieren. Dadurch besteht die Hoffnung, dass sie auch zu weniger Nebenwirkungen führen (Alvarez-Rueda et al. 2011).

1.4.2 GD2 als Target für monoklonale Antikörper

Die erste Beschreibung von murinen Anti-GD2-Antikörpern erfolgte bereits in den frühen 1980er Jahren, seitdem wurde dieser Ansatz stetig verbessert (Cheung et al. 1985). Trotz der GD2-Expression auf allen Neuronen des menschlichen Körpers zeigte sich das Gehirn aufgrund der Blut-Hirn-Schranke vor der Wirkung der Antikörpern geschützt (Cheung, Neely, Landmeier, Nelson, & Miraldi 1987).

Es konnte bestätigt werden, dass der murine monoklonale Antikörper 3F8 sowohl eine Apoptose induzieren als auch die Viabilität und Motilität von Tumorzellen senken konnte (Suzuki & Cheung 2015). Darüber hinaus lockte er Leukozyten zu den Tumorzellen und ermöglicht so eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Toxizität und eine Monozyten-Makrophagen vermittelte Phagozytose (Cheung & Dyer 2013). Auch Komplementfaktoren können an das F_c-Fragment des monoklonalen Antikörpers binden und eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität herbeiführen (Cheung & Dyer 2013). Unglücklicherweise entwickelten Patienten,

welche nur murine Antikörper erhielten, sogenannte humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) (Cheung, Lazarus, et al. 1987), welche als Resistenzmechanismus gegen den murinen Antikörper zu wirken sind (Voeller & Sondel 2019) und zu einer schnelleren Eliminierung der Antikörper führten (Kholodenko, Kalinovsky, Doronin, Deyev, & Kholodenko 2018). Um dies zu umgehen, wurden neue, chimäre Antikörper entwickelt, welche sowohl Maus- als auch humane Bestandteile besitzen. So stammt beim chimären Antikörper ch14.18 die konstante Region von humanen IgG1 Antikörpern (Mueller, Romerdahl, Gillies, & Reisfeld 1990) und die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten vom Maus-Antikörper 14.18. Dieser verbesserte Antikörper war in der Lage, das ADCC signifikant stärker zu aktivieren (Mueller et al. 1990), doch auch hier kommt es zur Bildung von Humanen Anti-Chimär Antikörpern (HACA), welche die Halbwertszeit vermindern (Kholodenko et al. 2018).

Durch eine Kombination von ch14.18 mit GM-CSF, welcher vor allem Makrophagen aktiviert, sowie IL-2, welches NK-Zellen rekrutiert, kann eine Potenzierung der antitumoralen Effektivität erreicht werden (Pistoia et al. 2013). Studien zeigen, dass diese Kombination zusammen mit 13-cis-Retinsäure, dem bisherigen Standardmedikament der Post-Konsolidierungstherapie, einer alleinigen Gabe von 13-cis-Retinsäure sowohl im Overall Survival (OS) als auch Event Free Survival (EFS) überlegen ist (Yu et al. 2010). Die größte Limitation der monoklonalen Antikörpertherapie besteht durch neuropathische Schmerzen, ausgelöst durch die Interaktion mit GD2 exprimierenden, sensorischen Neuronen (Mora 2016). Diese Nebenwirkungen sind dosislimitierend; wirksame Erfolge konnten bisher nur bei minimaler residualer Erkrankung und nicht bei großen Tumoren nachgewiesen werden (Cheung & Dyer 2013).

Unklar ist bislang, ob eine Behandlung mit Anti-GD2-Antikörpern zu einem Selektionsdruck und damit runterregulierter GD2-Expression führen kann, wie es bei zielgerichteten Therapien von Lymphomen (Duman, Sahin, Ergin, & Guvenc 2012), Leukämien (Sotillo et al. 2015) und Brustkrebs (Mukohara 2011) beobachtet wurde.

1.4.3 GD2 als Target für CAR-T Zellen und bispezifische Antikörper

Bahnbrechende Erfolge feierte vor kurzer Zeit die Einführung der CAR-T Zellen Therapie bei pädiatrischen Patienten mit refraktärer oder rückfälliger B-Zellen Akut

Lymphatische Leukämie (B-ALL) (Voeller & Sondel 2019). Aufgrund dieses Fortschrittes bei hämatologischen Erkrankungen wird nun intensiv an der Ermöglichung einer solchen Therapie für solide Tumore wie dem Neuroblastom geforscht (Cheung & Dyer 2013). Die Abkürzung CAR steht für einen chimären Antigen Rezeptor, bestehend aus drei Teilen: einer extrazellulären Antigen-Bindungsdomäne (meist im Sinne eines Einzelketten-variablen Fragmentes = scFv, engl. für single-chain variable fragment; in diesem Fall Anti-GD2), einer Transmembrandomäne, sowie einer intrazellulären Signalübertragungsdomäne (siehe Abbildung 1). Sobald die CAR-T Zelle an das Tumorantigen bindet, wird die intrazelluläre Signaldomäne aktiviert und ein tumorizider Prozess in Gang gesetzt (Suzuki, Curran, & Cheung 2015). Dieser beinhaltet Zytokinausschüttung, Lyse der Zielzellen und eine Proliferation der Effektorzellen (S. Sun, Hao, Yang, Zhang, & Fu 2018). Von großem Vorteil ist, dass CAR-T Zellen in der Lage sind, unprozessiertes Antigen MHC-Klasse I unabhängig zu erkennen (Kholodenko et al. 2018).

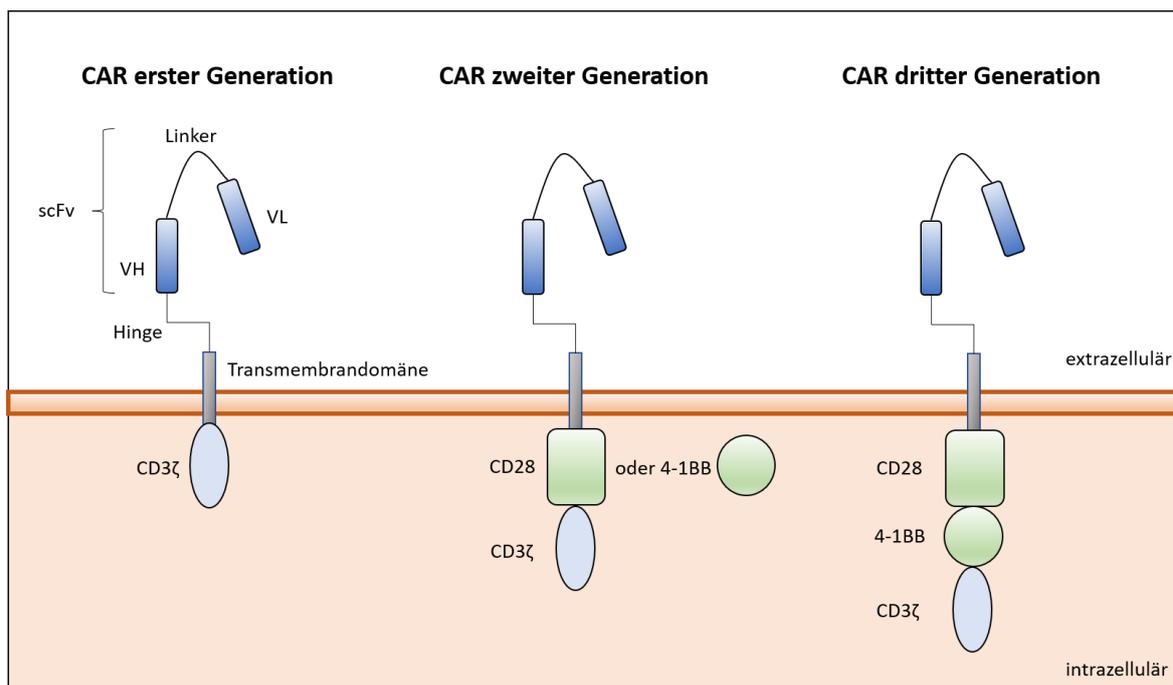


Abbildung 1: Aufbau der CARs der ersten, zweiten und dritten Generation

Dargestellt ist der Aufbau der CAR-Rezeptoren auf T-Zellen der unterschiedlichen Generationen. Während bei der ersten Generation nur CD3ζ als intrazelluläre Signaldomäne fungiert, werden die CARs der nachfolgenden Generationen durch costimulatorische Domäne wie CD28 und 4-1BB ergänzt.

scFv single-chain variable fragment, VH variable heavy chain, VL variable light chain

(adaptiert aus June et al. 2018, *CAR T cell immunotherapy for human cancer*, Science (June, O'Connor, Kawalekar, Ghassemi, & Milone 2018))

Im Laufe der Jahre wurden unterschiedliche Generationen von CAR-T Zellen entwickelt. Die erste Generation enthielt lediglich eine einzige aktivierende Domäne, welche in Studien keinen übereinstimmenden Effekt aufgrund fehlender Liganden auf Tumorzellen hervorrufen konnte. Des Weiteren zeigte sich die Persistenz der CAR-T Zellen eingeschränkt (Richards, Sotillo, & Majzner 2018). In der zweiten Generation erfolgte die Hinzunahme einer zusätzlichen, costimulatorischen Sequenz, wie zum Beispiel CD28 oder CD137 (4-1BB), was zu einer stärkeren Proliferation und besserem Überleben der T-Zellen führte. CAR-T Zellen der dritten Generation mit zwei costimulatorischen Domänen wurden ebenfalls getestet (Suzuki et al. 2015). Die Problematik der Langzeit-Persistenz der CAR-T Zellen im menschlichen Körper zeichnet sich jedoch in allen drei Generationen ab. Long et al. konnten nachweisen, dass dies seinen Ursprung im sogenannten „tonic signaling“ hat, also einer unspezifischen Aktivierung und somit Erschöpfung der CAR-T Zellen. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass der Einbau der costimulatorischen Domäne 4-1BB die Effektorzellen vor der Erschöpfung schützen konnte, CD28 diese dagegen verstärkte (Long et al. 2015). Die in dieser Forschungsarbeit verwendete CAR-T Zellen sind deshalb nach dem Prinzip von CARs der zweiten Generation mit der costimulatorischen Domäne 4-1BB aufgebaut.

Bezüglich der Verträglichkeit dieser neuartigen Therapie zeigen Studien mit CAR-T Zellen an anderen Tumoren einige Nebenwirkungen. Am häufigsten treten sogenannte „on-target on-tumor“-Toxizitäten auf, gekennzeichnet durch eine zu starke Immunreaktion. Dazu zählen neben dem Zytokinsturm auch das Tumorlysesyndrom, gekennzeichnet durch Nierenversagen, Arrhythmien und Krampfanfälle durch Zellabbauprodukte (Tiu, Mountantonakis, Dunbar, & Schreiber 2007). Weiterhin ist das Auftreten gewisser „on-target off-tumor“-Toxizitäten bekannt, welche durch das fälschliche Erkennen und Zerstören gesunden Gewebes mit den gleichen Antigenen charakterisiert ist. Zu den „off-target“-Toxizitäten zählen Reaktionen der CAR-T Zellen auf Antigene, gegen welche ihr Rezeptor nicht gerichtet ist oder eine Antigen-unabhängige Selbstaktivierung. Zusätzlich sind neurotoxische Nebenwirkungen wie Aphasie, Delir und Verwirrung, unerwünschte Effekte durch eine vorangehende Immunsuppression wie Anämie, Koagulopathien sowie die neutropene Sepsis als auch anaphylaktische Reaktionen auf von der Maus stammenden CARs bekannt (S. Sun et al. 2018). In Bezug auf die CAR-T Zellen Therapie beim Neuroblastom konnten erste Studien zeigen, dass

insbesondere die neuropathischen Schmerzen, welche bei einer monoklonalen Antikörper-Therapie beobachtet wurden, nicht mehr auftraten (Louis et al. 2011; Pule et al. 2008).

Im Gegensatz zu CAR-T Zellen können bispezifische Antikörper zwei unterschiedliche Antigene erkennen. Einerseits tumorassoziiertes Antigen (TAA), andererseits Immunzellaktivatoren wie zum Beispiel CD3 auf T-Zellen. Sie haben gegenüber monoklonalen Antikörpern den Vorteil, dass sie Effektorzellen direkt zu den Tumorzellen rekrutieren können. Nach erfolgter Aktivierung, ebenfalls MHC-Klasse I-unabhängig, sezernieren T-Zellen Granzym B und Perforine zur Tumorlyse. Während Erstgenerations-Antikörper noch aus der Fusion zweier IgG-ähnlichen Moleküle bestanden, werden bispezifische Antikörper der zweiten Generation aus zwei Einzelketten-variablen Fragmenten synthetisiert und bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette (Suzuki et al. 2015). Das damit verbundene geringe Gewicht stellt gleichzeitig die Schwachstelle dieser Therapie dar: es kommt zu einer schnellen Elimination der bispezifischen Antikörper (Kholodenko et al. 2018).

Eine schematische Darstellung der in dieser Forschungsarbeit verwendeten bispezifischen Antikörper findet sich in Abbildung 2.

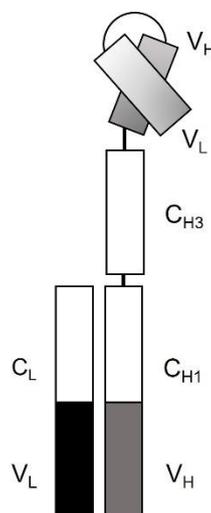


Abbildung 2: Aufbau eines bispezifischen Antikörpers

Gezeigt ist der schematische Aufbau der in dieser Forschungsarbeit verwendeten CD3-GD2 und CD28-GD2 bispezifischen Antikörper. Im oberen Teil bindet ein Einzelketten variables Fragment, bestehend aus schwerer und leichter Kette, an eine schwere Kette der konstanten Region (C_{H3}); diese Seite ist gegen GD2 auf Neuroblastomzellen gerichtet. Über ein Verbindungsstück ist dieser Teil an eine Konstruktion aus schweren und leichten Ketten von konstanten und variablen Fragmenten gebunden, welche gegen CD3 oder CD28 gerichtet sein können.

V_H variable heavy chain, V_L variable light chain, C_{H1/3} constant heavy chain 1/2, C_L constant light chain

Übergeordnetes Ziel der bispezifischen Antikörper-Therapie ist es, eine univalente CD3-Bindung ohne Vernetzung hervorzurufen, um unspezifische T-Zell-Aktivierungen zu vermeiden. Man erhofft sich, dass durch bispezifische Antikörper aktivierte T-Zellen (aTc für engl. activated T cells) weniger anfällig sind gegenüber regulatorischen T-Zellen (Suzuki et al. 2015).

1.5 Die Entwicklung und Funktion der T-Zelle

Die T-Zellen gehören zum erworbenen, bzw. zum spezifischen Immunsystem. Sie gehen aus einer lymphoiden Stammzelle hervor, reifen im Thymus zu naiven T-Zellen heran und können schlussendlich in den sekundär lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten durch Antigene zu Effektorzellen aktiviert werden. Es kommt zur Vermehrung der aktivierten Effektorzellen, diese werden über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf drainiert und können nun an jedem Ort des menschlichen Körpers ihre Effektorfunktion ausüben.

Zwingend notwendig ist dafür die Reifung eines T-Zellrezeptors (TCR = CD3). Dieser ist nicht in der Lage, natives Antigen zu erkennen, sondern ist auf eine Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen (engl. Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex) durch antigenpräsentierende Zellen angewiesen. Eine effiziente T-Zellaktivierung kommt erst zustande, wenn drei Signale erfolgen: im ersten Schritt die Bindung des TCR an durch MHC präsentiertes Antigen, zweitens ein costimulatorisches Signal durch CD28 und drittens die autokrine Stimulation durch Sezernierung von IL-2 und der Expression eines IL-2-Rezeptors (auch als CD25 bekannt). Neben CD25 soll im Rahmen dieser Dissertation auch der Marker CD69 untersucht werden. Dieser wird zügig nach Aktivierung der T-Zelle exprimiert und hält eine wichtige Funktion in der Regulation der Immunantwort inne (Gonzalez-Amaro, Cortes, Sanchez-Madrid, & Martin 2013).

Die T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen separieren: während die CD4⁺-T-Zellen insbesondere MHC-Klasse-II Moleküle erkennen und auch als T-Helferzellen aufgrund ihrer regulierenden und zytokinausschüttenden Funktion bekannt sind, erkennen die CD8⁺-T-Zellen vorwiegend auf MHC-Klasse-I präsentiertes Antigen und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, dessen Aufgabe die Zerstörung infizierter Körperzellen ist (Hof 2019; Slaney, Wang, Darcy, & Kershaw 2018). Für die Verwendung von CAR-T Zellen in der Therapie des Neuroblastoms sollten

deshalb stets CD4⁺- und CD8⁺-CAR-T Zellen verwendet werden. Auch bispezifische Antikörper sind in der Lage, sowohl an CD4⁺- als auch an CD8⁺-Effektorzellen zu binden (Slaney et al. 2018)

Ein relevanter Bestandteil der Immunantwort, deshalb in dieser Dissertation untersucht, sind Zytokine und Interferone. Diese Botenstoffe, die von nahezu allen Zellen des Immunsystems sezerniert werden, dienen der Aktivierung oder Deaktivierung anderer Immunzellen. Dieser Bestandteil ist besonders wichtig, da zum einen eine ausreichende Zytokinausschüttung essenziell für die Aktivierung und Proliferation weiterer Effektorzellen ist (Zhu & Paul 2008), zum anderen bereits bekannt ist, dass z.B. CAR-T Zellen einen Zytokinsturm auslösen können und somit eine Gefahr für die Gesundheit des Patienten darstellen würden (Brudno & Kochenderfer 2019).

Eines der untersuchten Interferone ist das Interferon- γ (IFN- γ). Werden T-Helferzellen durch Fremdartigen stimuliert, sezernieren sie IFN- γ . Es führt bei Makrophagen zur Aktivierung und Bildung von reaktive Sauerstoffspezies und NO-Metaboliten und kommt damit der zellulären Immunabwehr zur Hilfe.

Ein weiteres Zytokin ist das IL-2. Nach Stimulation von T-Zellen durch ein Fremdartigen sezernieren diese IL-2. Es dient vor allem als T-Zell-Wachstumsfaktor und ist ausschlaggebendes Signal im letzten Schritt der T-Zell-Aktivierung (Horn 2020). So treibt IL-2 die Entwicklung von CD4⁺-TH1- und TH2-Zellen sowie terminal differenzierten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten voran (Williams, Tzysnik, & Bevan 2006). Gleichzeitig wird dem Interleukin eine besondere Funktion bei der Reifung von regulatorischen T-Zellen zugeschrieben (Ward et al. 2018).

Zuletzt wird der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) untersucht. Der Name rührt daher, dass er in frühen Experimenten zu einer Thrombosierung von tumorzuführenden Blutgefäßen führte und damit eine Tumornekrose hervorrief. Dieses Zytokin wird sowohl von T-Zellen, im großen Maße jedoch von Makrophagen sezerniert. Es ist ein regulierendes Zytokin, welches einerseits zur Proliferation und Differenzierung von T-Zellen führt, andererseits Apoptose induzieren und zur Ausschüttung weiterer Zytokine führen kann (Horn 2020; Mehta, Gracias, & Croft 2018).

1.6 Zielsetzung

Das Neuroblastom weist trotz umfassender Forschung insbesondere im Hochrisiko-Stadium eine schlechte Überlebensrate auf (Maris 2010). Neuste intensive Forschung erprobt sich zunehmend an CAR-T Zellen und bispezifischen Antikörpern mit ersten Erfolgen bei hämatologischen Erkrankungen. Bei soliden Tumoren wie dem Neuroblastom fehlt es den Effektorzellen allerdings an der nötigen Persistenz und Potenz im immunsuppressiven Tumor-Mikroenvironment (Richards et al. 2018). Bisher wurden diese Aspekte nicht hinlänglich betrachtet, zusätzlich hat kein Forschungsprojekt CAR-T Zellen mit bispezifischen Antikörpern in Bezug auf die Therapiepotenz bei Neuroblastomzellen verglichen.

Daraus ergibt sich der notwendige Leitfaden für diese Forschungsarbeit. Als Grundlage muss für die verwendeten Neuroblastom-Zelllinien die Menge an exprimierten GD2 ermittelt werden. In einem Folgeversuche soll dann die die Aktivierung der Effektorzellen nach Kontakt mit Tumorzellen durch Bestimmung der Oberflächenantigenen CD25 und CD69 im Durchflusszytometer untersucht werden. Zur Positivkontrolle wird PHA als T-Zell spezifisches Mitogen genutzt. Als Effektorzellen werden CAR-T Zellen und aktivierte T-Zellen verwendet. Letztere entfalten ihre Wirkung in Kombination mit den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2 oder CD28-GD2 sowie beiden Antikörpern zusammen. Über den bispezifischen Antikörper CD3-CD19 kann eine unspezifische T-Zell-Aktivierung überprüft werden. Nach Färbung der Effektorzellen mit einem fluoreszierenden Zellfarbstoff können proliferierte Effektorzellen nach Kontakt mit Neuroblastomzellen im Durchflusszytometer bestimmt werden. Die zeitgleiche Untersuchung der Sekretion von TNF- α , IL-2 und IFN- γ mit Hilfe von Zytokinquantifizierungsbeads ermöglicht eine Spezifikation der Effektorzellfunktion. Abschließend kann in einem Zytotoxizitätsassay unter Zuhilfenahme von konstitutiv Luciferase exprimierenden Tumorzellen die zytolytische Potenz der CAR-T Zellen und bispezifischen Antikörper mit Hilfe von Biolumineszenz verglichen werden.

Aus der Zusammenschau der Ergebnisse wird sich schlussendlich eine solide Diskussion über die Vor- und Nachteile der beiden immuntherapeutischen Ansätze sowie der Persistenz und Potenz der Effektorzellen im immunsuppressiven Tumor-Mikroenvironment ableiten. Dadurch kann ein entscheidender Beitrag zur Entwicklung geeigneter Therapieansätze geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Softwareprodukte

Brutschrank	BB 16, CO ₂ Inkubator (Heraeus Instruments; Osterode, Deutschland)
Durchflusszytometer (FACS)	LSR Fortessa (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland), FACS Cantoll (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)
Mikroplatten Reader	Flex Station 3 Multi-Mode Mikroplatten-Reader (Molecular Devices LLC, San José, USA)
Tischzentrifugen	Biofuge Stratos (Heraeus Instruments; Osterode, Deutschland), Centrifuge 5810 (Eppendorf; Hamburg, Deutschland), Centrifuge 5810R (Eppendorf; Hamburg, Deutschland), Centrifuge 5430R (Eppendorf; Hamburg, Deutschland),
Orbital Shaker	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Tischmikroskope	Olympus IX50 (Olympus, Tokio, Japan), Olympus SC50 (Olympus, Tokio, Japan)
Software	FlowJo 7 (FlowJo LLC; Ashland, USA), GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, USA), FACS Diva v8.0.1 (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Geräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

2.2 Materialien

96-Well Mikrotiterplatten	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #655846
48-Well Platten	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #677102
Rundboden Polystyrolröhrchen, 5ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #115101

Röhrchen mit konischem Boden, 50 ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #227261
Röhrchen mit konischem Boden, 15 ml	(Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich) #188271
MACSPlex Cytokine Basic Kit	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-701
MACSPlex Cytokine 12 Standard, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-106-197
MACSPlex IFN-γ Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-695
MACSPlex IL-2 Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-704
MACSPlex TNF-α Reagents Kit, human	(Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-109-694

2.3 Chemikalien/Reagenzien/Puffer

Dimethyl Sulfoxid	(Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) #D8418-50ML
Ficoll	(GE Healthcare; Chicago, USA) #17-1440-02
EDTA	0,5M Lösung, pH 8 (Invitrogen; Carlsbad, USA) #15575020
FACS- Buffer	500ml PBS + 2 mM EDTA (2 ml einer 500 mM Lösung) + 2% FCS + 1% Penicillin/ Streptomycin Lagerung bei 2-8°C.
Phytohemagglutinin-L (PHA-L)	(Merck KgaA; Darmstadt, Deutschland) #11249738001 Lagerung bei 2-8°C.
CellTrace™ Violet dye	(Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) #C34557 Lagerung bei -20°C.

2.4 Fluoreszenzantikörper

FITC Mouse Anti-Human CD3	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #555339
BV711 Mouse Anti-Human CD4	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #563028
PerCP-CyTM5.5 Mouse Anti-human CD8	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #565310
PE-CF594 Mouse Anti-Human CD25	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #562403
PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD69	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #557745
Fixable Viability Stain 780	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #565388
PE Mouse IgG2a, κ Isotype Control	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #555574
PE Mouse Anti-Human Disialoganglioside GD2	(Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) #562100

2.5 Biologisches Material

Für die Versuche wurden drei strikt adhärent wachsende, humanen Neuroblastom-Zelllinien: LS, LAN-1 und SHSY5Y benutzt (Tabelle 1). Bei allen drei Zelllinien wurde mit Hilfe eines Vektors ein Luciferase-codierendes Gen eingesetzt.

Tabelle 1: Herkunft der humanen Neuroblastomzelllinien

Zelllinie	Charakteristika
LS	Ursprung: Abdominaltumor eines 16 Monate alten Mädchens Stadium: 3
LAN-1	Ursprung: Knochenmarksmetastase eines 2-jährigen Jungens Stadium: 4
SHSY5Y	Ursprung: Sublinie aus SK-N-SH (Knochenmarksbiopsie eines 4-jährigen Mädchens mit metastasiertem Neuroblastom) Stadium: unbekannt

Die Daten entstammen dem Leibniz Institut DMSZ (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-209>, <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-655>, <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-655>, letzter Zugriff am 11.02.2021, 19:30)

2.6 Zellkultur

Cryo-safe-I	(c.c.pro GmbH; Neustadt, Deutschland) #9208
D-PBS	(Life Technologies; Carlsbad, USA)
(21phosphate buffered saline)	#14190169
FBS (fetal bovine serum)	Hitze-inaktiviert (Life Technologies; Carlsbad, USA) #10500-064
Penicillin/ Streptomycin	(Biochrom AG; Berlin, Deutschland) #A2212
IL-7	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130-095-362
IL-15	(BioLegend; San Diego, USA) #570304
RPMI 1640 Medium	Rosewell Park Memorial Institute (Life Technologies; Carlsbad, USA) #21875091
RPMI 1640 Komplettmedium	RPMI, 10% FBS, Penicillin (10000 Units/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml)
TexMACs Medium	(Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Deutschland) #130097196
TexMACs Komplettmedium	TexMACs Medium, Penicillin (10000 Units/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml), IL-7 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml)
Trypanblau	(Life Technologies; Carlsbad, USA) #15250061
Trypsin (1:250) / EDTA (0,25%/ 0,02%)	(Biochrom AG; Berlin, Deutschland) #L2163

2.7 Zellkultivierung

Jede der drei Zellreihen wurde in einzelnen, beschichteten Zellkulturflaschen bei 37 Grad, einer relativen Luftfeuchtigkeit von >95% und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Eine tägliche Vitalitätsüberprüfung unter dem Mikroskop stellte die Qualität der Zellen sicher, dabei wurde auf morphologische Veränderungen und Kontaminationen geachtet.

Subkulturen wurden angelegt, sobald der Boden einer Zellkulturflasche vollständig bewachsen war. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml vorgewärmten Trypsin-EDTA (für Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm²) für 5 Minuten bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Der Trypsinierungsprozess wurde anschließend durch Hinzufügen von 8 ml RPMI Komplettmedium beendet. Je nach Bedarf und Zelllinie konnte nun ein Teil dieser Suspension in neue Zellkulturflaschen überführt und im Verhältnis von 1:2 bis 1:30 mit neuem Komplettmedium resuspendiert werden.

Um die Zellen auch langfristig mit niedrigen Passagezahlen nutzen zu können, wurden sie regelmäßig in Kryo-Medium eingefroren. Pro Milliliter Kryo-Medium wurden 2-4 x10⁶ Zellen aufgenommen und je in ein auf Eis vorgekühltes Kryo-Röhrchen abgegeben, um abschließend in einem Stickstofftank (-196°C) gelagert zu werden. Für die Rekultivierung wurden die Zellen langsam in einem Wasserbad von 37°C erwärmt und anschließend erneut in RPMI Komplettmedium überführt.

Jegliches Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Vor und nach jeder Benutzung wurde diese mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Zusätzlich erfolgte die wöchentliche UV- Desinfektion der Werkbank.

2.7.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung für Experimente erfolgte durch eine Anfärbung mittels des anionischen Farbstoffes Trypanblau und einer anschließenden Zählung in einer Neubauer-Zählkammer. Während vitale Zellen aufgrund der intakten Zellmembran den Farbstoff nicht aufnehmen können, werden tote Zellen dagegen angefärbt und erscheinen bei Betrachtung unter dem Mikroskop blau.

Nach Auftragen eines sauberen Deckglases auf die Trägerstäbe der Zählkammer konnten 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (im Verhältnis 10:1) durchmischt und 10 µl dieser Suspension in den Spalt zwischen Deckglas und Zählkammer abgegeben werden. Unter dem Mikroskop wurden nun in allen vier Eckquadranten die lebenden Zellen ausgezählt und ein Mittelwert berechnet. Die Konzentration der zu bestimmenden Zellsuspension errechnete sich wie folgt:

$$\text{Zellkonzentration/ml} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Unter Berücksichtigung der Zellkonzentration konnte das benötigte Volumen mit der gewünschten Zellzahl folgendermaßen bestimmt werden:

$$\text{Volumen der Ausgangslösung} = \frac{\text{gewünschtes Volumen} \times \text{gewünschte Konzentration}}{\text{Konzentration der Ausgangslösung}}$$

2.8 Verwendung der CAR-T Zellen und aktivierten T-Zellen

Die CAR-T Zellen und scheinbehandelten, aktivierten T-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Patrick Schlegel (Cancer Therapeutics Laboratory, Medical Faculty, Department of Medicine and Health, University of Sydney, Australia) zur Verfügung gestellt. Für die Kultivierung der eingefrorenen Zellen wurden diese zunächst im Wasserbad bei 37°C erwärmt, um dann mittels 20 ml vorgewärmten RPMI Komplettmediums in ein 50 ml Falcon überführt zu werden. Nach Bestimmung der Zellzahl durch die Trypanblau-Färbemethode erfolgte das Auffüllen des Falcons mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml und Zentrifugation (400G, 10°C, 10 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in TexMACS Komplettmedium so resuspendiert, dass die Zellkonzentration 1×10^6 /ml betrug. Das Komplettmedium enthielt IL-7 und IL-15, sodass es zu einer Aktivierung dieser Effektorzellen kam. Anschließend konnten die Zellen in 50 cm² große Zellkulturflaschen mit beschichtetem Boden überführt werden; nach 48-stündiger Kultivierung im Brutschrank konnten sie verwendet werden. Die Aktivität des Stoffwechsels der Zellen wurde durch regelmäßige BGA-Kontrollen (Laktat, Glucose, pH) des Mediums sichergestellt.

2.9 Lagerung der bispezifischen Antikörper

Die bispezifischen Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Patrick Schlegel (Cancer Therapeutics Laboratory, Medical Faculty, Department of Medicine and Health, University of Sydney, Australia) zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Für eine effektive Nutzung der Antikörper mussten neue Stocks mit RPMI Komplettmedium angefertigt werden, wie in Tabelle 2 gezeigt:

Tabelle 2: Verdünnungen der Antikörper

Reagenz	Ausgangskonzentration	Verdünnung	Stockkonzentration
CD3-GD2	0,8 µg/µl	5 µl Stock + 395 µl Medium	10 000 ng/ml
CD28-GD2	0,46 µg/µl	5 µl Stock + 225 µl Medium	10 000 ng/ml
CD19xCD3	10 µg/ml	-	10 000 ng/ml

2.10 Quantifizierung von GD2 auf der Oberfläche der Tumorzellen

Die Konzentration an GD2-Oberflächenmolekülen auf den Neuroblastomzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Pro Zelllinie wurden drei Ansätze mit je drei Triplikaten hergestellt:

- ungefärbte Tumorzellen als Kontrollen
- mit einer Isotyp-Kontrolle gefärbte Tumorzellen
- mit Anti-GD2-Antikörper gefärbte Tumorzellen

In jeder Probe wurden 1×10^6 Tumorzellen untersucht. Die Durchführung folgte dem in Kapitel 2.12.4 beschriebenen Prinzip. Von der Isotyp-Kontrolle wurden je 20 µl, vom Anti-GD2 Antikörper 5 µl pro Test zugegeben. Die Isotyp-Kontrollen dienen der Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung. Die Auswertung erfolgte zum einen durch Mittelwert- und Standardabweichungsbestimmung, zum anderen wurde durch Division des Medians der Antikörperfärbung durch den Median der Isotyp-Kontrolle die Median Fluorescence Intensity -Ratio (MFI-R) bestimmt. Sie dient dem Nachweis der spezifischen Anti-GD2-Antikörperbindung.

2.11 Vorversuche

Um optimale Bedingungen in den Zellkulturversuchen zu generieren, mussten primär Vorversuche durchgeführt werden. Dazu zählt die Bestimmung der passenden Tumorzell- und Effektorzellkonzentration pro Well je nach Wachstumsrate der Zelllinien und mit beidem zusammenhängend die passenden Effektorzell-/Tumorzell-Ratios (E/T-Ratios). Zur Verwendung idealer Antikörperkonzentrationen in den Hauptexperimenten wurden in Vorversuchen mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs, Akronym für Peripheral

Blood Mononuclear Cells) eines Spenders verschiedene Konzentrationen getestet. Die passende Antikörperkonzentration durfte bei hohen E/T-Ratios nicht zu zytotoxisch wirken, sollte jedoch bei niedrigen E/T-Ratios noch einen Effekt zeigen.

2.11.1 Lymphozytenisolation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Isolierung von PBMCs aus Spenderblut erfolgte zunächst die Blutentnahme von etwa 15 ml Blut in mehrere EDTA-Röhrchen. Dieses wurde mit 20 ml Komplettmedium in einem 50 ml fassenden, konischen Gefäß (im Folgenden Falcon-Röhrchen genannt) vermischt und vorsichtig invertiert. Nachdem in einem weiteren 50 ml Falcon bei Raumtemperatur (RT) 15 ml Ficoll vorgelegt wurden, konnten 35 ml der Blutsuspension in einer Pipette aufgenommen und mit Vorsicht auf das Ficoll gegeben werden. Durch Kippen des Falcon-Röhrchen wurde eine größtmögliche Oberfläche des Ficolls generiert und damit Verunreinigungen vermieden. Nach Zentrifugation (400G, 30 Minuten, Beschleunigung 4, Bremse 2) entstand eine Schichtung des Blutes gemäß Abbildung 3.

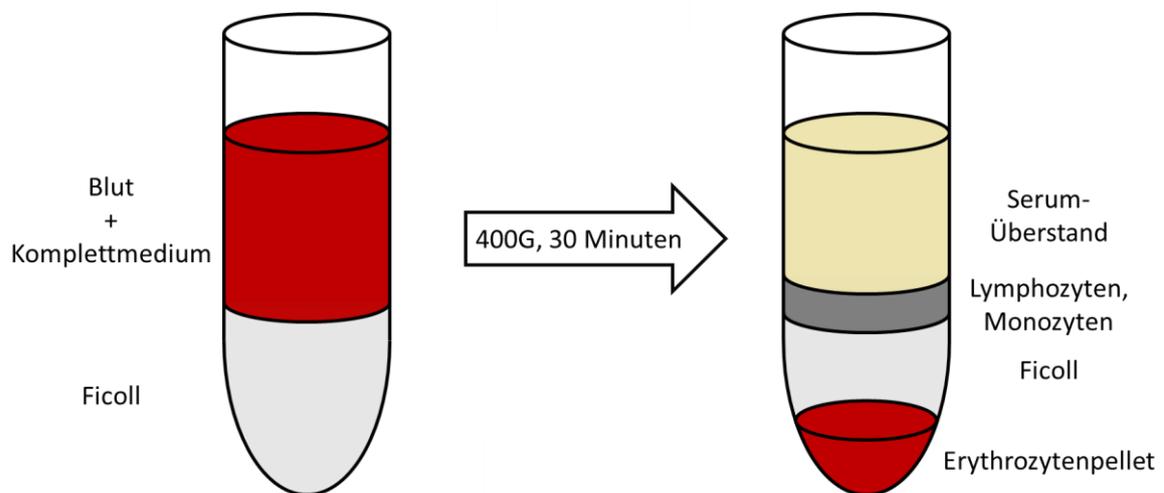


Abbildung 3 : Lymphozytenisolation mittels Ficoll

Der Serum-Überstand wurde bis 1 cm über der Lymphozyten/Monozyten-Phase abgenommen, die PBMCs anschließend in ein sauberes, 15 ml fassendes Falcon-Röhrchen überführt, bis zum Volumen von 15 ml mit Komplettmedium aufgefüllt und erneut zentrifugiert (100G, 10 Minuten). Abschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 1 ml Komplettmedium aufgefüllt und die vitale Zellzahl bestimmt.

2.11.2 Untersuchung der passenden Konzentration der bispezifischen Antikörper

Für die Ermittlung der passenden Antikörperkonzentration in den Hauptversuchen wurden zunächst Tumorzellen der Zelllinie LS ($0,5 \times 10^5$ Tumorzellen/Well) ausgesät und sowohl mit PBMCs der E/T-Ratios 2:1 und 1:1, als auch mit den bispezifischen Antikörpern (CD3-GD2, CD28-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2) der Konzentrationen 5 ng/ml sowie 50 ng/ml behandelt. Die Messung im Mikroplattenreader erfolgte nach 12, 24, 36 und 48 Stunden.

2.12 Durchflusszytometrische Untersuchung von Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Effektorzellen auf ihre Aktivierung und Proliferationsneigung nach Stimulation durch Tumorzellen und Antikörper. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry = FCM) gewählt. Diese ermöglicht es, Zellen nach ihren biologisch-chemisch-physikalischen Kriterien sowie mittels der Immunphänotypisierung (IPT) auf Oberflächenstrukturen genauestens zu charakterisieren; unabhängig von ihrem morphologischen Aussehen. Sie wird heutzutage bereits zur Diagnosestellung hämatologischer Erkrankungen herangezogen. Mittels FCM können auch kleinste Partikel von 0.5 – 50 µm Größe erfasst werden (Roland Fuchs 2013). In dieser Dissertation wurden insbesondere die Differenzierungsantigene, auch „Cluster of Differentiation“ (CD) genannt, durch Nutzung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern untersucht.

Werden bei der IPT mehrere Antikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen genutzt, so muss eine Kompensation erfolgen. Der Grund ist eine Überlappung der Fluoreszenzsignale. Automatisiert erfolgte dieser Schritt mit Hilfe der Kompensationsfunktion der FACS-Diva™ Software. Da die Software bei einem siebenstelligen Antikörperpanel zu Fehlern führt, wurde die vorgegebene Kompensation manuell nachgebessert.

Nach erfolgreicher Kompensation erfolgte die Erstellung eines Mess-Panels mittels der FACSDIVA™-Software, welches für alle Messungen sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden genutzt wurde. Es wurden jeweils 10.000- 20.000 Effektorzellen pro Röhrchen gemessen, je nach Proliferationsneigung. Ziel war stets, so viele

Effektorzellen wie möglich zu messen, um eine möglichst genaue und gleichmäßige prozentuale Verteilung zu erhalten.

2.12.1 Bestimmung der korrekten PHA-Konzentration

Für die Bestimmung der Proliferationsneigung war es wichtig, mit Hilfe von Positivkontrollen nachzuweisen, dass die Effektorzellen in der Lage sind zu proliferieren sowie die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Für diese Positivkontrolle wurde die Substanz Phytohemagglutinin (PHA) genutzt. PHA gehört zur Gruppe der Lektine und ist ein bekanntes, T-Zell-spezifisches Mitogen. Es führt bei Bindung zur unspezifischen, polyklonalen Aktivierung und Proliferation (O'Flynn et al. 1986). Zur Ermittlung der optimalen Konzentration erfolgte zunächst die Isolation von PBMCs aus Spenderblut und die Färbung mittels CellTrace™ Violet Dye (siehe Abschnitt 2.12.3). Nach Aussaat in 48-Well-Platten wurden die PBMCs mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml) von PHA inkubiert. Nach 96 Stunden erfolgte die Analyse der Proliferation und Aktivierung nach in Abschnitt 2.12.4 beschriebenen Schema.

2.12.2 Fluoreszenz Minus One Kontrollen (FMO)

Für eine korrekte Auswertung der Ergebnisse wurden Kontrollen angefertigt, so genannte FMO-Kontrollen (engl. für Fluorescence Minus One). Die Idee hinter dieser Methode ist, dass verschiedene Kontrollfärbungen mit der Gesamtfärbung der Proben verglichen werden. Dadurch, dass in den Kontrollfärbungen je ein Fluoreszenzfarbstoff fehlt, können anhand der Signalunterschiede eindeutige Gates zur Abgrenzung unterschiedlicher Zellpopulationen gesetzt werden (Giesecke 2017). Pro FMO-Kontrolle und Effektorzelltyp (CAR-T Zellen oder aktivierte T-Zellen) wurden drei Triplets angesetzt.

2.12.3 Versuchsaufbau

Für die Untersuchung der Aktivierung und Proliferation mittels Durchflusszytometrie wurde eine E/T-Ratio von 1:1 verwendet. Als Endkonzentration im Well sowohl der Tumor- als auch der Effektorzellen wurde $0,5 \times 10^6$ /ml, also eine Gesamtmenge von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ Well bei insgesamt 400 µl Volumen, festgelegt.

Als erster Schritt des Experiments erfolgte die Färbung der Effektorzellen mit CellTrace™ Violet Dye. Dieser Farbstoff ermöglicht die Analyse der Proliferation von Effektorzellen durch Farbstoffverdünnung: je größer die Generationszahl, desto weniger Farbstoff enthalten die Zellen (Langsdorf et al. 2010).

Jede Färbung wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angefertigt. Dazu wurde zu der Stock-Konzentration des Farbstoffs von 5 mM eine Gesamtmenge von 20 µl DMSO zugegeben, dies ergab die Arbeitskonzentration von 5µM. Nachdem die Effektorzellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt waren, wurde zu dieser Suspension pro Milliliter 1µl CellTrace™ der Arbeitskonzentration zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend die Zugabe von RPMI-Komplettmedium mit einem Fünffachen des ursprünglichen Volumens; das darin enthaltene Protein entfernte überschüssigen Farbstoff. Schlussendlich konnte die Suspension zentrifugiert, der Überstand dekantiert, und das Pellet mit vorgewärmten RPMI-Komplettmedium auf die gewünschte Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml aufgefüllt werden.

Für die Positivkontrollen erfolgte das Ansetzen eines speziellen PHA-Mediums. Nachdem die Vorversuche eine optimale PHA-Konzentration im Well von 2,5 µg/ml ergaben, wurden 2,8 µl des Stocks (Stockkonzentration 5 µg/µl) mit 1397,2 µl Komplettmedium vermischt. Es entstand eine Arbeitskonzentration von 10 µg/ml, welches nach der vierfachen Verdünnung im Well zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml führte.

Im nächsten Schritt wurden die Tumorzellen der drei Zelllinien auf eine Arbeitskonzentration von 2×10^6 Zellen/ml sowie die monoklonalen Antikörper (mAK) auf die in Tabelle 3 beschriebenen Konzentrationen eingestellt.

Tabelle 3: Vorbereitung der Reagenzien im Aktivierungs- und Proliferationsassay

Reagenz	Hergestellte Konzentration	Endkonzentration im Well
CD3-GD2	20 ng/ml	5 ng/ml
CD28-GD2	20 ng/ml	5 ng/ml
Mix*	Je Antikörper 20 ng/ml	Je Antikörper 5 ng/ml
CD3-CD19	20 ng/ml	5 ng/ml

*Ergänzung: Mix = CD3-GD2 + CD28-GD2

Insgesamt wurden die in Tabelle 4 dargestellten Ansätze generiert und in eine 48-Well Platte pipettiert.

Tabelle 4: Inhalt der Ansätze in 48-Well Platten im Aktivierungs- und Proliferationsassay

Ansätze	Inhalt
Negativkontrolle	100 μ l Effektorzellen* + 300 μ l Medium**
Positivkontrolle	100 μ l Effektorzellen* + 200 μ l Medium + 100 μ l PHA-Medium**
Ansatz 1 (w mAK)	100 μ l Tumorzellen + 100 μ l Effektorzellen* + 100 μ l mAK + 100 μ l Medium**
Ansatz 2 (w/o mAK)	100 μ l Tumorzellen + 100 μ l Effektorzellen* + 200 μ l Medium**
Ansatz 3 (E* w mAK)	100 μ l Effektorzellen* + 100 μ l mAK + 200 μ l Medium**
E* ungefärbt	100 μ l Effektorzellen* (ohne CellTrace™) + 300 μ l Medium**
Tumor gefärbt	100 μ l Tumorzellen + 300 μ l Medium**
FMO-Kontrollen	100 μ l Effektorzellen* + 300 μ l Medium**

*Ergänzung: E= Effektorzellen = CARTs oder aTc

**Ergänzung: Medium = RPMI Komplettmedium

Nach Pipettieren der Ansätze in Triplets erfolgte die Inkubation der Platten im Brutschrank. Jede Platte wurde in zweimaliger Ausführung pipettiert, je eine Platte für die Messung nach 48 Stunden und eine für die Messung nach 96 Stunden. Die Durchführung eines einzigen Versuches zeigte sich als ausreichend, da die Methode bei korrekter Anwendung sehr genaue Daten generiert.

2.12.4 Oberflächenfärbung der Effektorzellen

Damit unterschiedliche Oberflächenantigene in der FCM dargestellt werden können, müssen die Effektorzellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt werden. Zu diesem Zweck erfolgte nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit das Umpipettieren der Ansätze in 5 ml fassende Rundboden-Polystyrolröhrchen (im Folgenden als FACS-Röhrchen bezeichnet). Um Fluoreszenzsignale durch Tumorzellen ausschließen zu können, wurden ebenfalls Triplets nur mit Tumorzellen pipettiert und der Überstand ebenfalls untersucht.

Jedes Röhrchen wurde im Folgenden mit 2 ml DPBS aufgefüllt und die Zellen gewaschen (400G, 5 Minuten, RT). Nach Dekantieren des Überstandes erfolgte die Zugabe von 100 µl des zuvor hergestellten Mastermixes (siehe Tabelle 5) und eine Inkubation im Kühlschrank bei 2-8°C für 30 Minuten. Zum Schluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert (400G, 5 Minuten, RT), dekantiert und mit 300 µl FACS-Buffer vermischt. Anschließend folgte die Messung im Durchflusszytometer.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix zur Immunphänotypisierung

Inhalt	Konzentration	Volumen
DPBS	100 µl/ Well	9300 µl
FITC-CD3	20µl/10 ⁶ Zellen	372 µl
BV711- CD4	5µl/10 ⁶ Zellen	93 µl
PerCP-Cy TM 5.5 -CD8	5µl/10 ⁶ Zellen	93 µl
PE-CF594- CD25	5µl/10 ⁶ Zellen	93 µl
PE-Cy TM 7- CD69	5µl/10 ⁶ Zellen	93 µl
FVS 780- APC Cy TM 7	1µl/10 ⁶ Zellen	18,6 µl

Der Farbstoff FVS (Fixable Viability Stain) 780 diente der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Er bindet sowohl an zelloberflächliche sowie intrazelluläre Amine. Bei nekrotischen Zellen, dessen Zellwand für den Farbstoff permeabel geworden ist, führt die Färbung zu einer 10-20-fach erhöhten Intensität der Fluoreszenz, was sie von lebenden Zellen unterscheidbar macht (BD Biosciences 2017)

2.12.5 Auswertung der Ergebnisse und Gating-Strategie

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Datenanalyseprogramm FlowJo 7. Die Populationengates wurden anhand der FMO-Kontrollen gesetzt und für alle Proben identisch angewendet. Für das Gating der Aktivierungsmarker wurden zusätzlich die Negativkontrollen verwendet.

Zu Beginn der Auswertung erfolgte das Gating der Lymphozytenpopulation aus freier Hand im Forward Scatter (FSC) / Side Scatter (SSC) Dot-Plot. In einem neuen Dot-Plot wurden in dieser Population mittels des Fixable Viability Stains die avitalen von vitalen Zellen getrennt und diese wiederum auf ihr Vorliegen in Einzelzellen im Gegensatz zu Zellaggregaten untersucht. In einem neuen Histogramm konnten die vitalen Einzelzellen nun auf die Expression des Markers CD3⁺ charakterisiert werden. Nur bei den CD3⁺-Zellen folgte anschließend die Differenzierung in CD4⁺- und CD8⁺- Zellen. Jede einzelne daraus ermittelte Population wurde schlussendlich auf die Aktivierungsmarker CD25⁺ und CD69⁺ untersucht. In Abbildung 4 und Abbildung 5 ist die Gatingstrategie exemplarisch dargestellt. Diese Auswertung erfolgte primär für den Zeitpunkt nach 48 Stunden.

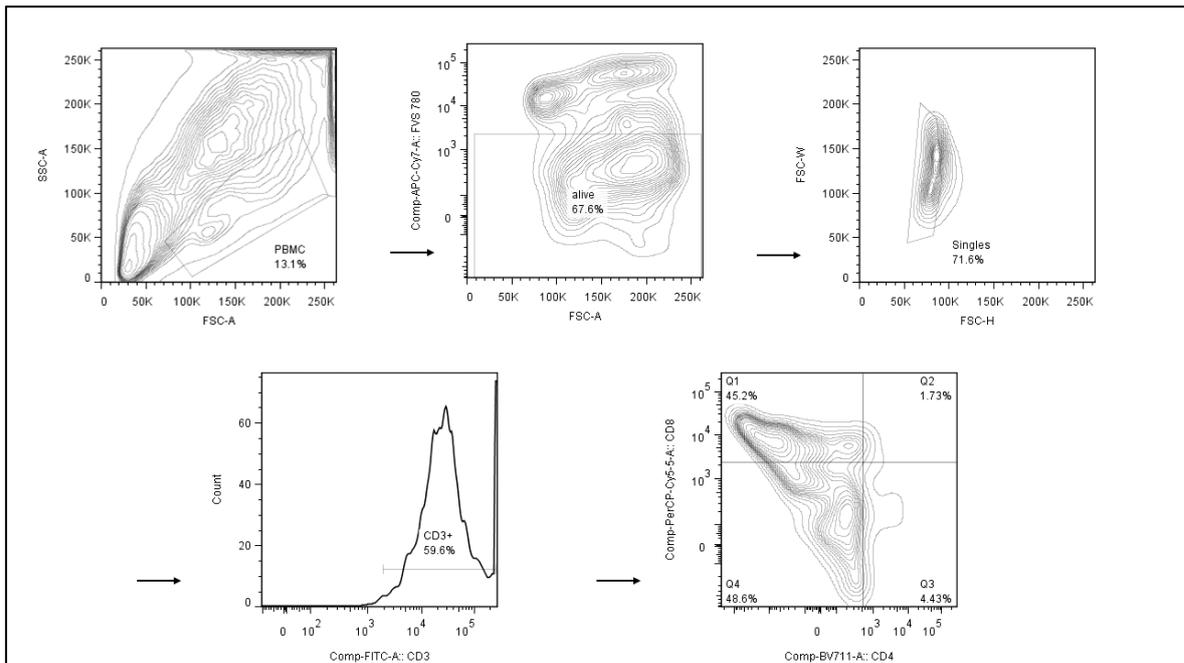


Abbildung 4: Exemplarische Gatingstrategie

Zunächst wurden PBMCs von Zellschrott, lebende von den nekrotischen Zellen und Einzelzellen von Zellaggregaten getrennt (obere Reihe). Anschließend erfolgte die Selektion nach CD3⁺ - Zellen und aus dieser Population die Unterscheidung nach CD4⁺- und CD8⁺-Positivität (untere Reihe).

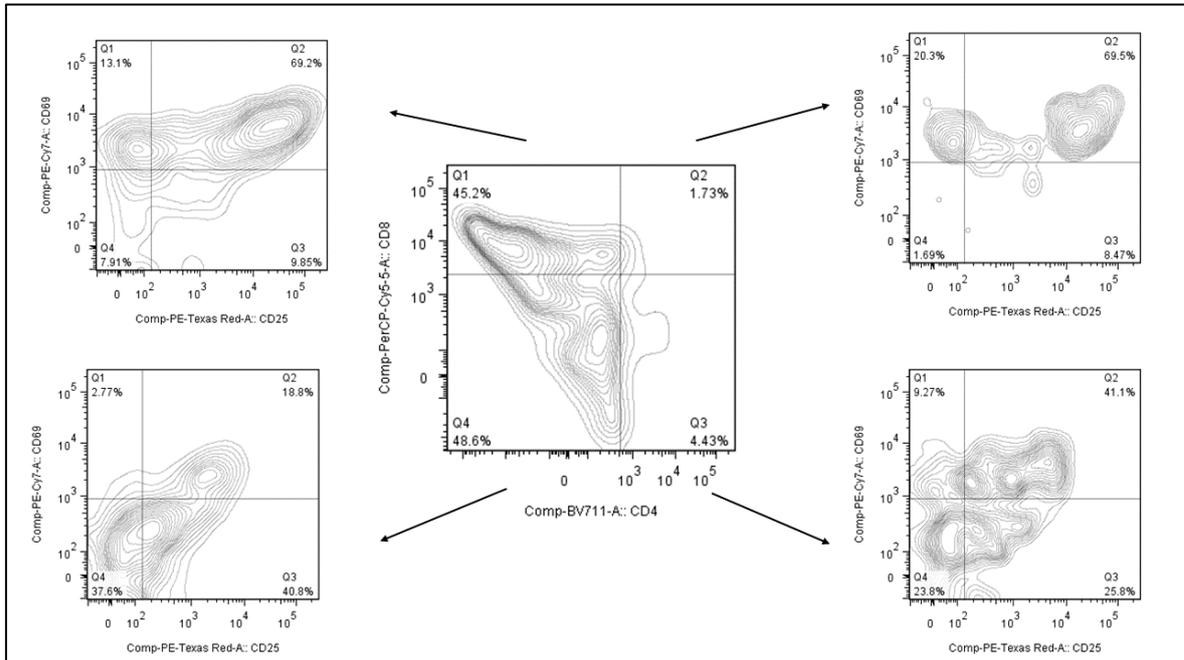


Abbildung 5: Gating Strategie: Differenzierung der Populationen je nach CD4 und CD8

Es erfolgte die Untersuchung der verschiedenen CD4/CD8 Populationen (Q1-Q4) auf die Aktivierungsmarker CD25⁺ und CD69⁺.

Die Auswertung der Proliferation wurde mit den Ergebnissen der 96-Stunden Messung durchgeführt. Nach Ermittlung der vitalen, einzelnen Zellen

(Gatingstrategie wie in Abbildung 4) konnte ein Histogramm angefertigt werden, auf dessen X-Achse die Signalintensität und auf der Y-Achse die Zellzahl aufgetragen ist, beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt.

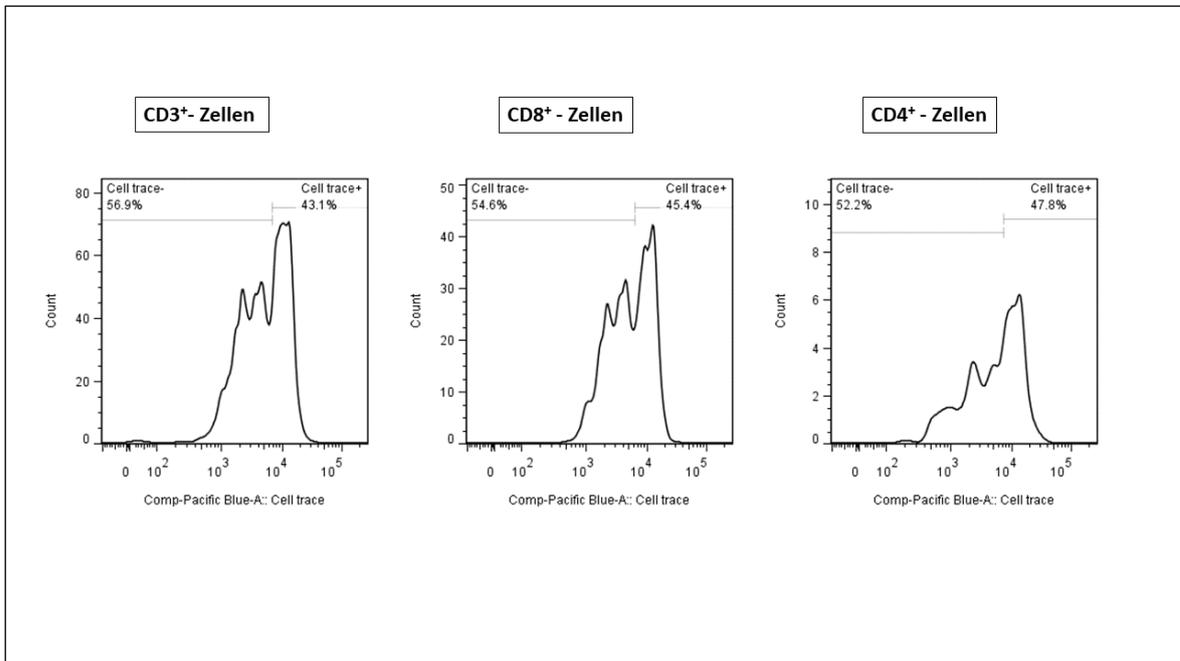


Abbildung 6: Gatingstrategie der Proliferation

Nach Einteilung der Effektorzellen wie in Abbildung 5 gezeigtem Schema erfolgte die Untersuchung der Proliferationsneigung je nach Zellpopulation. Das Gate wurde streng nach der Negativkontrolle gesetzt, wobei die Population „Cell trace-“ die proliferierten Zellen wiedergibt.

Mit Hilfe der Negativkontrolle wurde ein vertikales Gate gesetzt und der prozentuale Anteil der proliferierten Zellen ermittelt. Dabei stellen die in der Abbildung als Celltrace negativ markierten Zellen die proliferierten Effektorzellen dar.

2.13 Analyse der Zytokinausschüttung der Effektorzellen

Eine weitere Säule des *in vitro* Vergleichs beider Therapieansätze stellt die Untersuchung der Zytokinausschüttung nach Aktivierung der Effektorzellen dar.

Als Untersuchungsmethode wurde erneut die Durchflusszytometrie genutzt. Mit Hilfe von sogenannten MACSPlex Capture Beads können in einer Probe gleichzeitig die Konzentrationen unterschiedlicher Zytokine gemessen werden. Die Basis bilden dabei an der Oberfläche der Capture Beads gebundene Antikörper. Diese können spezifisch ein Zytokin binden, anschließend wird durch Zugabe von wiederum spezifischen, APC-konjugierten und damit fluoreszierenden Antikörpern (Detection Reagent genannt) ein Zusammenschluss aus Capture Bead, Zytokin und Detection Reagent gebildet. Mit Hilfe einer Standardkurve, bei der bekannte Konzentrationen

gemessen werden, lässt sich bei der Auswertung die fragliche Zytokinkonzentration bestimmen. Insgesamt wurde die Ausschüttung der Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α untersucht.

2.13.1 Versuchsaufbau

Für den Einsatz der bispezifischen Antikörper wurden dieselben Konzentrationen wie schon zuvor im Aktivierungs- und Proliferationsassay verwendet (5 ng/ml pro mAK). Aus den Vorversuchen wurde für die Tumorzellkonzentration ein Wert von $0,5 \times 10^5$ Zellen/Well ermittelt sowie die E/T-Ratio auf 1:1 festgelegt.

Die folgende Tabelle 6 zeigt, welche Ansätze in Triplets in eine 96-Well Platte pipettiert wurden.

Tabelle 6: Inhalt der Ansätze für den Zytokinassay vor Inkubation

Ansätze	Inhalt
Nur Effektorzellen*	50 μ l Effektorzellen* + 150 μ l Komplettmedium
Nur Tumorzellen	50 μ l Tumorzellen + 150 μ l Komplettmedium
Mit mAK	50 μ l Tumorzellen + 50 μ l aTc + 50 μ l mAK + 50 μ l Komplettmedium
Ohne mAK	50 μ l Tumorzellen + 50 μ l Effektorzellen* + 100 μ l Komplettmedium

*Ergänzung: Effektorzellen = CAR-T Zellen oder aTc

Nach Inkubation von 16 Stunden im Brutschrank wurde die 96-Well Platte bei zentrifugiert (10.000 G, 10 Min, 4°C). Nachfolgend konnten die Überstände mit den Zytokinen mit einer Pipette in eine neue 96-Well Filterplatte überführt werden. Für die nächsten Schritte wurde auf nicht-absorbierenden Oberflächen gearbeitet, da die Filterplatte einen für Flüssigkeiten durchgängigem Boden aufwies. Zur Vorbereitung wurde die Filterplatte mit 200 μ l Buffer gefüllt, auf einer normale 96-Well Platte platziert und beide zusammen zentrifugiert (300 G, 3 Min, RT).

Zwischenzeitig erfolgte die Vorbereitung der Standardreihe. Zu diesem Zweck wurde lyophilisiertes PMx Cytokin 12 Standard aufgetaut und mit 200 μ l MACSPlex Buffer vermischt, dies ergab die vorgegebene Konzentration von 10.000 pg/ml. Anschließend wurden 5 Eppendorf Reaktionsgefäße mit je 200 μ l MACSPlex Buffer befüllt. Schlussendlich konnten 50 μ l des aufgetauten Standards in das erste Gefäß

gefüllt, vorsichtig vermischt und erneute 50 μl aus diesem Gefäß in das Zweite gefüllt werden. Diese serielle Verdünnung wurde durchgeführt, bis jedes Reaktionsgefäß mit Zytokinen befüllt worden war. Abschließend wurden je 50 μl aller Ansätze in die Filterplatte pipettiert.

Es folgte die Vorbereitung der Capture-Beads und Detection Reagents, wie in Abbildung 7 dargestellt.

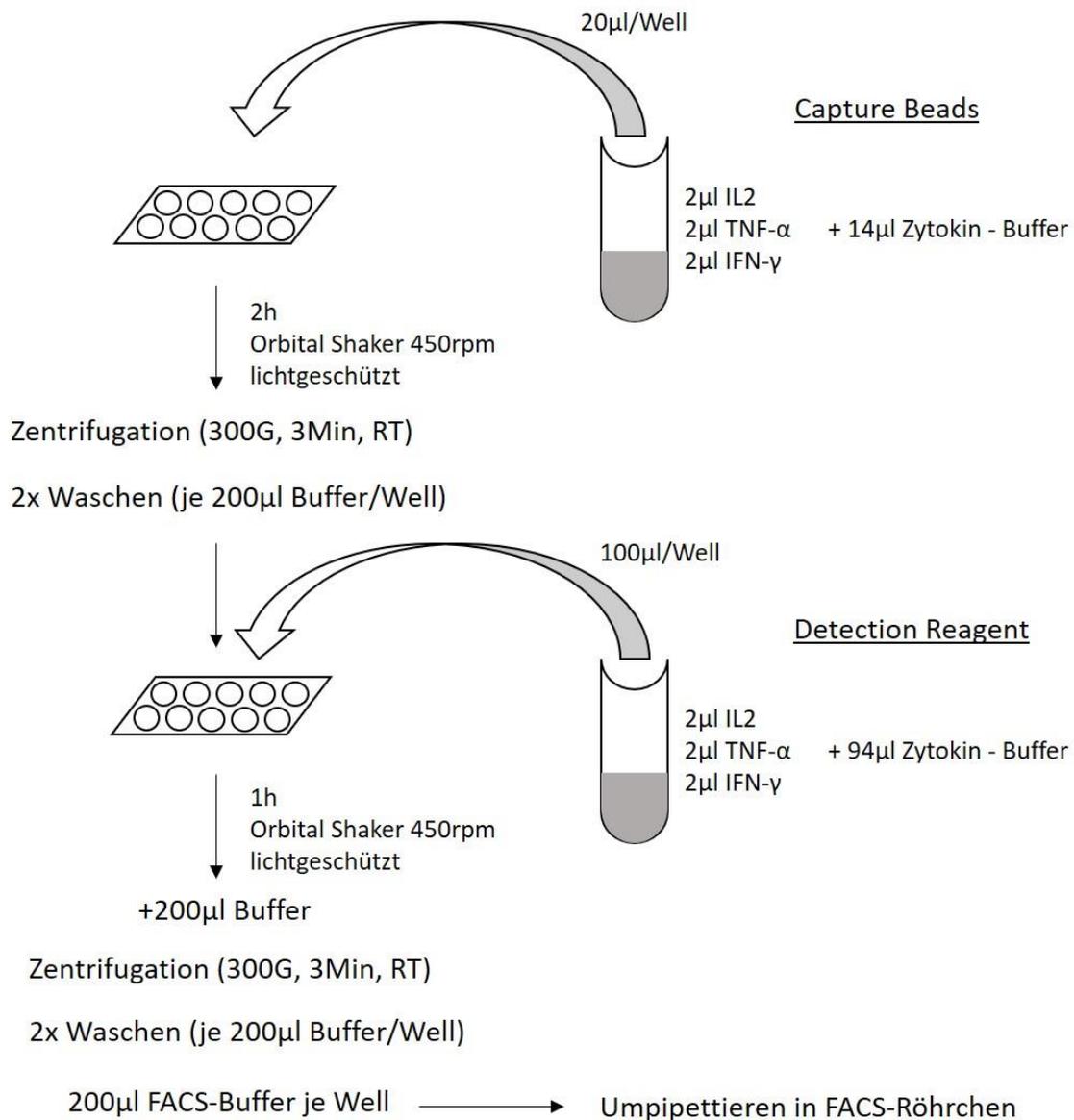


Abbildung 7: Vorbereitung der Capture Beads und des Detection Reagents

Pro Well und pro Zytokin wurden 2 μl der Zytokin-Capture Beads in ein Falcon-Gefäß gegeben und mit 14 μl Zytokin-Buffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μl pro Well aufgefüllt. Nach Pipettieren dieses Volumens in jedes Well folgte eine zweistündige Inkubation lichtgeschützt auf einem Orbital Shaker bei 450 rpm und anschließend die Zentrifugation der Filterplatte mit zweimaligem Waschen mit 200 μl Zytokin-Buffer. Für den Mastermix wurden 2 μl des jeweiligen Detection-Reagents pro Zytokin und pro Well in ein neues Falcon Röhrchen gegeben und mit 94 μl Zytokin-Buffer auf ein Gesamtvolumen von 100 μl pro Well aufgefüllt und in jedes Well pipettiert. Nach erneuter Inkubation, Zentrifugation und Waschen erfolgte das Umpipettieren in FACS-Röhrchen.

Nach Umpipettieren der Proben in FACS-Röhrchen erfolgte für die Zeit bis zur Messung die Lagerung auf Eis und lichtgeschützt.

2.13.2 Messung der Proben im Durchflusszytometer

Für die Messung der Zytokinkonzentrationen wurde keine Kompensation benötigt, da drei Fluorochrome (FITC, PE und APC) genutzt wurden, dessen Wellenlängen sich nicht überlappen. Die Messung erfolgte am BD LSRFortessa™. Mit Hilfe von Setup Beads erfolgte die Einstellung der Spannungen im Messpanel.

Die Messung wurde beendet, sobald pro Röhrchen eine Gesamtzahl von 900 Events verzeichnet wurde. Die Messreihenfolge begann mit der Standardreihe, dabei zunächst mit der Negativkontrolle (nur Medium), darauffolgend die größte Verdünnung, und endete mit der höchsten Konzentration an Zytokinen. Nach Messung beider Standardreihen nach diesem Prinzip wurde mit der Messung der Ansätze fortgefahren.

2.13.3 Auswertung der Zytokinprofile

Die Auswertung der Zytokinkonzentration erfolgte zunächst in FlowJo 7, insbesondere wurde hier der APC-Median für jedes Zytokin in jeder Probe bestimmt. Nach dem Exportieren dieser Werte nach Excel konnte mit den APC-Werten der Standardreihe eine separate Standardkurve samt linearer Funktionsformel für jedes Zytokin erstellt werden. Mit Hilfe dieser Formel gelang die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in den Proben.

2.14 Bestimmung der Tumorviabilität mittels Luciferaseassay

Ziel des Assays war es, die zytotoxischen Effekte von CAR-T Zellen, aktivierten T-Zellen sowie der bispezifischen Antikörper CD3-GD2, CD28-GD2 und beide Antikörper zusammen zu vergleichen. Der CD3-CD19 Antikörper diente dabei zur Kontrolle als unspezifischer CD3-Stimulator.

Um die verschiedenen Behandlungsansätze bezüglich der Lysefähigkeit zu untersuchen, wurde ein Luciferaseassay gewählt und die Tumorviabilität nach Behandlung mit unterschiedlichen Ansätzen gemessen. Vorausgesetzt die verwendeten Tumorzellen enthalten das Luciferase-Gen in ihrem Genom, können diese nach Expression der Luciferase das zum Medium zugegebene Luciferin

spalten. Dabei wird freiwerdende Energie als messbare Lumineszenz emittiert, die Quantifizierung erfolgt im Mikroplattenreader. Die gemessene Lumineszenz ist dabei proportional zu den emittierten Photonen (Lomakina, Modestova, & Ugarova 2015). Je mehr Tumorzellen vorhanden sind, desto größer sind die Messwerte. Abgetötete Tumorzellen sind dagegen nicht mehr in der Lage, Luciferin umzusetzen, somit ist die gemessene Biolumineszenz in Wells mit abgestorbenen Tumorzellen geringer.

2.14.1 Versuchsaufbau

Wie bereits in Tabelle 3 wurden auch hier die bispezifischen Antikörper auf eine Endkonzentration von 5 ng/ml im Well eingestellt. Das Luciferin wurde auf eine Konzentration von 4 µg/ml eingestellt, sodass die Endkonzentration im Well 1µ/ml betrug.

Aus den Vorversuchen wurde für die Tumorzellkonzentration ein Wert von $0,5 \times 10^5$ Zellen/Well ermittelt. Im weiteren Schritt erfolgte die serielle Verdünnung der CAR-T Zellen und aktivierten T-Zellen in insgesamt acht Stufen, je nach gewünschter E-/T-Ratio. Diese lagen im Bereich zwischen 1:1 und 0,005:1.

Zum Abschluss der Vorbereitung wurde eine Titrationsreihe erstellt, diese diente bei der Auswertung der Berechnung der Viabilität der Tumorzellen. Zu diesem Zweck wurden 15 ml Falcons mit Konzentrationen von $0,5 \times 10^5$ bis $0,05 \times 10^5$ Tumorzellen/Well angesetzt.

Nach erfolgter Vorbereitung konnten die Ansätze in eine 96-Well-Mikrotiterplatte jeweils in Triplets pipettiert werden. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 7 aufgeführt. Für die anschließende Messung war es wichtig, dass jedes Well das gleiche Volumen von 200 µl enthielt, somit mussten Wells mit weniger Volumen mittels Komplettmediums auf das Endvolumen aufgefüllt werden.

Tabelle 7: Inhalt der Ansätze in 96-Well Platten im Luciferaseassay

Ansätze	Inhalt
Medium	150 µl Komplettmedium + 50 µl Luciferin
Tumorzellen	50 µl Tumorzellen + 100 µl Komplettmedium + 50 µl Luciferin
Mit mAK	50 µl Tumorzellen + 50 µl aTc + 50 µl mAK + 50 µl Luciferin
Ohne mAK	50 µl Tumorzellen + 50 µl Effektorzellen* + 50 µl Komplettmedium + 50 µl Luciferin

*Ergänzung: Effektorzellen = CAR-T Zellen und aTc

Es wurde stets Komplettmedium bei der Versuchsdurchführung verwendet. Nach Abschluss des Pipettierens wurden die Platten in den Brutschrank bei 37°C für zunächst 12 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Messung im Mikroplattenreader, so auch nach 24, 36 und 48 Stunden.

2.14.2 Messung der Mikrotiterplatten im Mikroplattenreader

Die Messung der Mikrotiterplatten erfolgte im Flex Station 3 Multi-Mode Mikroplatten-Reader. Rechtzeitig vor der geplanten Messung wurde das Gerät hochgefahren und auf 37°C vorgewärmt. Sofort nach Entnahme einer Platte aus dem Brutschrank erfolgte die Messung, da es anderenfalls zu temperaturabhängigen Schwankungen im pH kommen konnte. Nach Messung der gesamten Platte wurde diese ohne Verzögerung zur weiteren Inkubation zurück in den Brutschrank gestellt.

2.14.3 Auswertung der Tumorviabilität

Die gemessenen Daten wurden aus dem Mikroplattenreader exportiert und mit Hilfe von Excel ausgewertet.

Das Messgerät war so konfiguriert, dass es die Platte vertikal maß. Somit begann die Messung mit A1 und wurde mit B1, C1 etc. fortgeführt. H12 war somit das zuletzt gemessene Well.

Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen, korrektem Pipettieren und optimalen Messbedingungen kam es gerätebedingt zu einer Abnahme der gemessenen Lumineszenz bei späteren Messzeitpunkten. Aus diesem Grund ist das Pipettierschema so gewählt worden, dass in den Wells A1-H1 sowie A5-H5 und

A12-H12 nur Tumorzellen der Konzentration von 0.5×10^5 /Well ausgesät worden sind. Mit Hilfe einer linearen Funktion, der Korrekturformel, konnte die Abnahme in Abhängigkeit des Messzeitpunktes ermittelt werden (siehe Abbildung 8) und somit die korrekte Lumineszenz berechnet werden.

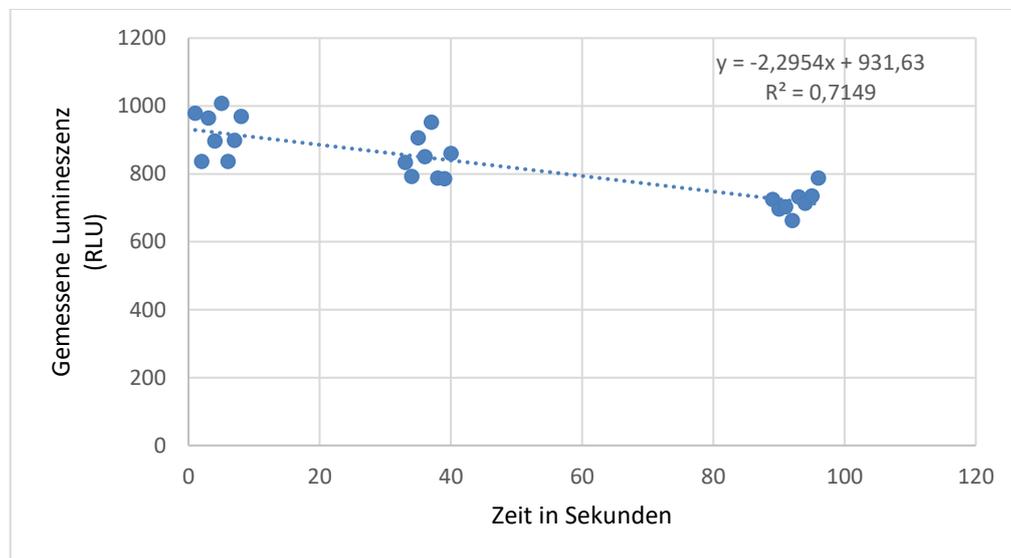


Abbildung 8: Darstellung der Lumineszenzabnahme und daraus resultierende Korrekturformel im Zytotoxizitätsassay

Dargestellt ist ein Beispiel für eine lineare Funktion, welche die Abnahme der Lumineszenz, gemessen in relativer Lichteinheit (RLU), je nach Messzeitpunkt bei gleichem Wellinhalt von 0.5×10^5 Tumorzellen/Well zeigt.

Zur Berechnung der unverfälschten Lumineszenz wurde zunächst mit Hilfe der Korrekturformel der Wert für das letzte, also 96. Well berechnet (B3 in Abbildung 9) und mit diesem Wert die prozentuale Abnahme vom ersten zum letzten Well ermittelt (D4 in Abbildung 9). Durch Division dieses Wertes durch 96 (für die 96 Wells) konnte die prozentuale Abnahme der Lumineszenz pro Well berechnet werden (= Korrekturfaktor der Lumineszenz).

	1	2	3	4
A	Y-Achsen Schnittpunkt	100%	932	
B	Well 96	? %	711	
C	Y-Achsen Schnittpunkt/Well 96		0.76350365	76.35%
D	Prozentuale Abweichung= 1- C3		0.23649635	23.65%
E	lineare %-Änderung pro Well		0.0024635	0.25%

Abbildung 9: Berechnung des Korrekturfaktors der Lumineszenz

Anschließend erfolgte mit Hilfe dieser Werte die Berechnung der tatsächlichen Lumineszenz durch die Formel:

$$y = x * (1 + (\text{Korrekturfaktor} * t))$$

Dabei steht x für die gemessene Lumineszenz und t für das Zeitintervall, nach welchem das Well gemessen wurde.

Im nächsten Schritt konnte mit den Werten der Verdünnungsreihe eine Lyseformel aufgestellt werden, welche den linearen Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und korrigierter Lumineszenz zeigt (Abbildung 10).

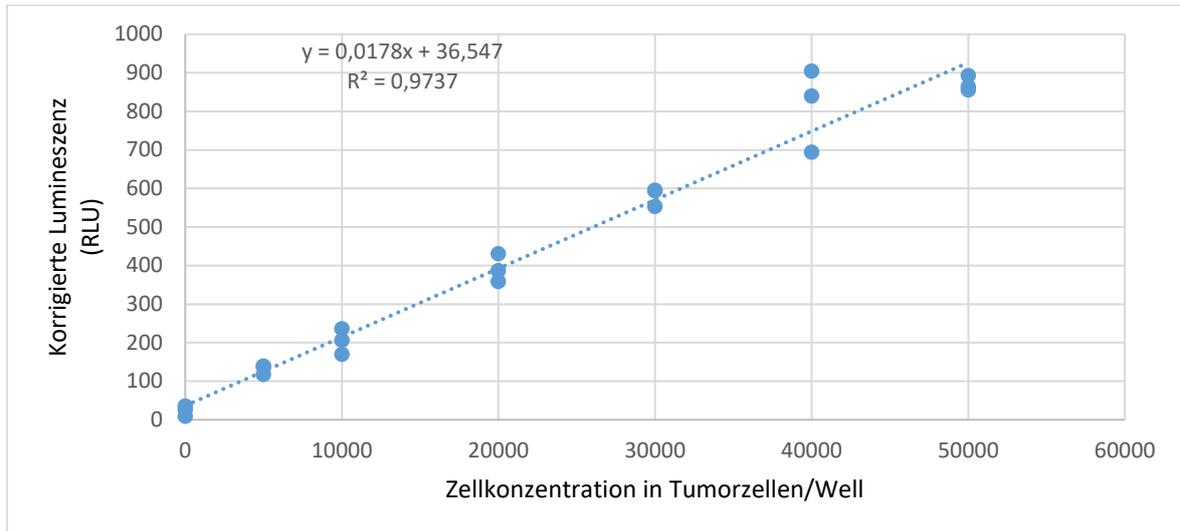


Abbildung 10: Lyseformel auf Grundlage der Verdünnungsreihe

Mit Hilfe der Lyseformel und der korrigierten Lumineszenz konnte schlussendlich die Tumorviabilität durch Auflösen der Lyseformel nach x berechnet werden:

$$\frac{y - 36.547}{0.0178} = x$$

Dividiert man diesen Wert durch 50.000, wird die Viabilität in Prozent berechnet.

2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 6. Zur deskriptiven Statistik wurden Mittelwerte von je 4 unabhängigen Experimenten bei den Versuchen im Rahmen der Tumorviabilitätsassays errechnet und die Standardabweichung bestimmt. Sowohl für den Aktivierungs- und Proliferationsassay als auch für den Zytokinassay war die Durchführung und Analyse eines einzigen Experiments aufgrund der hohen Genauigkeit der Durchflusszytometrie ausreichend. Hier erfolgte die Testung von Triplets und anschließend die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung.

Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz für Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0.05$ festgelegt. Je nach Versuchsaufbau wurden unterschiedliche post-hoc Tests verwendet (Sidak, Tukey, Dunnett).

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der GD2-Oberflächenmoleküle je nach Tumorzelllinie

Um im Vorwege die Neuroblastomzelllinien bezüglich der Expression von GD2 auf der Zelloberfläche unterscheiden zu können, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse, deren Ergebnisse in Abbildung 11 aufgezeigt werden:

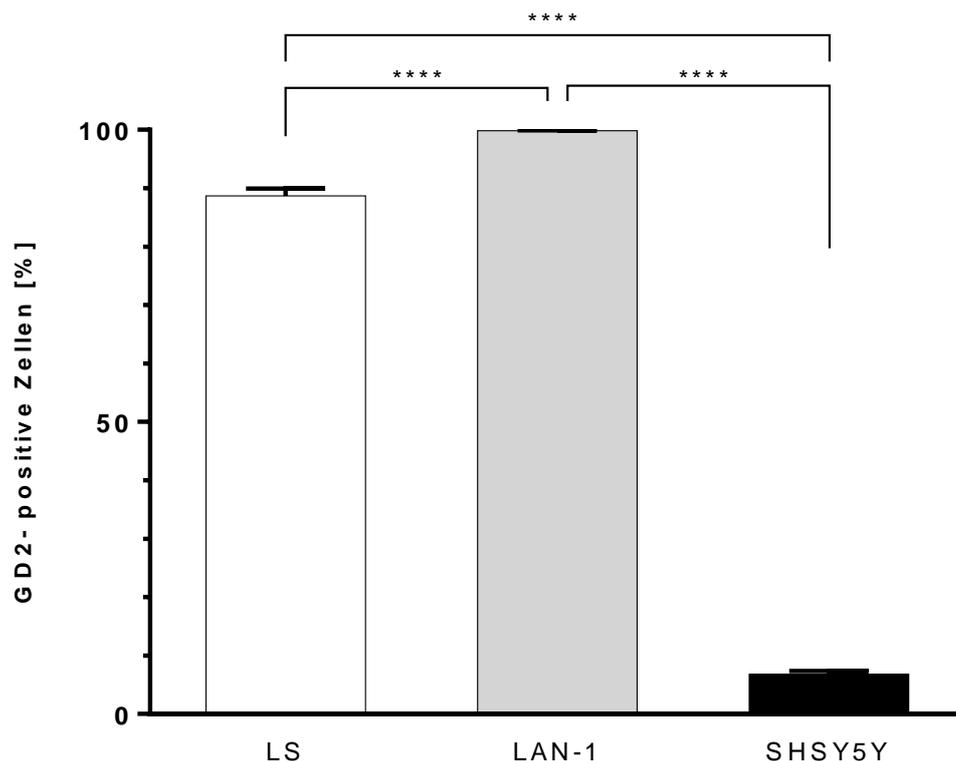


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der GD2-Expression auf NB-Zelllinien

Die NB-Zellen wurden mit einer Isotyp-Kontrolle sowie mit einem Anti-GD2-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen jeweils eines technischen Triplets von einem Experiment ($n=1$) sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Test. **** $p \leq 0.0001$.

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede der GD2-Expression zwischen den Zelllinien, $F(2, 6) = 11722$, $p \leq 0.0001$. Die Zelllinie LAN-1 wies mit einem Anteil von 99,9 % (SD 0,1) GD2-positiv gefärbter Tumorzellen den höchsten Wert auf, während die Zelllinie LS mit 88,7 % (SD 1,3) etwas weniger GD2-Oberflächenmoleküle präsentierte. Bei der Zelllinie SHSY5Y konnten 6,8% (SD 0,6) der Tumorzellen positiv auf GD2 gefärbt werden.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Untersuchung des MFI-R, gezeigt in Abbildung 12.

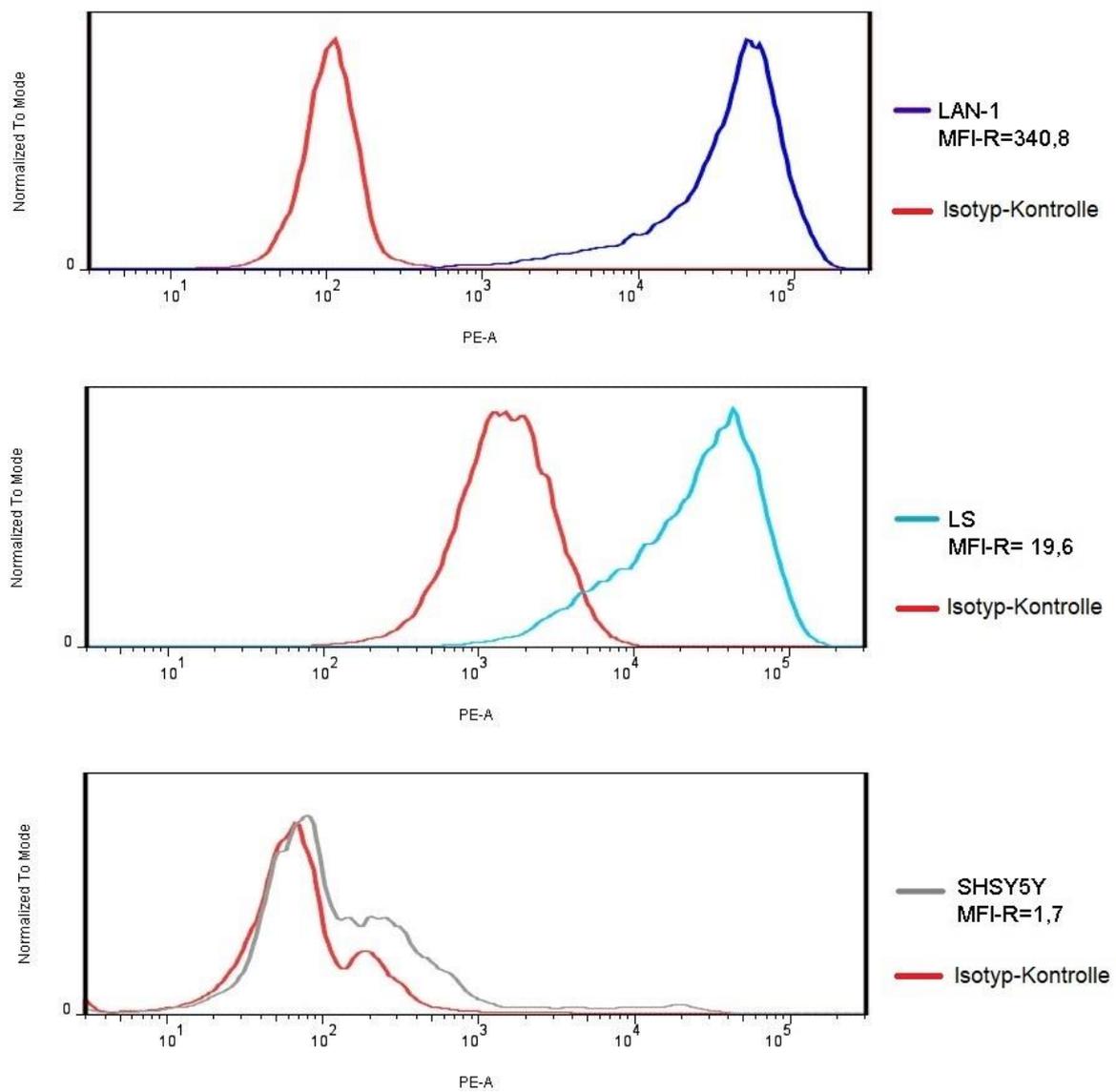


Abbildung 12: Overlay-Darstellung des Bindungsvermögens von Anti-GD2 Antikörpern bei NB-Zelllinien im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle.

Diese ergab einen Wert von 340,8 bei der Zelllinie LAN-1, 19,6 bei der Zelllinie LS sowie 1,7 bei der der Zelllinie SHSY5Y.

3.2 Titration der bispezifischen Antikörper

Für eine optimale Konzentration der bispezifischen Antikörper wurden diese zunächst titriert. Zu diesem Zweck erfolgte die Messung in den zwei Konzentrationen 50 ng/ml und 5 ng/ml mit PBMCs eines Spenders gegen Tumorzellen der NB-Zelllinie LS. Anschließend wurde deren Wirkung analysiert und anhand der Tumorviabilität verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

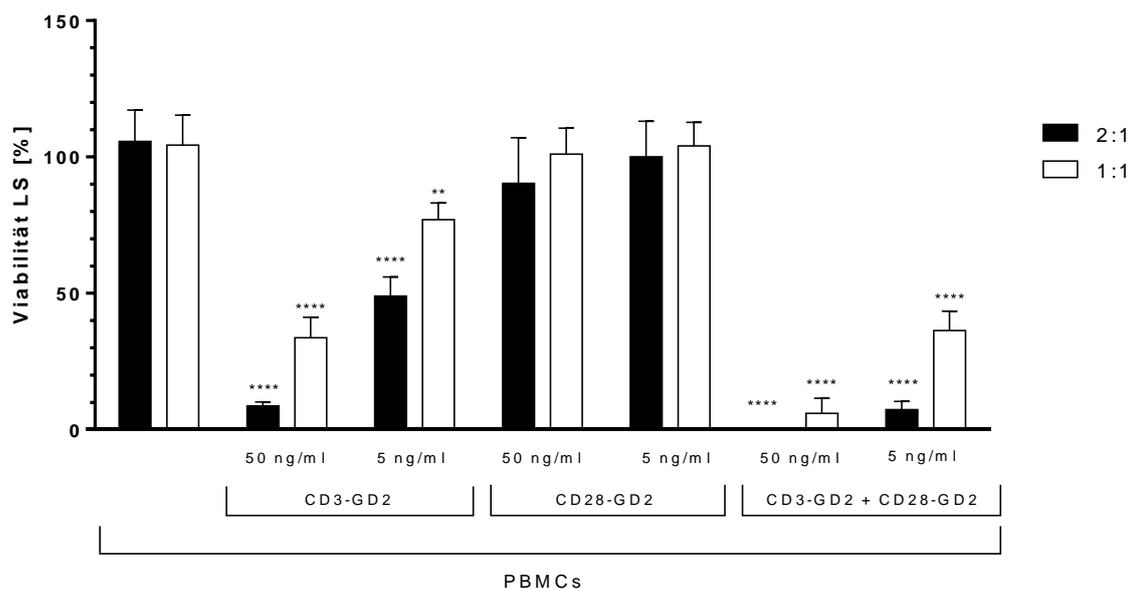


Abbildung 13: Viabilität der NB-Zelllinie LS in Abhängigkeit von bispezifischen Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen

Die Tumorzellen wurden mit PBMCs der E/T-Ratios 2:1 und 1:1 und den angegebenen bispezifischen Antikörpern in den Konzentrationen 50 ng/ml und 5 ng/ml inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte die lumenometrische Bestimmung der Tumorviabilität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit je einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Dunnett post-hoc Tests. Als Kontrolle diente die Behandlung mit PBMCs, signifikante Unterschiede sind im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle angegeben. ** p<0.01, ****, p<0.0001.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, sowohl für die E/T-Ratio 2:1 ($F(6, 14) = 71.98, p \leq 0.0001$) als auch 1:1 ($F(6, 14) = 73.97, p \leq 0.0001$). Sowohl die Konzentration von 50 ng/ml, als auch 5 ng/ml führten bei den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 zu signifikant niedrigeren Tumorviabilitäten als bei der Kontrolle mit PBMCs. Beim Antikörper CD28-GD2 war unabhängig von der Konzentration keine signifikant niedrigere Tumorviabilität im Vergleich zu PBMCs zu verzeichnen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Anwendungskonzentration

der bispezifischen Antikörper auf 5 ng/ml festgelegt, da auch bei dieser Konzentration eine ausreichende Reduktion der Tumorviabilität zu erzielen war.

3.3 Aktivierung der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien

Für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung durch die ausgewählten Therapieansätze ist primär eine adäquate Aktivierung der genutzten Effektorzellen notwendig. Um diese zu untersuchen, wurde eine Messmethode mit Hilfe von Fluoreszenzantikörpern und der Analyse am FACS-Gerät gewählt. Es wurden die Aktivierungsmarker CD25, CD69 sowie die doppelte Positivität (CD25⁺/CD69⁺) untersucht. Die statistische Analyse erfolgte für alle genannten und nun folgenden Aktivierungsmarker nur für die CD3⁺ T-Zellpopulation.

Zu Beginn wurde in einem Pilotexperiment der optimale Messzeitpunkt für die Aktivierungsparameter evaluiert.

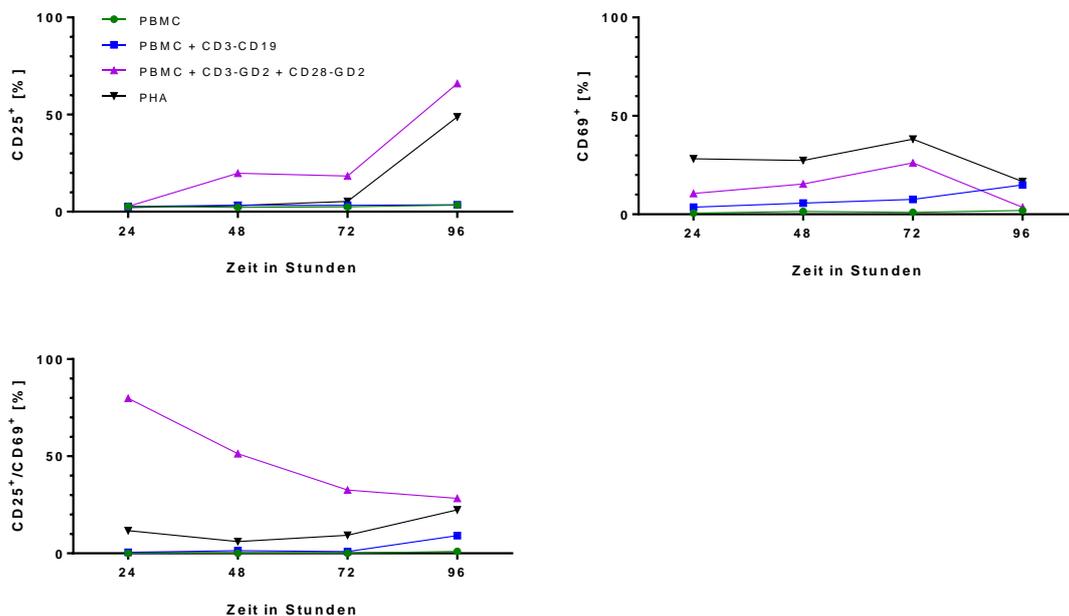


Abbildung 14: Pilotexperiment zur Untersuchung der zeitlichen Expression von CD25⁺, CD69⁺ und CD25⁺/CD69⁺ bei unterschiedlichen Behandlungsansätzen im Zeitverlauf für die Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 mit PBMCs und verschiedenen, bispezifischen Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen maximal 96 Stunden lang inkubiert. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde der Überstand mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition.

Die Abbildung 14 zeigt, dass der Aktivierungsmarker CD25 zu späteren Zeitpunkten (72-96 Stunden) eine maximale Positivität aufweist, während die Expression von CD25/CD69 eher bei früheren Zeitpunkten (24-48 Stunden) ausgeprägt ist. CD69 ist dagegen nach einer Inkubation von 72 Stunden am stärksten exprimiert.

Um einen Mittelweg zu finden, wurde für die Messung der Aktivierungsmarker der Zeitpunkt nach 48 Stunden festgelegt.

3.3.1 Expression von CD25⁺

Zunächst erfolgte die Analyse der CD25⁺-Expression für die NB-Zelllinie LS, die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

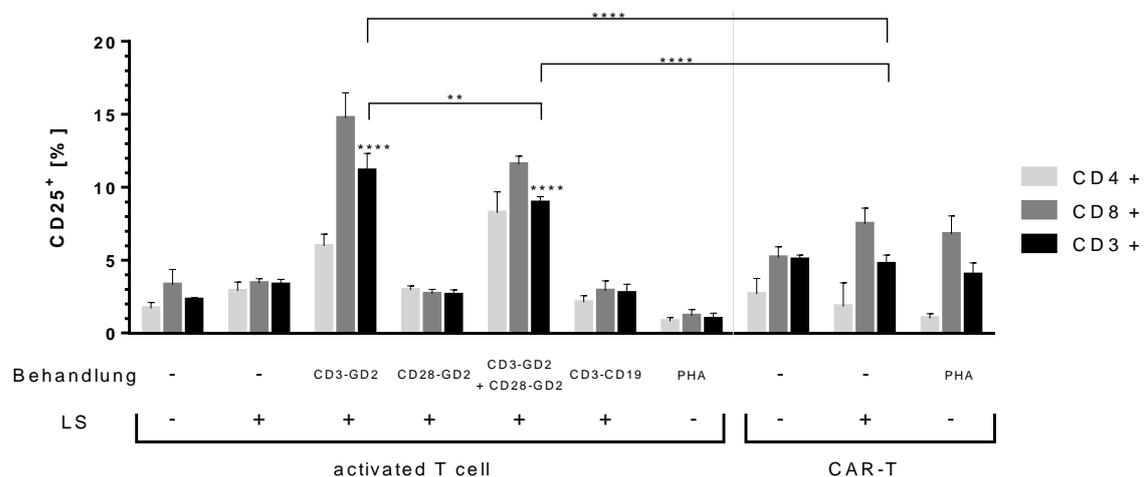


Abbildung 15: Expression von CD25⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, anschließend der Überstand mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3⁺ mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LS + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ** p≤0.01, **** p≤0.0001.

Die statistische Analyse der in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse weist signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der CD25⁺-Expression auf, $F(9, 20) = 84.19$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 signifikant stärker aktiviert als bei der Kontrolle

aTc + LS ($p \leq 0.0001$), während auf der rechten Seite bei den CAR-T Zellen kein Unterschied zur Kontrolle festgemacht werden konnte. Im direkten Vergleich vermochte die Behandlung mit CD3-GD2 eine signifikant stärkere Aktivierung der aTc hervorzurufen als die Behandlung durch CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p = 0.0028$). Beide Behandlungen führten zu einer signifikant stärkeren Aktivierung der Effektorzellen, als dies bei der Behandlung der Tumorzellen durch CAR-T der Fall war ($p \leq 0.0001$). Die Behandlung mit CD28-GD2 zeigte weder im Vergleich zur Kontrolle noch zu anderen Behandlungen eine signifikant stärkere Aktivierung. Es wurden hauptsächlich CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Für die NB-Zelllinie LAN-1 ergaben sich folgende, in Abbildung 16 dargestellte Ergebnisse.

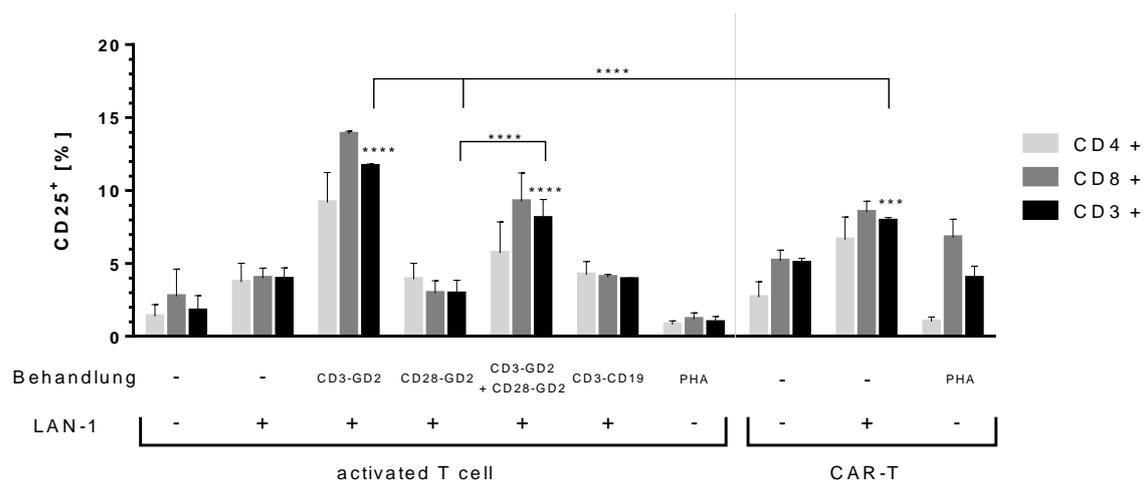


Abbildung 16: Expression von CD25⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, anschließend der Überstand mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LAN-1 + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. *** $p \leq 0.001$, ****, $p \leq 0,0001$.

In der statistischen Untersuchung zeigten sich signifikante Unterschiede der CD25⁺-Expression zwischen den Behandlungen, $F(9, 20) = 75.13$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 signifikant stärker aktiviert

als bei der Kontrolle aTc + LAN-1 ($p \leq 0.0001$), während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + LAN-1 zu einer signifikant stärkeren Aktivierung führt als bei der Kontrolle CAR-T ohne LAN-1 ($p = 0.0003$). Im direkten Vergleich zeigten sich die Effektorzellen zwischen den Konditionen CD3-GD2, CD28-GD2 und CAR-T signifikant unterschiedlich aktiviert, wobei CD3-GD2 zur stärksten Aktivierung und CD28-GD2 zur schwächsten führten. Die Kondition CD3-GD2 + CD28-GD2 aktivierte die aTc signifikant stärker als CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$), im Vergleich zur Behandlung mit CAR-T lag kein Unterschied vor und im Vergleich mit CD3-GD2 ergab sich eine signifikant schwächere CD25⁺-Expression ($p \leq 0.0001$). Es wurden hauptsächlich CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Abschließend sind in Abbildung 17 die Ergebnisse für die NB-Zelllinie SHSY5Y dargestellt.

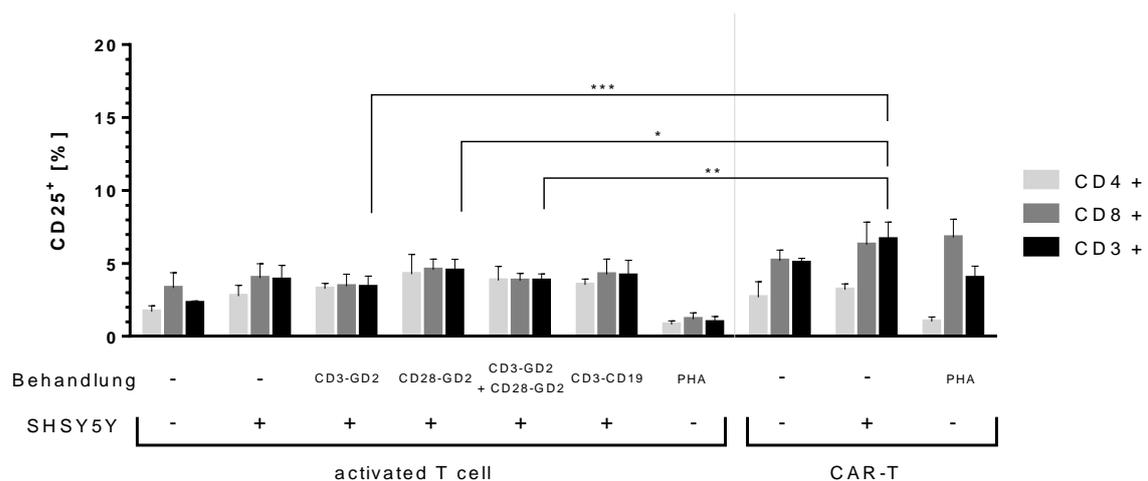


Abbildung 17: Expression von CD25⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie SHSY5Y und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, anschließend der Überstand mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition SHSY5Y + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der CD25⁺-Expression, $F(9, 20) = 11.90$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte keine Unterschiede zwischen Behandlungen und der jeweiligen Kontrolle, weder auf der linken Seite für die aTc

noch auf der rechten Seite für die CAR-T Zellen. Im direkten Vergleich führten die CAR-T Zellen nach Stimulation mit SHSY5Y zu einer höheren CD25⁺-Expression als die Konditionen CD3-GD2 ($p=0.0005$), CD28-GD2 ($p=0.034$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0026$).

3.3.2 Expression von CD69⁺

Zunächst erfolgte die Analyse der CD69⁺-Expression für die NB-Zelllinie LS, graphisch dargestellt in der Abbildung 18.

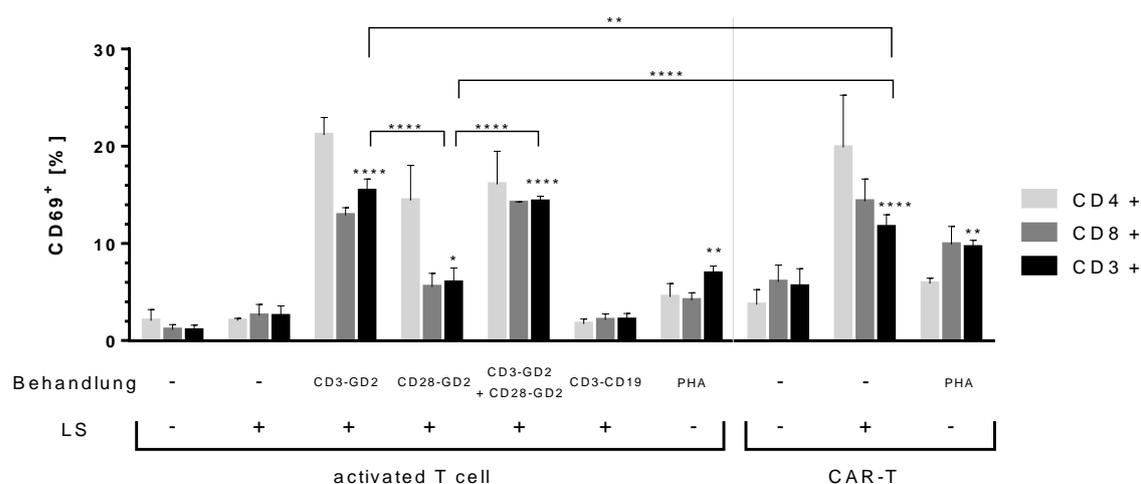


Abbildung 18: Expression von CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment ($n=1$) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LS + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

In der statistischen Untersuchung wurden signifikante Unterschiede der CD69⁺-Expression zwischen den Behandlungen berechnet, $F(9, 20) = 65.02$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p < 0.0001$), CD28-GD2 ($p = 0.0121$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) sowie PHA ($p = 0.0011$) signifikant mehr CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + LS; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + LS ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p = 0.0027$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LS. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen bei der Therapie sowohl mit CD3-GD2 als

auch mit CD3-GD2 + CD28-GD2 signifikant mehr CD69⁺ auf ihrer Zelloberfläche, als dies bei der Therapie mit CD28-GD2 allein der Fall war ($p < 0.0001$). Im Vergleich zur Behandlung mit CAR-T Zellen führte die Kondition CD3-GD2 zu signifikant mehr ($p = 0.0058$), die Kondition CD28-GD2 zu signifikant weniger ($p < 0.0001$) CD69⁺-Expression. Zwischen den Konditionen CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Es wurden hauptsächlich CD4⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2, CD28-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Für die NB-Zelllinie LAN-1 ergaben sich folgende, in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse.

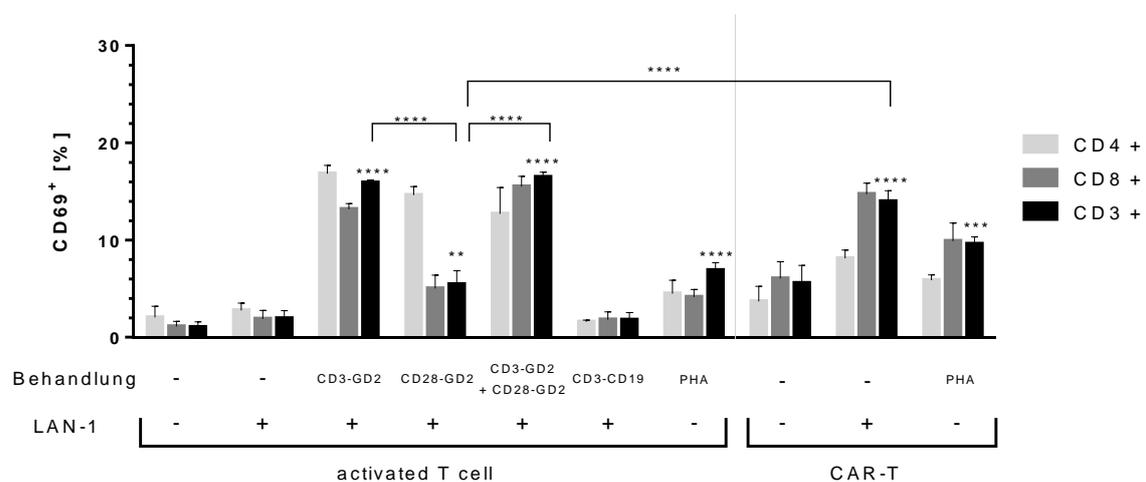


Abbildung 19: Expression von CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen)) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment ($n = 1$) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LAN-1 + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der CD69⁺-Expression, $F(9, 20) = 110.10$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p < 0.0001$), CD28-GD2 ($p = 0.0033$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) sowie PHA ($p < 0.0001$) signifikant mehr CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + LAN-1; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + LAN-1 ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA

($p=0.0007$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LAN-1. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen der Konditionen CD3-GD2 ($p<0.0001$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p<0.0001$) und CAR-T + LAN-1 ($p<0.0001$) signifikant mehr CD69⁺ auf ihrer Oberfläche, als dies durch die Kondition CD28-GD2 allein der Fall war. Zwischen den Konditionen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T bestanden keine signifikanten Unterschiede. Es wurden sowohl CD4⁺- und CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Abschließend sind in Abbildung 20 die Ergebnisse für die NB-Zelllinie SHSY5Y dargestellt.

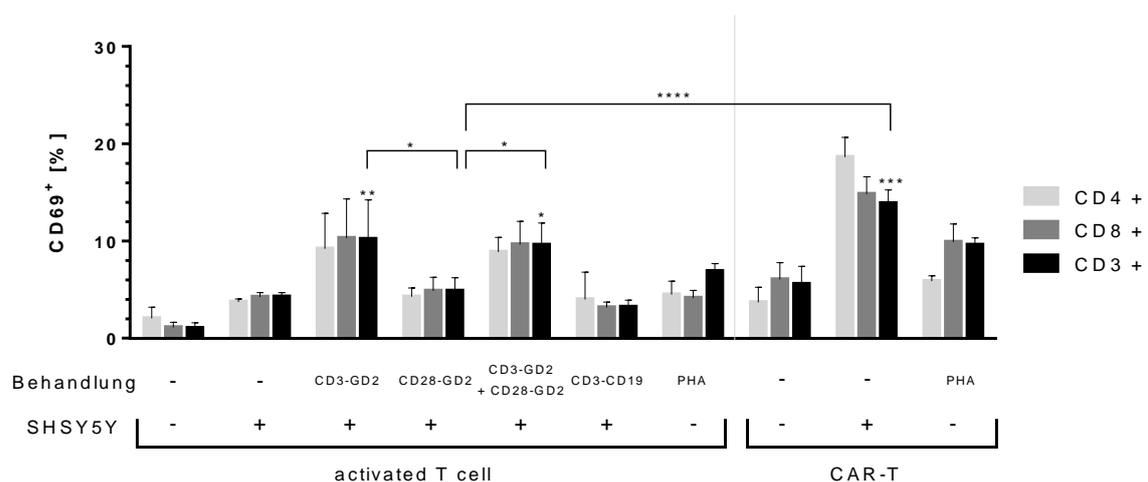


Abbildung 20: Expression von CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie SHSY5Y und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2,5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition SHSY5Y + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$, **** $p\leq 0.0001$.

In der statistischen Untersuchung wurden signifikante Unterschiede der CD69⁺-Expression zwischen den Behandlungen berechnet, $F(9, 20) = 14.74$, $p\leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p=0.0063$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0168$) signifikant mehr CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + SHSY5Y; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + SHSY5Y

($p=0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne SHSY5Y. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen der Konditionen CD3-GD2 ($p=0.0165$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0431$) und CAR-T + SHSY5Y ($p<0.0001$) signifikant mehr CD69⁺ auf ihrer Oberfläche, als dies durch die Kondition CD28-GD2 allein der Fall war. Zwischen den Konditionen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T bestanden keine signifikanten Unterschiede. Es wurden sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

3.3.3 Expression von CD25⁺/CD69⁺

Zunächst erfolgte die Analyse der CD25⁺/CD69⁺ -Expression für die NB-Zelllinie LS, die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

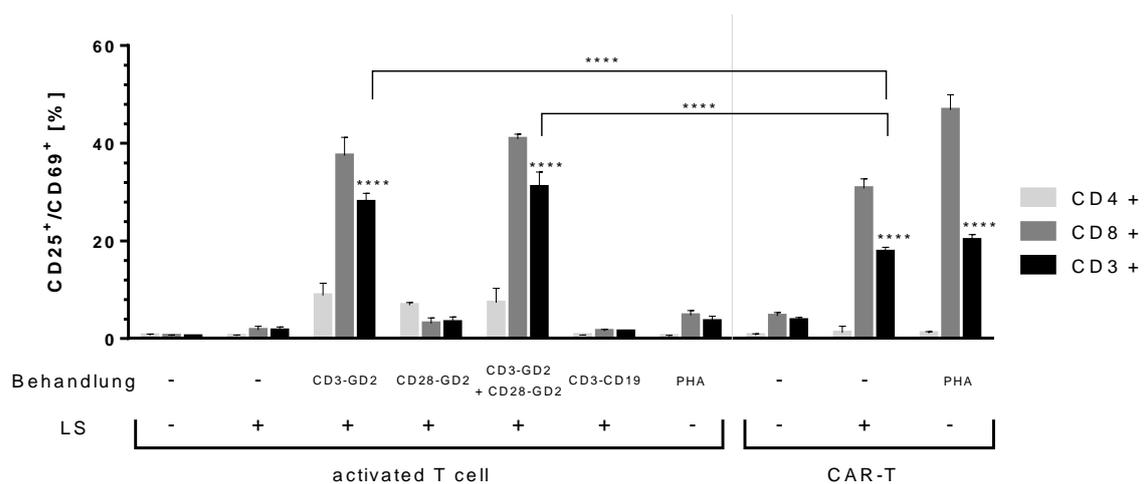


Abbildung 21: Expression von CD25⁺/CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LS + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ****, $p\leq 0.0001$.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der CD25⁺/CD69⁺-Expression, $F(9, 20) = 235.0$, $p\leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p<0.0001$) und

CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + LS; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + LS ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p < 0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LS. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen der Konditionen CD3-GD2 ($p < 0.0001$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ auf ihrer Oberfläche, als dies durch die Kondition CAR-T + LS der Fall war. Die Konditionen CD3-GD2 ($p < 0.0001$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) und CAR-T + LS ($p < 0.0001$) führten zu einer signifikant stärkeren CD25⁺/CD69⁺-Expression, als dies durch eine Behandlung mit CD28-GD2 allein der Fall war. Es wurden hauptsächlich CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Für die NB-Zelllinie LAN-1 ergaben sich folgende, in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse.

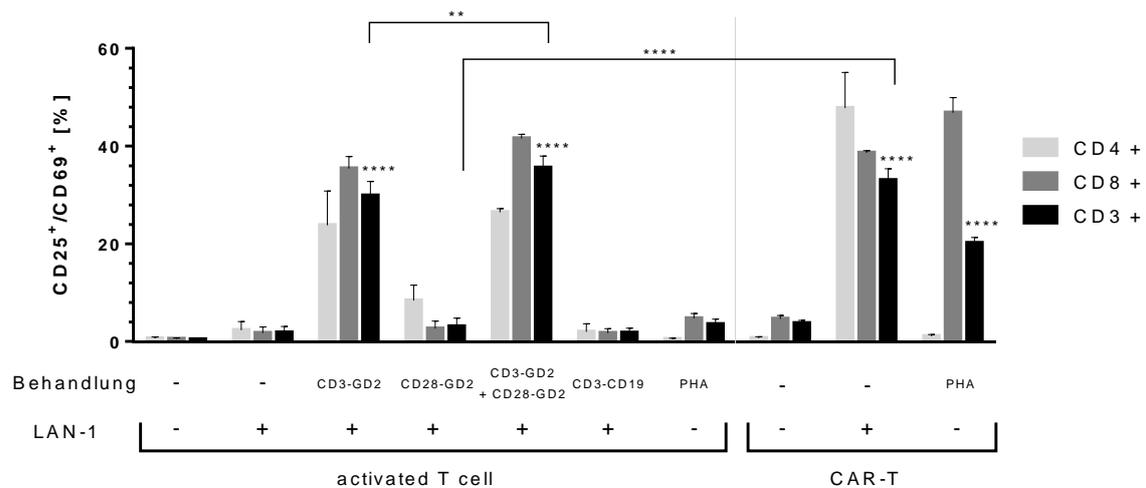


Abbildung 22: Expression von CD25⁺/CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LAN-1 + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ****, $p \leq 0,0001$.

In der statistischen Untersuchung wurden signifikante Unterschiede der CD25⁺/CD69⁺-Expression zwischen den Behandlungen berechnet, $F(9, 20) = 229.5$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen

auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p < 0.0001$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + LAN-1; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + LAN-1 ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p < 0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LAN-1. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen der Kondition CD3-GD2 + CD28-GD2 signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ auf ihrer Oberfläche als bei der Kondition CD3-GD2 ($p < 0.0001$). Die Konditionen CD3-GD2 ($p < 0.0001$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) und CAR-T + LAN-1 ($p < 0.0001$) führten zu einer signifikant stärkeren CD25⁺/CD69⁺-Expression, als dies durch eine Behandlung mit CD28-GD2 allein der Fall war. Sowohl zwischen CD3-GD2 und CAR-T + LAN-1, als auch zwischen CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T + LAN-1 konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CD25⁺/CD69⁺ Expression verzeichnet werden. Es wurden sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺- CAR-T Zellen und aTc durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

Abschließend sind in Abbildung 23 die Ergebnisse für die NB-Zelllinie SHSY5Y dargestellt.

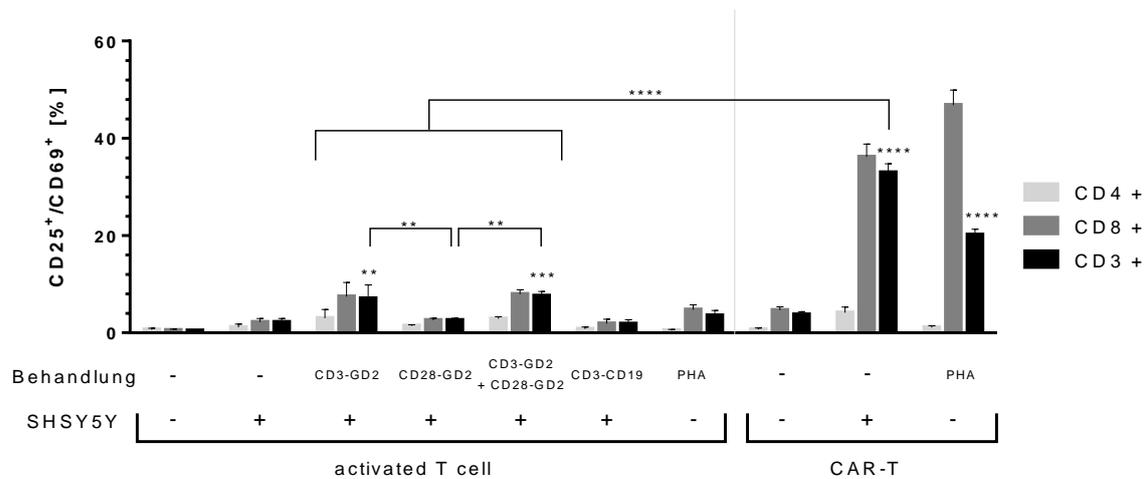


Abbildung 23: Expression von CD25⁺/CD69⁺ bei unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie SHSY5Y und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 48 Stunden lang inkubiert, der Überstand anschließend mit den entsprechenden Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition SHSY5Y + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ** p≤0.01, *** p≤0.001, **** p≤0.0001

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der CD25⁺/CD69⁺-Expression, $F(9, 20) = 200.1$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p=0.0018$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0005$) signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ exprimierten als bei der Kontrolle aTc + SHSY5Y; während auf der rechten Seite die Kondition CAR-T + SHSY5Y ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p < 0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Expression führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne SHSY5Y. Im direkten Vergleich exprimierten die Effektorzellen der Kondition CAR-T + SHSY5Y signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ auf ihrer Oberfläche, als dies bei den Konditionen CD3-GD2, CD28-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 der Fall war ($p < 0.0001$). Darüber hinaus wird durch eine Behandlung sowohl mit CD3-GD2 ($p=0.0048$) als auch CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0013$) signifikant mehr CD25⁺/CD69⁺ exprimiert als durch die Behandlung mit CD28-GD2 allein. Es wurden hauptsächlich CD8⁺-CAR-T Zellen aktiviert (hier nicht statistisch untersucht).

3.4 Zytokinausschüttung der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien

Im bisherigen Experiment konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sowohl die bispezifischen Antikörper als auch die CAR-T Zellen eine Aktivierung der Effektorzellen induzieren können. Um die Effektorfunktion jedoch voll ausführen zu können, ist eine Zytokinausschüttung essenziell. In den folgenden Untersuchungen sollte exemplarisch an den NB-Zelllinien LS und LAN-1 gezeigt werden, dass die Aktivierung zu einer Zytokinausschüttung von IFN- γ , IL-2 und TNF- α führt.

3.4.1 Stimulation mit LS

Zunächst wurde die NB-Zelllinie LS auf die Ausschüttung von IFN- γ untersucht, dargestellt in Abbildung 24:

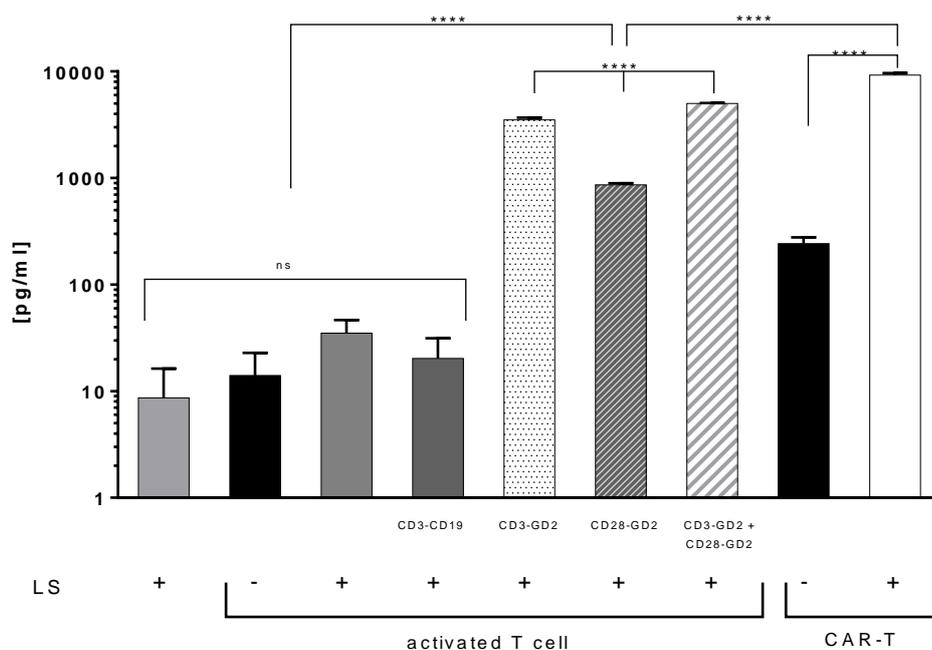


Abbildung 24: Ausschüttung von IFN- γ bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellem Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** $p \leq 0.0001$.

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede der Zytokinausschüttung von IFN- γ zwischen den Behandlungsgruppen, $F(8, 18) = 1402, p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test zeigte eine signifikant höhere Ausschüttung bei Inkubation der aTc mit LS und den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 und den Antikörpern im Mix im Vergleich zu aTc allein, LS allein, aTc und LS zusammen oder aTc mit LS und CD3-CD19 ($p \leq 0.0001$). CAR-T Zellen schütteten nachweislich mehr IFN- γ aus, wenn sie durch LS stimuliert wurden, als ohne Stimulation ($p \leq 0.001$). Im direkten Vergleich konnte bei den CAR-T Zellen zusammen mit LS eine deutlich höhere IFN- γ -Konzentration nachgewiesen werden als bei den aTc mit LS durch jeden der bispezifischen Antikörper (CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CD3-CD19) ($p \leq 0.0001$).

Es folgte die Bestimmung von IL-2 nach Stimulation mit LS, dargestellt in Abbildung 25:

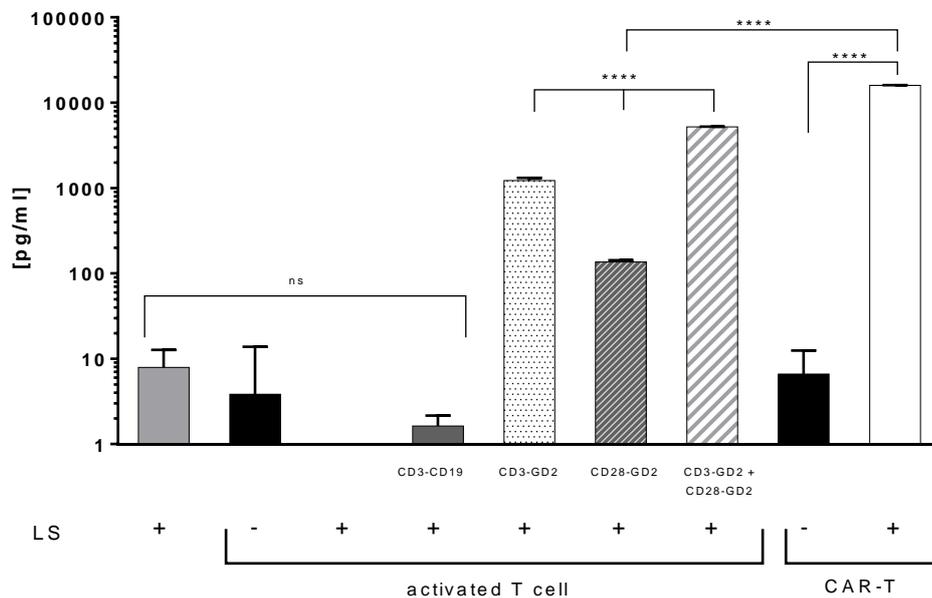


Abbildung 25: Ausschüttung von IL-2 bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. ****, $p \leq 0.0001$.

Die Ausschüttung von IL-2 unterschied sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse signifikant zwischen den Behandlungsgruppen, $F(8, 18) = 53045$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test zeigte eine höhere Ausschüttung von IL-2 bei Inkubation der aTc mit LS und CD3-GD2 sowie den Antikörpern CD3-GD2 + CD28-GD2 im Vergleich zu nur LS, nur aTc, aTc zusammen mit LS sowie der Kombination aus aTc, LS und CD3-CD19 und der Kombination aTc, LS und CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$). Darüber hinaus schütteten die CAR-T- Zellen signifikant mehr IL-2 aus, nachdem sie mit LS stimuliert worden sind als ohne Stimulation durch Tumorzellen ($p \leq 0.0001$). Im direkten Vergleich konnte bei den CAR-T Zellen eine deutlich höhere IL-2-Konzentration als bei den aTc mit LS durch jeden der bispezifischen Antikörper (CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CD3-CD19) ($p \leq 0.0001$).

Zuletzt wurde die Ausschüttung von TNF- α untersucht, dargestellt in Abbildung 26.

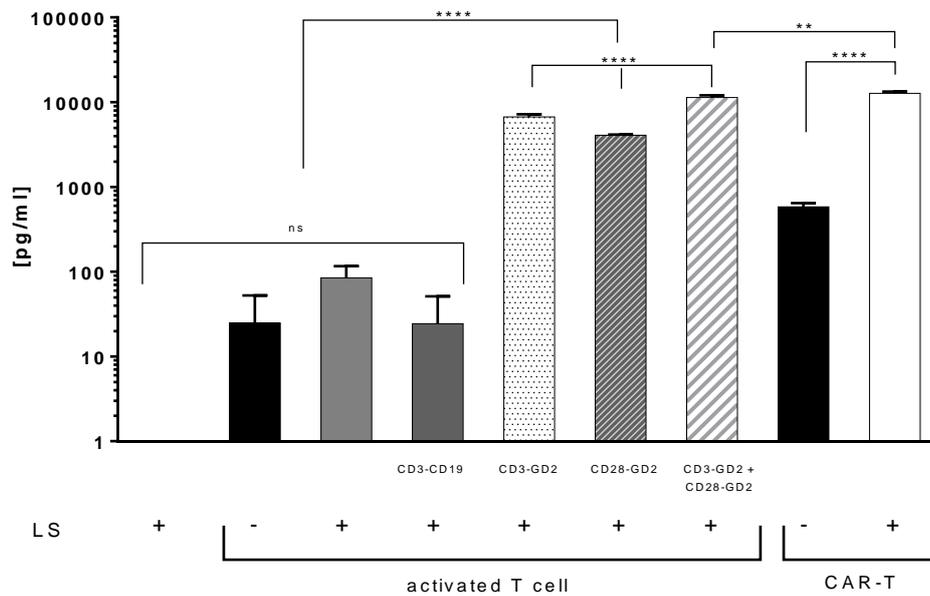


Abbildung 26: Ausschüttung von TNF- α bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellem Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. ** p<0.01, **** p<0.0001.

In der einfaktoriellem Varianzanalyse konnten in Bezug auf das Zytokin TNF- α ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden, $F(8, 18) = 669.0$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test zeigte eine höhere Ausschüttung von TNF- α bei Inkubation der aTc mit LS und CD3-GD2, CD28-GD2 oder CD3-GD2 + CD28-GD2 im Vergleich zu nur LS, nur aTc, aTc zusammen mit LS sowie der Kombination aTc, LS und CD3-CD19 ($p \leq 0.0001$). Von den CAR-T Zellen wurde deutlich mehr TNF- α ausgeschüttet, wenn sie mit LS stimuliert worden sind im Gegensatz zu fehlender Stimulation ($p \leq 0.0001$). Im direkten Vergleich konnte bei der Inkubation von CAR-T Zellen mit LS eine signifikant höhere Zytokinkonzentration gemessen werden als mit aTc, LS und CD3-GD2 oder CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$); die Konzentration war ebenfalls höher als bei der Inkubation von aTc, LS und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p = 0.003$).

3.4.2 Stimulation mit LAN-1

Im zweiten Teil wurde die Zelllinie LAN-1 auf die Induktion einer Zytokinausschüttung, angefangen bei IFN- γ , untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

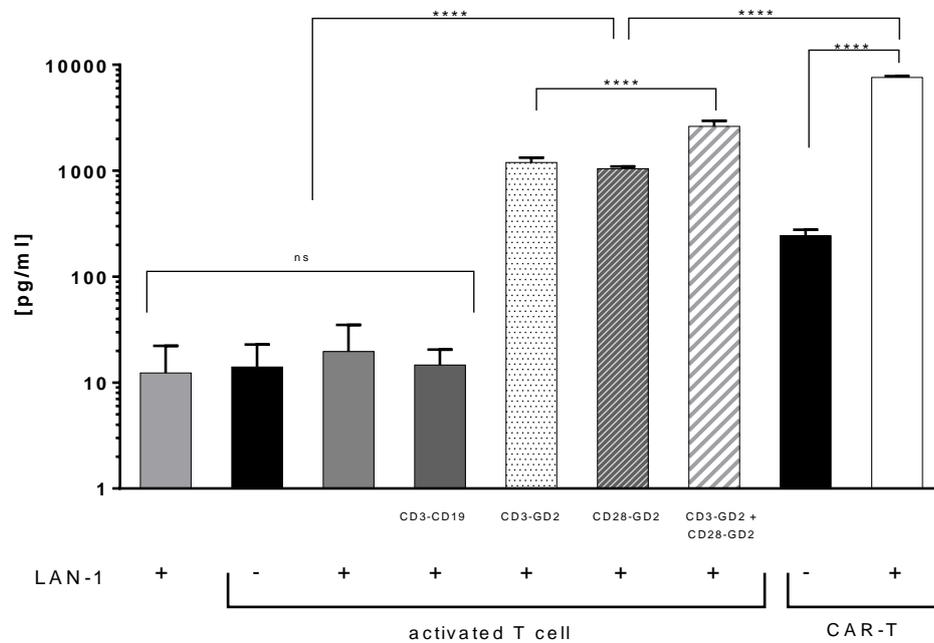


Abbildung 27: Ausschüttung von IFN- γ bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. ****, $p \leq 0.0001$.

Die statistische Testung mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, bezogen auf die Ausschüttung von IFN- γ , $F(8, 18) = 878.6$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test zeigte dabei eine höhere Ausschüttung von IFN- γ bei der Inkubation von aTc mit LAN-1 und den Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 im Vergleich zu nur LAN-1, nur aTc, aTc zusammen mit LAN-1 und aTc mit LAN-1 und CD3-CD19 ($p \leq 0,0001$). Zwischen den Behandlungsgruppen CD3-GD2 und CD28-GD2 gab es keinen signifikanten Unterschied, beide Behandlungen führten aber zu signifikant weniger IFN- γ Ausschüttung als die Behandlung durch CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p \leq 0,0001$). Die CAR-T Zellen schütteten signifikant mehr Zytokine aus, wenn sie mit LAN-1-Zellen inkubiert worden sind, als ohne Stimulation

($p \leq 0,0001$). Im direkten Vergleich führten die CAR-T Zellen zu einer höheren IFN- γ -Ausschüttung nach Stimulation mit LAN-1 als es bei den aTc zusammen mit LAN-1 und den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 der Fall war ($p \leq 0,0001$).

Die Untersuchung der IL-2-Ausschüttung nach Stimulation mit der NB-Zelllinie LAN-1 ergab folgende, in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse.

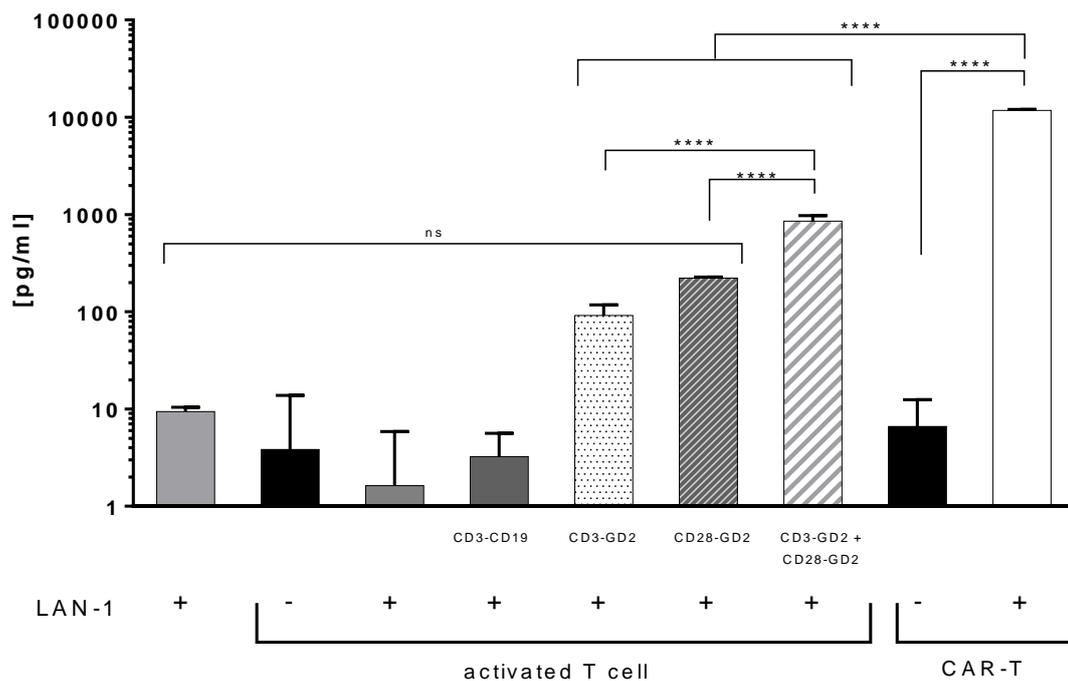


Abbildung 28: Ausschüttung von IL-2 bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment ($n=1$) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** $p \leq 0,0001$, ns= nicht signifikant

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, $F(8, 18) = 5639$, $p \leq 0,0001$. Der Tukey post-hoc Test legte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nur LAN-1, nur aTc, aTc und LAN-1, aTc mit LAN-1 und CD3-CD19 sowie aTc mit LAN-1 und CD3-GD2 oder CD28-GD2 dar. Die Inkubation von aTc mit LAN-1 und CD3-GD2 + CD28-GD2 zeigte eine signifikant erhöhte Zytokinausschüttung im Vergleich mit den zuerst genannten Behandlungsgruppen. CAR-T Zellen schütteten nachweislich mehr IL-2 aus, wenn sie durch LAN-1 stimuliert wurden, als ohne Stimulation ($p \leq 0,0001$); die nachgewiesene Konzentration war ebenfalls höher als

die der Tumorzellen allein und der aTc mit LAN-1 und CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 sowie bei der Behandlung mit CD3-CD19 ($p \leq 0.0001$).

Zuletzt erfolgte die Untersuchung der Ausschüttung von TNF- α durch die Effektorzellen bei Stimulation durch LAN-1. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

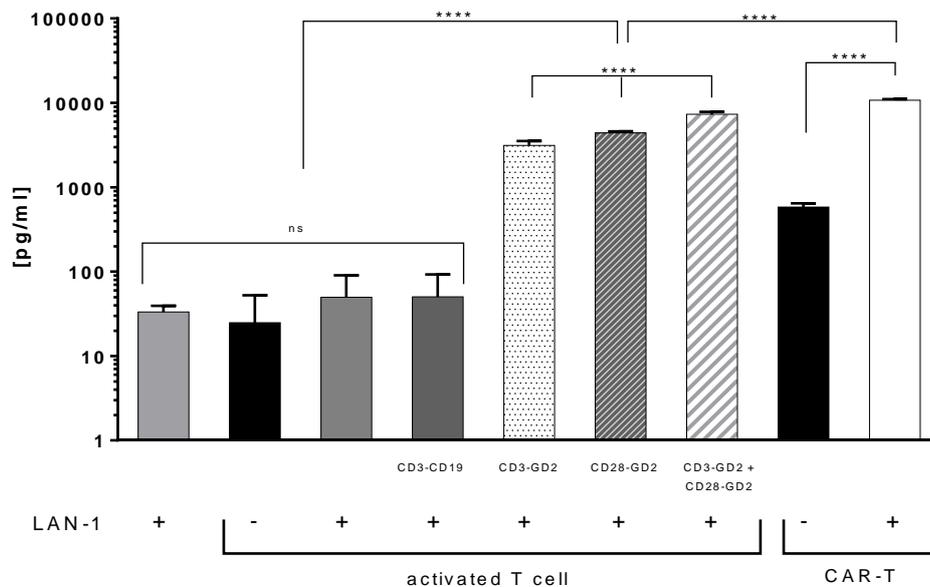


Abbildung 29: Ausschüttung von TNF- α bei unterschiedlichen Konditionen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für unterschiedliche Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen und/oder verschiedene bispezifische Antikörpern (Konzentration jeweils 5ng/ml), E/T-Ratio jeweils 1:1. Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 16 Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment ($n=1$) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** $p \leq 0.0001$, ns= nicht signifikant

Die statistische Testung mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede der TNF- α -Ausschüttung zwischen den Behandlungsgruppen, $F(8, 18) = 753.0$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test zeigte eine signifikant höhere Ausschüttung bei Inkubation von aTc mit LAN-1 und den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 im Vergleich zu aTc allein, LAN-1 allein, aTc und LAN-1 zusammen oder aTc mit LAN-1 und CD3-CD19 ($p \leq 0.0001$). Zwischen den Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 zeigte die Behandlung durch die zuletzt genannte Kondition (mAK im Mix) eine signifikant höhere Ausschüttung als die Behandlung durch die Antikörper einzeln ($p \leq 0.0001$). Die CAR-T Zellen schütteten signifikant mehr TNF- α aus, wenn sie mit LAN-1 stimuliert worden sind, als ohne

Stimulation ($p \leq 0.0001$). Im direkten Vergleich führten die CAR-T Zellen zu einer höheren TNF- α -Ausschüttung nach Stimulation mit LAN-1 als es durch die aTc zusammen den bispezifischen Antikörpern CD3-GD2, CD28-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 nach Stimulation mit LAN-1 der Fall war ($p \leq 0.0001$).

3.5 Proliferation der Effektorzellen nach Stimulation durch Antikörper und/oder NB-Zelllinien

Nach erfolgreicher Aktivierung der Effektorzellen und Ausschüttung von Zytokinen musste es zusätzlich zu einer ausreichenden Proliferation der Effektorzellen kommen, um eine adäquate und langanhaltende Tumorbekämpfung sicherstellen zu können. Die Untersuchung dieses Aspektes erfolgte im nächsten Schritt zunächst für die Zelllinie LS, dargestellt in Abbildung 30:

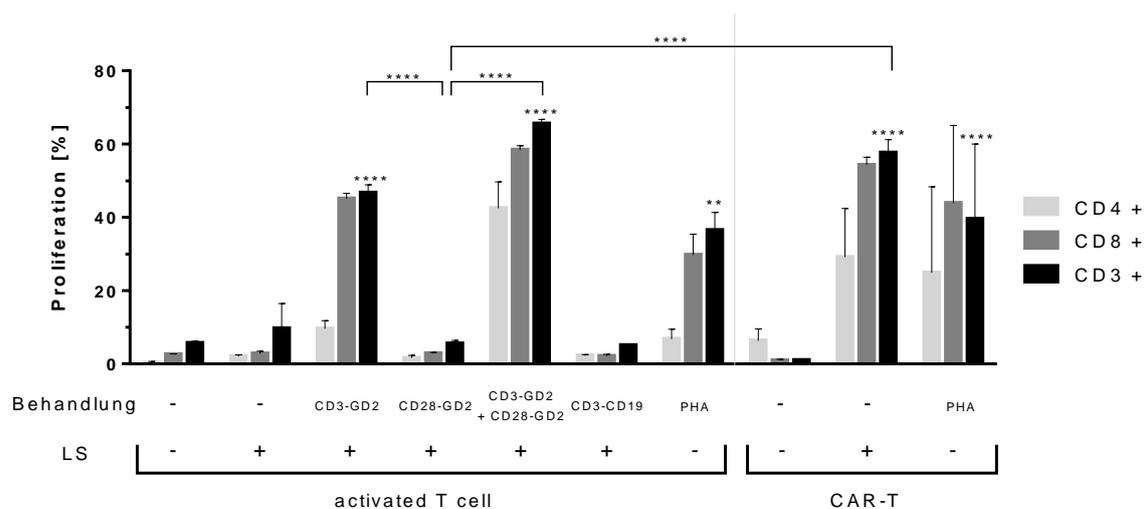


Abbildung 30: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LS

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LS und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Vor der Inkubation erfolgte die Färbung der Effektorzellen mit CellTrace™ Violet Dye. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 96 Stunden lang inkubiert und anschließend der Überstand durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellem Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LS + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ** p ≤ 0.01, **** p ≤ 0.0001.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der Proliferation, $F(9, 20) = 35.53$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p \leq 0.0001$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$) sowie PHA ($p = 0.0022$) signifikant stärker proliferiert sind als bei der Kontrolle aTc + LS; während auf der rechten Seite die Konditionen CAR-T + LS ($p \leq 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p \leq 0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Proliferation führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LS. Im direkten Vergleich proliferierten die Effektorzellen der Konditionen CD3-GD2 ($p \leq 0.0001$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) und CAR-T + LS ($p < 0.0001$)

signifikant stärker, als dies durch die Kondition CD28-GD2 der Fall war. Zwischen den Konditionen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T + LS konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Proliferationsneigung festgestellt werden.

Für die NB-Zelllinie LAN-1 ergaben sich folgende, in Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse:

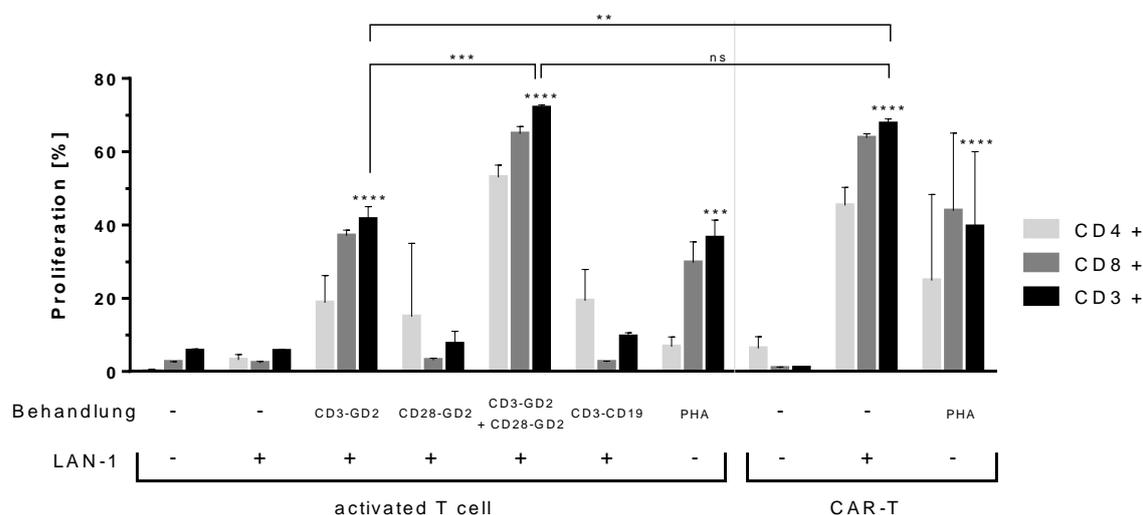


Abbildung 31: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie LAN-1

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Vor der Inkubation erfolgte die Färbung der Effektorzellen mit CellTrace™ Violet Dye. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 96 Stunden lang inkubiert und der Überstand anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment (n=1) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition LAN-1 + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. ** p≤0.01, *** p≤0.001, **** p<0.0001.

In der statistischen Untersuchung wurden signifikante Unterschiede der Proliferationsneigung zwischen den Behandlungen berechnet, $F(9, 20) = 45.10$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte, dass die Effektorzellen auf der linken Seite der Grafik durch die Therapien mit CD3-GD2 ($p < 0.0001$) und CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) sowie PHA ($p = 0.0003$) signifikant stärker proliferiert sind als bei der Kontrolle aTc + LAN-1; während auf der rechten Seite die Konditionen CAR-T + LS ($p < 0.0001$) und CAR-T + PHA ($p < 0.0001$) zu einer signifikant stärkeren Proliferation führten als bei der Kontrolle CAR-T ohne LAN-1. Im direkten Vergleich proliferierten die Effektorzellen der Konditionen CD3-GD2 ($p < 0.0001$), CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p < 0.0001$) und CAR-T + LS ($p < 0.0001$) signifikant stärker, als dies durch die Kondition CD28-GD2 der Fall war. Während zwischen den Konditionen CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T + LAN-1 kein

signifikanter Unterschied in Bezug auf die Proliferationsneigung berechnet werden konnte, führte sowohl die Tumorbehandlung mit CD3-GD2 + CD28-GD2 ($p=0.0003$) als auch mit CAR-T ($p=0.002$) zu signifikant mehr proliferierten Effektorzellen als die Behandlung mit CD3-GD2.

Abschließend sind die Ergebnisse für die NB-Zelllinie SHSY5Y in Abbildung 32 dargestellt:

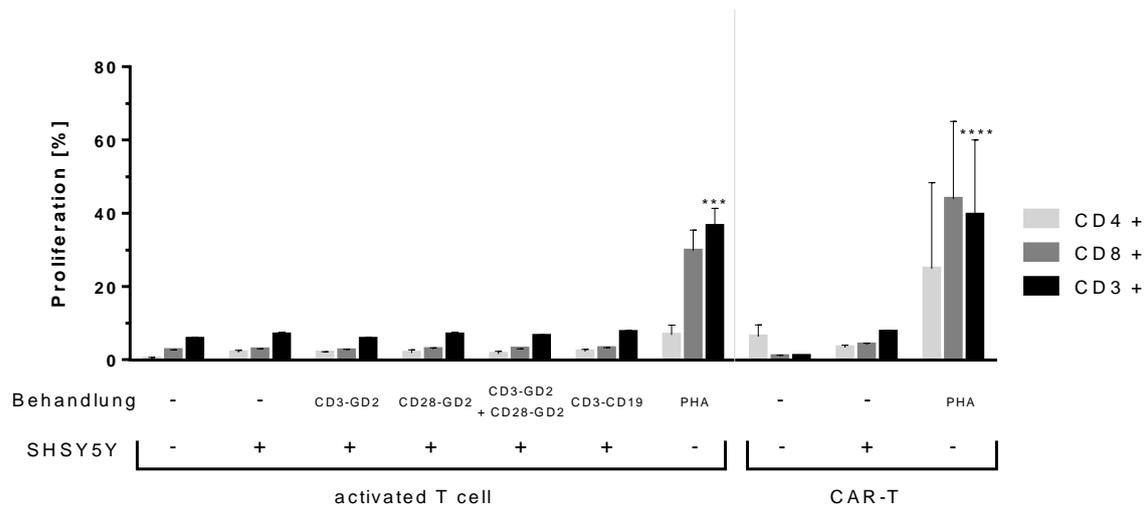


Abbildung 32: Proliferation der unterschiedlichen T-Zell-Populationen für die NB-Zelllinie SHSY5Y

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie SHSY5Y und/oder Effektorzellen (activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und/oder verschiedene bispezifische Antikörper (Konzentration jeweils 5ng/ml) sowie die Positivkontrolle mit 2.5 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin), E/T-Ratio jeweils 1:1. Vor der Inkubation erfolgte die Färbung der Effektorzellen mit CellTrace™ Violet Dye. Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Behandlungen 96 Stunden lang inkubiert und der Überstand anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment ($n=1$) mit einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung für die T-Zell-Population CD3 mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und den Ergebnissen des Sidak post-hoc Tests. Als Kontrolle diente für die activated T cells (linke Seite) die Kondition SHSY5Y + aTc, während die Kontrolle für CAR-T (rechte Seite) nur aus CAR-T bestand. *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Die statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in Bezug auf die Stärke der Proliferation, $F(9, 20) = 12.60$, $p \leq 0.0001$. Der Sidak post-hoc Test zeigte eine signifikant stärkere Proliferation der jeweiligen Effektorzellen durch PHA auf beiden Seiten der Grafik (aTc: $p=0.0022$, CAR-T: $p < 0.0001$). Zwischen den übrigen Konditionen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Proliferationsneigung verzeichnet werden.

3.6 Vergleich der lytischen Wirkung der Behandlungsansätze auf NB-Zelllinien

Nach erfolgter Aktivierung, Zytokinausschüttung und Proliferation der Effektorzellen musste abschließend das Lysevermögen und damit die Effektivität der Behandlungsansätze beurteilt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Assay unter Zuhilfenahme von Luciferin im Medium und mit einem Luciferase-Gen modifizierten Tumorzellen durchgeführt und die Tumorviabilität verglichen.

3.6.1 Viabilität der Tumorzellen nach 48 Stunden bei unterschiedlichen E/T-Ratios und Behandlungsansätzen

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Viabilität für alle getesteten E/T-Ratios und Behandlungsansätze nach 48 Stunden für jede der drei NB-Zelllinien, angefangen mit der Zelllinie LS, dargestellt in Abbildung 33:

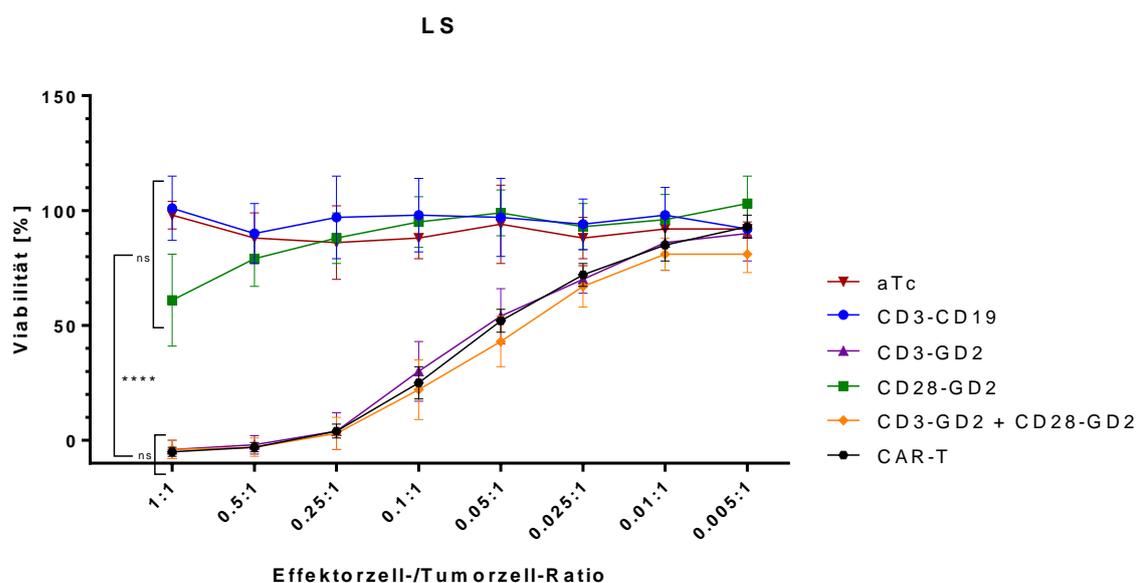


Abbildung 33: Viabilität der NB-Zelllinie LS nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LS und Effektorzellen (aTc= activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und verschiedene bispezifische Antikörper (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml). Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 48 Stunden lang inkubiert und die Viabilität anschließend luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Experimenten (n=4) mit je einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** p<0.0001, ns = nicht signifikant.

Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede der Tumorviabilitäten zwischen den Behandlungsansätzen, $F(5.000, 155) = 63.12$, $p < 0.0001$. Der Tukey

post-hoc Test zeigte keine Unterschiede zwischen den Behandlungen CAR-T, CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 auf; genauso konnte zwischen aTc, CD3-CD19 und CD28-GD2 kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Durch die Behandlung von sowohl CAR-T, CD3-GD2 als auch CD3-GD2 + CD28-GD2 wurde eine signifikant niedrigere Viabilität nachgewiesen als durch die Behandlung durch aTc, CD3-CD19 oder CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$).

Die Ergebnisse für die NB-Zelllinie LAN-1 sind in der folgenden Abbildung 34 zu sehen:

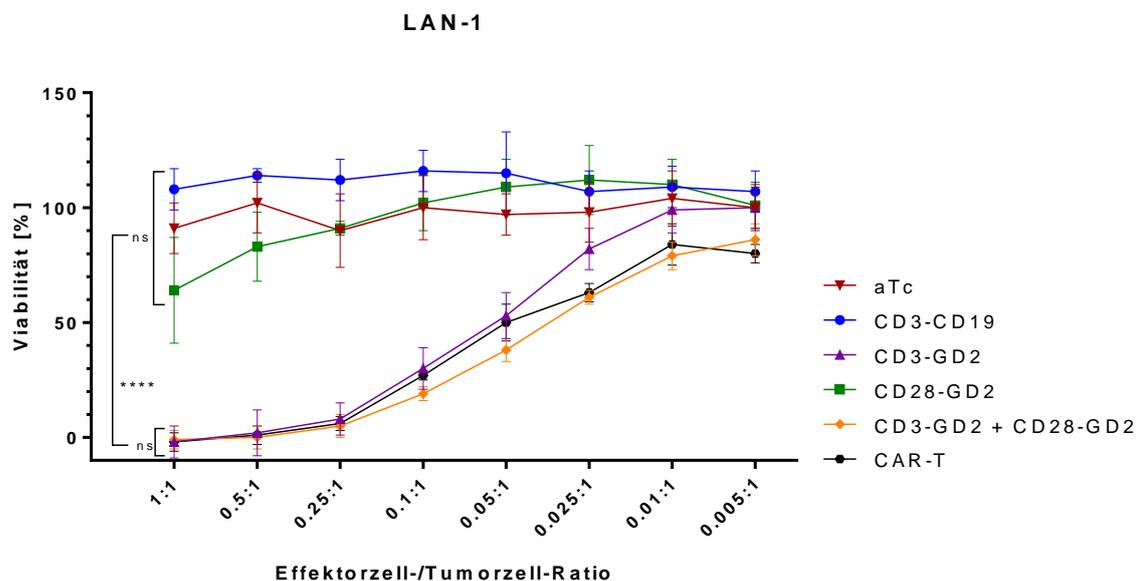


Abbildung 34: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie LAN-1 und Effektorzellen (aTc= activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und verschiedene bispezifische Antikörper (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml). Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 48 Stunden lang inkubiert und die Viabilität anschließend luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Experimenten ($n=4$) mit je einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. ****, $p \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

In der statistischen Untersuchung ergaben sich signifikante Unterschiede der Tumorviabilitäten der Zelllinie LAN-1 zwischen den Behandlungsansätzen, $F(5.000, 155) = 90.38$, $p \leq 0.0001$. Im Tukey post-hoc Test konnte dabei kein signifikanter Unterschied der Viabilität zwischen den Konditionen CAR-T, CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2 ausgemacht werden; ebenso wenig zwischen den Konditionen aTc, CD3-CD19 und CD28-GD2. Zwischen diesen zwei Gruppen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Behandlung durch CAR-T, CD3-GD2

sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 zu einer signifikant geringeren Tumorviabilität führt als die Behandlung durch aTc, CD3-CD19 oder CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$).

Im letzten Schritt wurde auch die Zelllinie SHSY5Y untersucht, dargestellt in Abbildung 35:

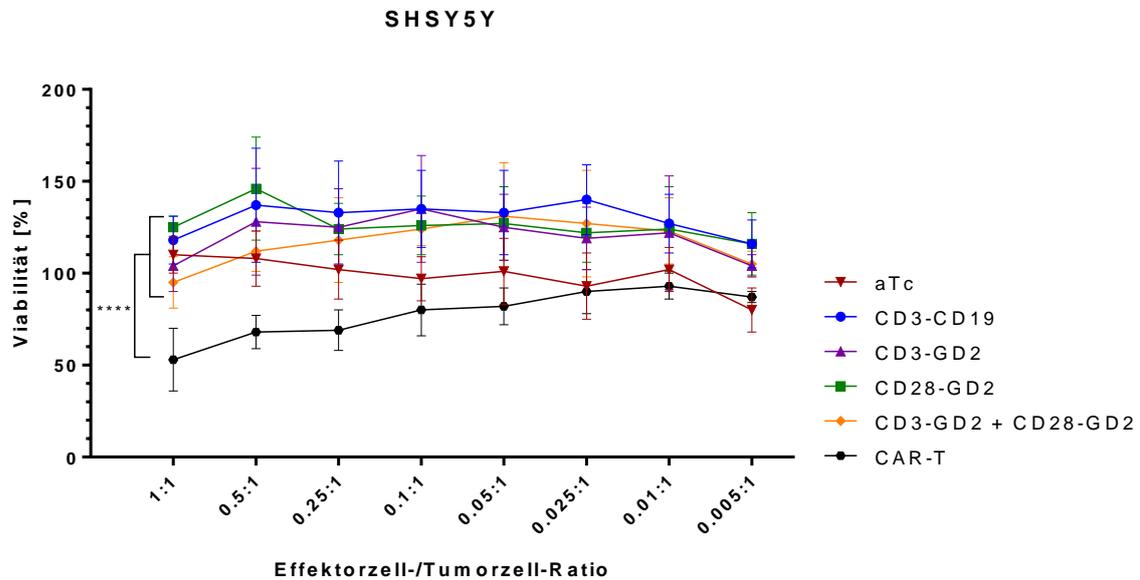


Abbildung 35: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y nach 48 Stunden in Abhängigkeit unterschiedlicher Behandlungsgruppen

Der Vergleich erfolgte für verschiedene Konditionen: NB-Zelllinie SHSY5Y und Effektorzellen (aTc= activated T cell oder CAR-T (chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und verschiedene bispezifische Antikörper (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml). Die Tumorzellen wurden mit den verschiedenen Konditionen 48 Stunden lang inkubiert und die Viabilität anschließend luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Experimenten ($n=4$) mit je einem technischen Triplet pro Kondition sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. ****, $p \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Die statistische Analyse der Viabilität der Tumorzellen der NB-Zelllinie SHSY5Y ergab signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsansätzen, $F(5.000, 155) = 53.69$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test wies eine signifikant niedrigere Viabilität der SHSY5Y-Tumorzellen bei Behandlung mit CAR-T im Vergleich zu allen anderen Behandlungsansätzen auf ($p \leq 0.0001$).

3.6.2 Tumorviabilität im Zeitverlauf: Vergleich unterschiedlicher E/T-Ratios je nach Behandlung

Um die Rolle der verschiedenen E/T-Ratios herauszuarbeiten, wurden bei festgelegter Behandlung die drei Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1 im Zeitverlauf statistisch miteinander verglichen.

3.6.2.1 LS

Zu Beginn erfolgte der Vergleich der E/T-Ratios je nach Behandlung für die Zelllinie LS wie in Abbildung 36 gezeigt:

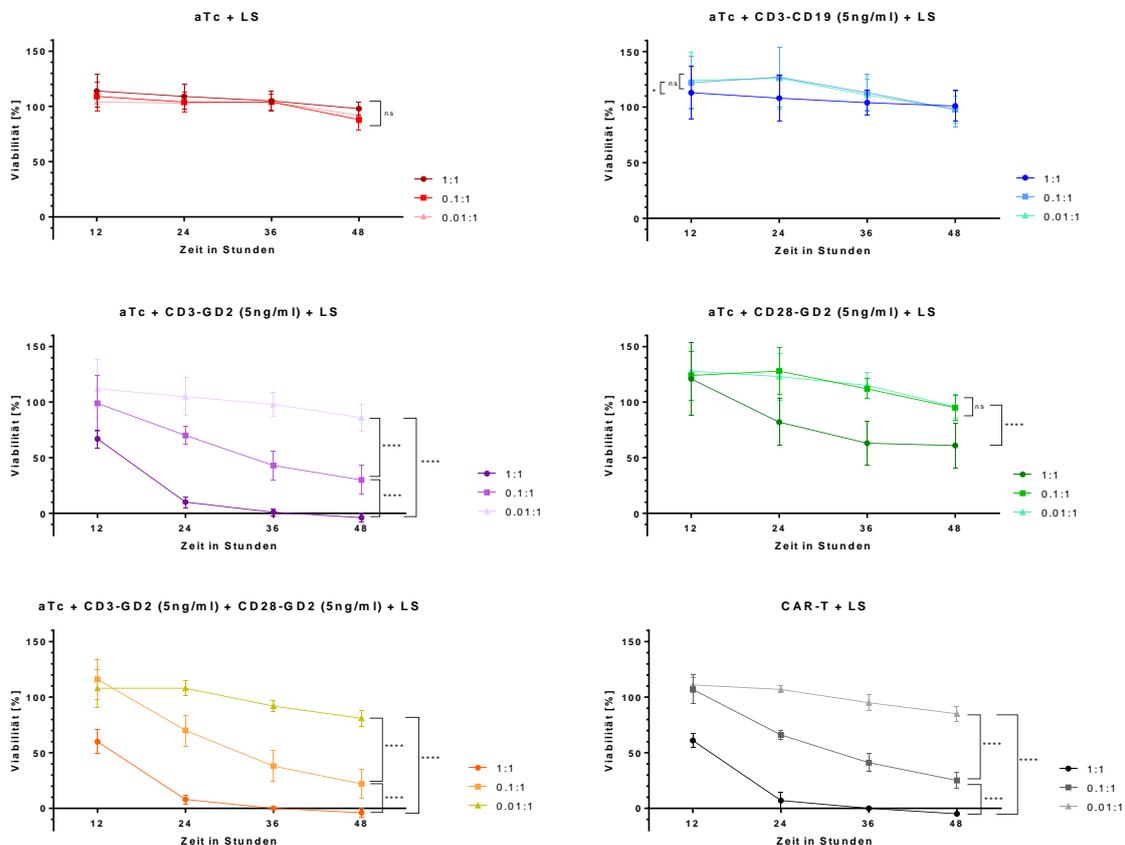


Abbildung 36: Viabilität der NB-Zelllinie LS im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen und Antikörpern inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** $p < 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Während bei der Behandlungsgruppe aTc + LS kein signifikanter Unterschied zwischen den E/T-Ratios in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung nachgewiesen werden konnte ($F(2.000, 30.00) = 2.118$, $p = 0.1379$), war dies jedoch bei allen anderen Behandlungen der Fall, wie in Tabelle 8 gezeigt. Vor allem bei den Behandlungen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 sowie CAR-T zeigten sich deutliche Unterschiede im Tukey post-hoc Test zwischen allen E/T-Ratios. Die E/T-Ratios 1:1 und 0.1:1 führten bei diesen Behandlungen zu einer nachweislich geringeren Viabilität der NB-Zellen LS als die E/T-Ratio 0.01:1.

Tabelle 8: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie LS

Behandlung	F (DFn, DFd)	Statistische Signifikanz
CD3-CD19	F (2.000, 30.00) = 4.553	p= 0.0188
CD3-GD2	F (2.000, 30.00) = 104.8	p≤0.0001
CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 30.84	p≤0.0001
CD3-GD2 + CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 89.58	p≤0.0001
CAR-T	F (2.000, 30.00) = 140.7	p≤0.0001

3.6.2.2 LAN-1

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse für die Zelllinie LAN-1 dargestellt:

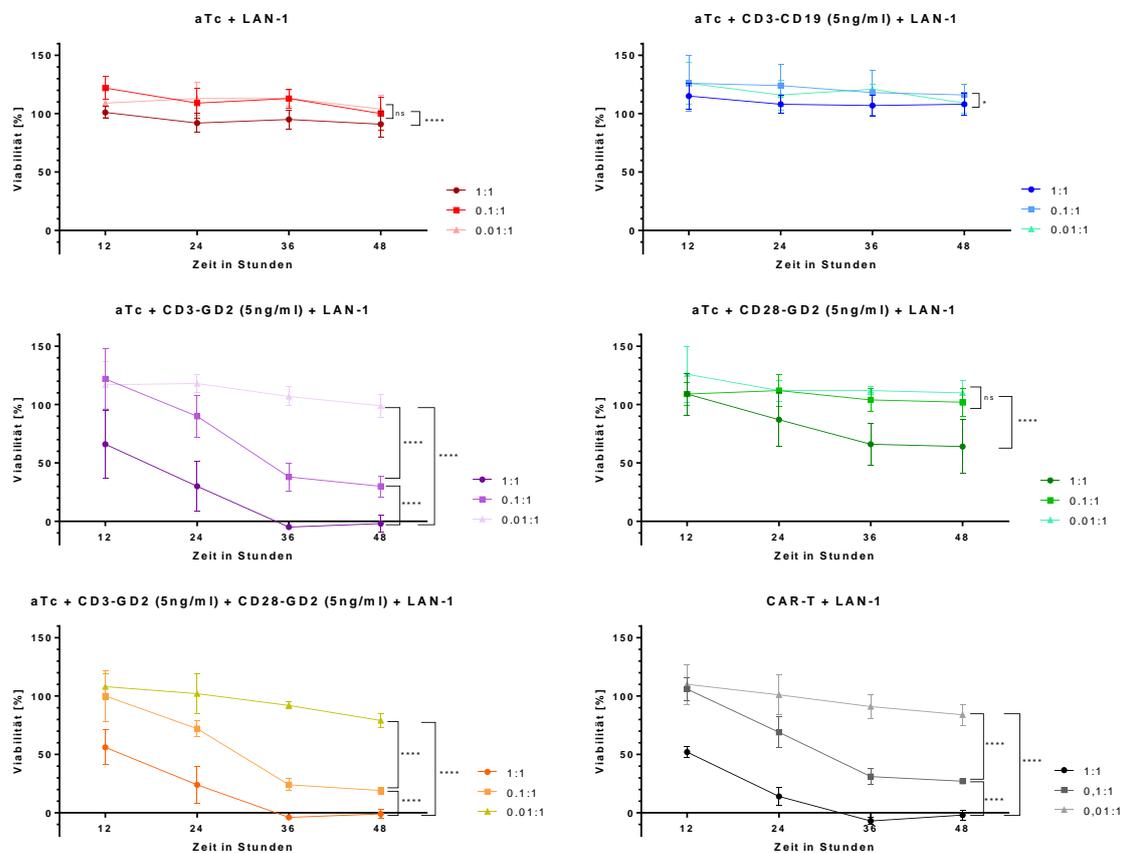


Abbildung 37: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen und Antikörpern inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden die Viabilität luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (N=4) sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. * p≤0.05, **** p≤0.0001, ns = nicht signifikant.

Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede in der Tumorviabilität zwischen den E/T-Ratios bei allen sechs Behandlungen (siehe Tabelle 9). Während die Unterschiede bei den Behandlungen aTc sowie aTc + CD3-CD19 schwach

signifikant waren und die Behandlung zu nahezu keiner Senkung der Viabilität unter 100% geführt hat, zeigte sowohl die statistische Analyse als auch die Darstellung bei den Behandlungen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten E/T-Ratios.

Tabelle 9: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie LAN-1.

Behandlung	F (DFn, DFd)	Statistische Signifikanz
aTc	F (2.000, 30.00) = 21.99	p<0.0001
CD3-CD19	F (2.000, 30.00) = 3.735	p=0.0356
CD3-GD2	F (2.000, 30.00) = 90.20	p<0.0001
CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 22.79	p<0.0001
CD3-GD2 + CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 117.1	p<0.0001
CAR-T	F (2.000, 30.00) = 128.7	p<0.0001

3.6.2.3 SHSY5Y

Zuletzt wurde die Untersuchung auch auf die Kontroll-Zelllinie SHSY5Y angewandt, dargestellt in Abbildung 38.

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte auch für diese Zelllinie signifikante Unterschiede der Viabilität zwischen den E/T-Ratios nahezu aller Behandlungen, ausschließlich aTc (siehe Tabelle 10). Allerdings konnten die Behandlungen, selbst in der höchsten E/T-Ratio von 1:1, keine Senkung der Viabilität unter 100% hervorrufen. Einzige Ausnahme bildet die Behandlung mit CAR-T in der E/T-Ratio von 1:1, welche zu allen gemessenen Zeitpunkten sowohl zu einer signifikant niedrigeren Viabilität als die E/T-Ratios 0.1:1 und 0.01:1 führte, als auch zu einer Lyse von 47 % (SD 17).

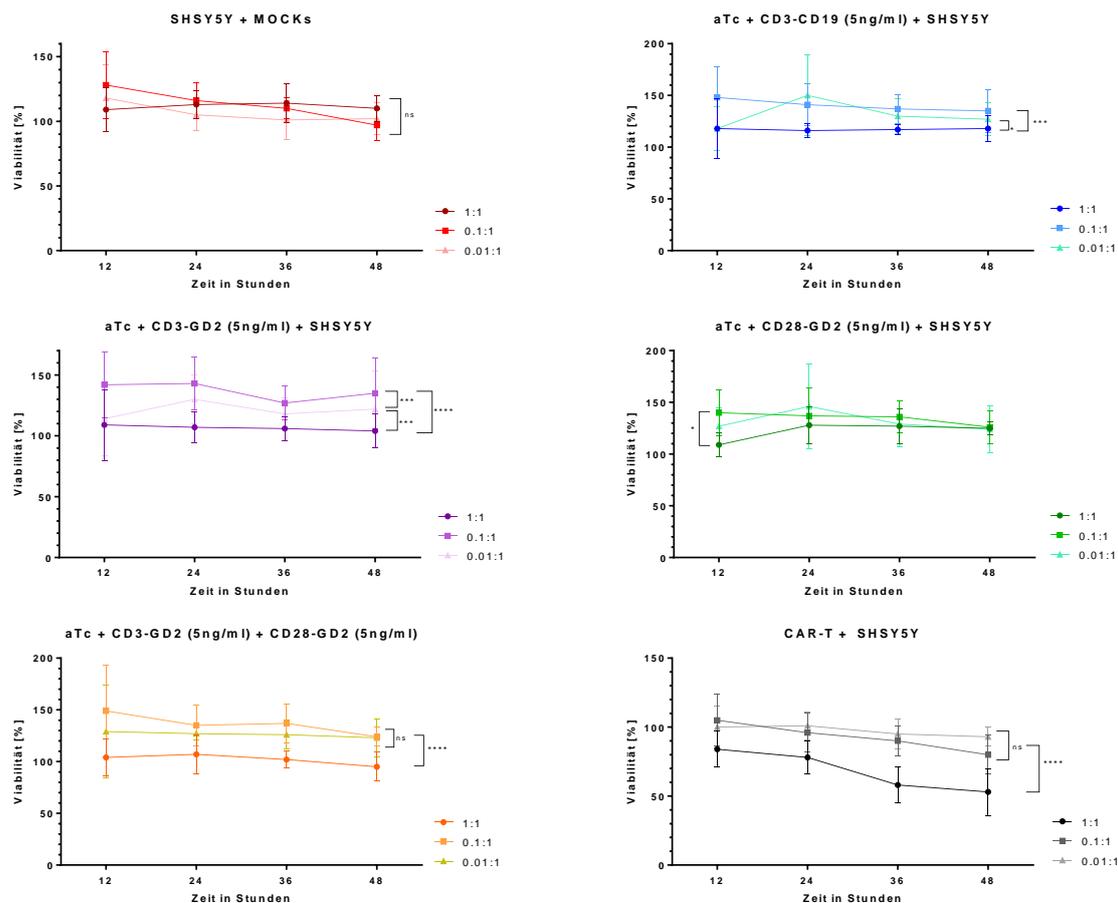


Abbildung 38: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y im Zeitverlauf nach unterschiedlicher Behandlung in Abhängigkeit, dargestellt für die drei E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1.

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen und Antikörpern inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden die Viabilität luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. * p<0.05, *** p<0.001, ****, p<0.0001, ns = nicht signifikant.

Tabelle 10: Auflistung der Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse für die NB-Zelllinie SHSY5Y.

Behandlung	F (DFn, DFd)	Statistische Signifikanz
aTc	F (2.000, 30.00) = 1.256	p=0.2994
CD3-CD19	F (2.000, 30.00) = 10.49	p=0.0004
CD3-GD2	F (2.000, 30.00) = 36.25	p<0.0001
CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 3.889	p=0.0315
CD3-GD2 + CD28-GD2	F (2.000, 30.00) = 30.25	p<0.0001
CAR-T	F (2.000, 30.00) = 43.40	p<0.0001

3.6.3 Tumorviabilität im Zeitverlauf: Vergleich unterschiedlicher Behandlungen je nach E/T-Ratio

Um die Rolle der Behandlungen in Abhängigkeit der E/T-Ratios herauszuarbeiten, wurden diese für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1 im Zeitverlauf statistisch miteinander verglichen.

3.6.3.1 LS

Zunächst sind die Behandlungen für die NB-Zelllinie LS in Abbildung 39 dargestellt:

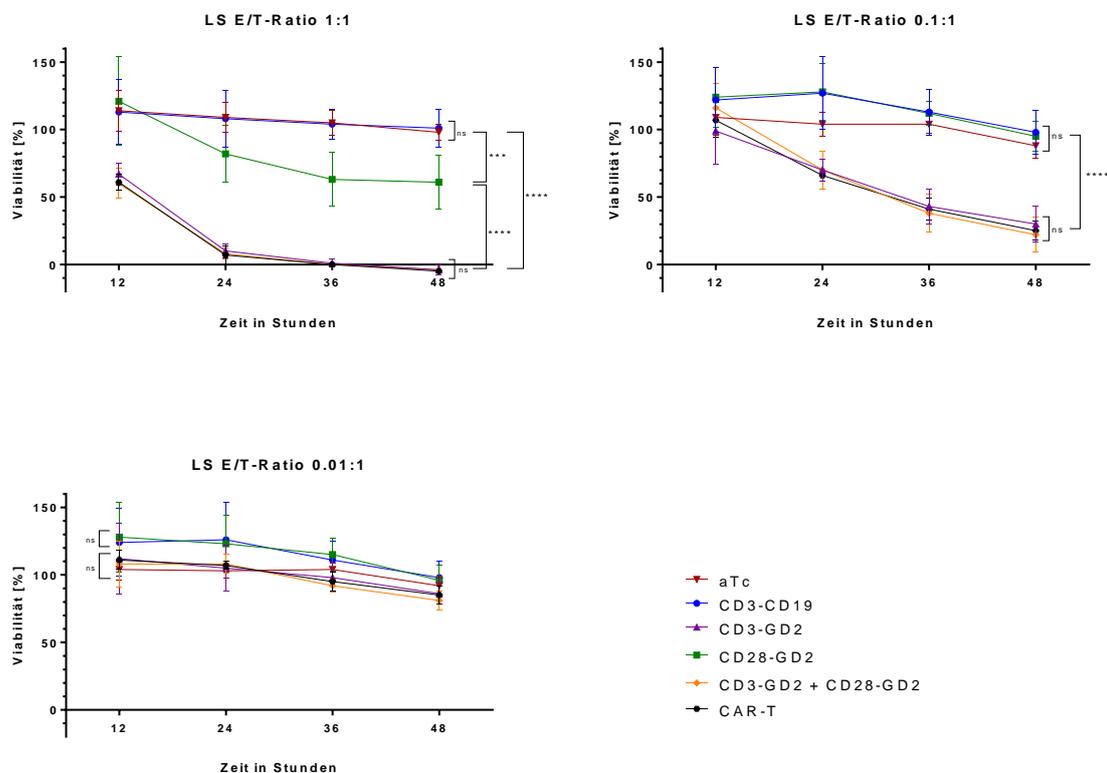


Abbildung 39: Viabilität der NB-Zelllinie LS im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen (aTc = aktivierte T-Zellen, CAR-T = chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und Antikörpern (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml) inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) eines technischen Triplets sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. *** $p \leq 0.001$, ****, $p \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Die statistische Untersuchung ergab für die E/T-Ratio signifikante Unterschiede der Tumorviabilität zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 132.3$, $p \leq 0.0001$. Im Tukey post-hoc Test zeigte sich weder zwischen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T, noch zwischen aTc und CD3-CD19 ein signifikanter Unterschied in der Tumorviabilität, jedoch konnte zwischen diesen zwei Gruppen

ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p \leq 0.0001$). Der bispezifische Antikörper CD28-GD2 führte ebenfalls zu einer niedrigeren Tumorviabilität als aTc und CD3-CD19 ($p = 0.0004$), seine Lysefähigkeit war signifikant schwächer als die von CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T ($p \leq 0.0001$).

Für die E/T-Ratio 0.1:1 konnte die statistische Analyse ebenfalls signifikante Unterschiede der Tumorviabilität zwischen den Behandlungen feststellen, $F(5.000, 75.00) = 45.25$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test ergab weder zwischen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T, noch zwischen aTc, CD3-CD19 und CD28-GD2 signifikant unterschiedliche Tumorviabilitäten, wohl aber konnte zwischen diesen zwei Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p \leq 0.0001$).

Die Testung der E/T-Ratio 0.01:1 ergab ebenfalls signifikanten Unterschied in Bezug auf die Tumorviabilität zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 10.14$, $p \leq 0.0001$. Im Tukey post-hoc Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Viabilität zwischen aTc, CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T, noch zwischen CD3-CD19 und CD28-GD2. Die Tumorviabilität zeigte sich zwar signifikant niedriger in der ersten Gruppe, jedoch waren beide Gruppen nicht in der Lage, eine Lyse und damit eine Viabilität unter 100% hervorzurufen.

3.6.3.2 LAN-1

Es folgte die Untersuchung für die Zelllinie LAN-1, dargestellt in Abbildung 40:

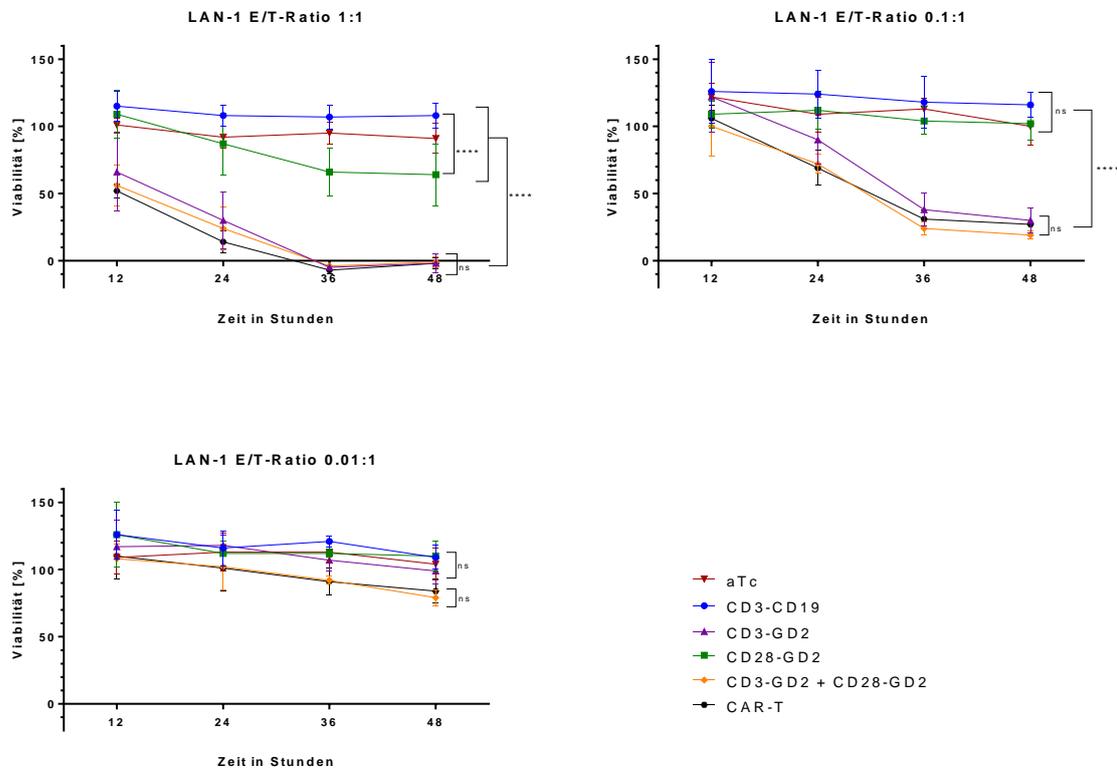


Abbildung 40: Viabilität der NB-Zelllinie LAN-1 im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen (aTc = aktivierte T-Zellen, CAR-T = chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und Antikörpern (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml) inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=4$) eines technischen Triplets sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. **** $p \leq 0.0001$, ns = nicht signifikant.

Die Testung ermittelte für die E/T-Ratio 1:1 signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 112.3$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test ergab, dass die Behandlung durch CD28-GD2 zu einer signifikant niedrigeren Tumorviabilität führte als die Behandlung durch CD3-CD19 ($p \leq 0.0001$). Zwischen den Behandlungen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T gab es keine signifikanten Unterschiede, alle drei Behandlungen führten jedoch zu signifikant niedrigeren Tumorviabilität als die Behandlungen aTc, CD3-CD19 und CD28-GD2 ($p \leq 0.0001$). Während CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T zu einer

vollständigen Lyse führten, vermochte CD28-GD2 eine Lyse von 36% hervorzurufen (Viabilität 64%, SD 23).

Die statistische Untersuchung für die E/T-Ratio 0.1:1 zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 31.61$, $p \leq 0.0001$. Während die Behandlungen aTc, CD3-CD19 und CD28-GD2 untereinander, wie auch CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T untereinander keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, führten die Behandlungen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T zu signifikant niedrigeren Tumorviabilitäten als die übrigen Behandlungen.

Die Testung für die E/T-Ratio 0.01:1 ergab einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Tumorviabilität zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 12.84$, $p \leq 0.0001$. Im Tukey post-hoc Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Viabilität zwischen aTc, CD3-CD19, CD3-GD2 und CD28-GD2, noch zwischen CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T. Die Tumorviabilität zeigte sich zwar signifikant niedriger in der zweiten Gruppe, jedoch waren beide Gruppen nicht in der Lage, eine Lyse und damit eine Viabilität unter 100% hervorzurufen.

3.6.3.3 SHSY5Y

Ergänzend wurde auch die Zelllinie SHSY5Y untersucht, dargestellt in Abbildung 41.

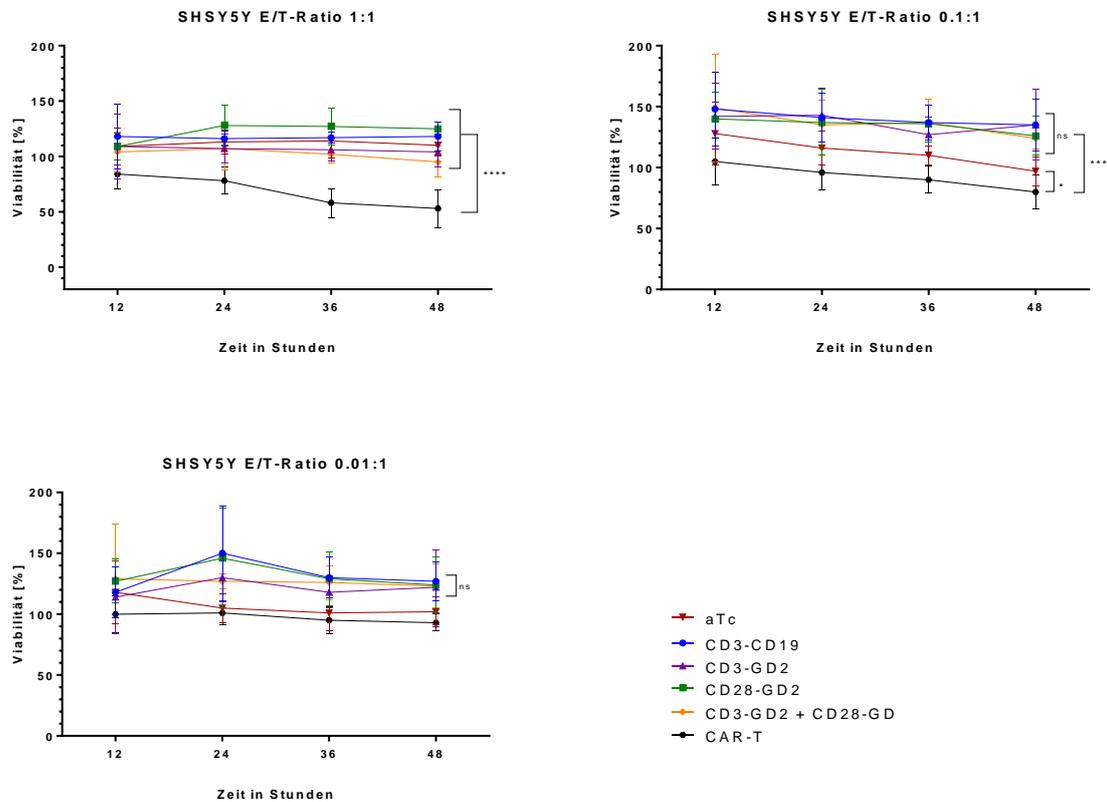


Abbildung 41: Viabilität der NB-Zelllinie SHSY5Y im Zeitverlauf je nach Behandlung, dargestellt für die E/T-Ratios 1:1, 0.1:1 und 0.01:1

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Effektorzellen (aTc = aktivierte T-Zellen, CAR-T = chimäre Antigenrezeptor T-Zellen) und Antikörpern (jeweils mit aTc appliziert, Konzentration je 5ng/ml) inkubiert und nach 12, 24, 36 sowie 48 Stunden luminometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) eines technischen Triplets sowie die statistische Auswertung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. * p≤0.05, **** p≤0.0001, ns = nicht signifikant.

Die statistische Auswertung zeigt für die E/T-Ratio 1:1, dass signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen nachgewiesen werden können, $F(5.000, 75.00) = 24.07$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test ergab, dass die CAR-T Behandlung zu einer Lyse von 47% (Viabilität 53%, SD 17) und damit zu einer signifikant niedrigeren Viabilität der SHSY5Y-Zellen führte im Vergleich zu allen anderen Behandlungen ($p \leq 0.0001$), welche allesamt keine Lyse (Viabilität < 100%) hervorrufen konnten.

Für die E/T-Ratio 0.1:1 ergaben sich statistisch ebenfalls Unterschiede zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 17.67$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test

ermittelte eine signifikant niedrigere Tumorviabilität bei einer Behandlung durch CAR-T Zellen im Vergleich zu aTc ($p \leq 0.05$) und allen anderen Behandlungen ($p \leq 0.0001$). Die maximale Lyse durch die CAR-T Zellen belief sich auf 20% (Viabilität 80%, SD 14). Zwischen den Behandlungen CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CD3-CD19 konnten keine Unterschiede verzeichnet werden. Auch bezüglich der E/T-Ratio 0.01:1 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen, $F(5.000, 75.00) = 9.008$, $p \leq 0.0001$. Der Tukey post-hoc Test ergab eine signifikant niedrigere Tumorviabilität durch CAR-T und aTc, jedoch vermochte weder die eine noch die andere Behandlung eine Lyse hervorzurufen.

4 Diskussion

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten besserte sich die Überlebenschance für Neuroblastompatienten nur geringfügig. Das 5-Jahres ereignisfreie Überleben im Hochrisikostadium beträgt auch mit extensiver Therapie nur ca. 50%, mit weitreichenden Nebenwirkungen (Richards et al. 2018; T. Simon et al. 2017). Ins Zentrum der Forschung sind neue Immuntherapien wie CAR-T Zellen und bispezifische Antikörper gerückt, welche jedoch bei Erprobung gegen solide Tumoren wie dem Neuroblastom insbesondere am immunsuppressiven Mikroenvironment scheitern; häufig fehlt es den Effektorzellen an der notwendigen Persistenz und Potenz in der unmittelbaren Tumorumgebung (Richards et al. 2018).

Als Target für zahlreiche immuntherapeutische Strategien dient das Oberflächenantigen GD2 auf Neuroblastomzellen, welches eine vielversprechende Grundlage bildet.

4.1 GD2 als potentes Target für immuntherapeutische Strategien

Seit der Entdeckung des GD2 wird das Antigen für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze gegen das Neuroblastom genutzt. Es stellt ein hervorragendes Ziel dar, da es zu einer Vielzahl auf Neuroblastomzellen, aber kaum auf normalem, menschlichen Gewebe exprimiert ist (Z. L. Wu et al. 1986). Aus diesem Grund als tumorassoziiertes Antigen bezeichnet (Navid, Santana, & Barfield 2010; Yoshida et al. 2001), ermöglicht es eine selektive Wirkung der Therapie auf Tumorzellen. Auch die Untersuchung der GD2-Expression auf den hier genutzten NB-Zelllinien LS, LAN-1 und SHSY5Y ergab überwiegend eine hohe Dichte an GD2-Molekülen: die Zelllinie LAN-1 exprimiert mit 99% positiven Zellen sowie einer MFI-R von 340,8 am meisten GD2 auf der Zelloberfläche, gefolgt von der Zelllinie LS (88,7%, MFI-R= 19,6). Seitz et al. kommen in Bezug auf die Zelllinien LS und LAN-1 auf vergleichbare Ergebnisse (Seitz et al. 2020).

Die Zelllinie SHSY5Y dagegen exprimiert nahezu kein GD2 (6,8%, MFI-R = 1,7) und wurde aus diesem Grund als Kontrolle genutzt. Sie gilt damit als quasi GD2-negative Zelllinie. Optimalerweise hätte eine vollständig GD2-negative Zelllinie als Negativkontrolle genutzt werden können, weil anderenfalls die Effektivität des GD2 als Target nicht vollständig bestätigt werden kann. Da dies in vollem Umfang nur

durch NB-Zelllinien mit GD2-knock-out zu erreichen wäre, hätte dies den Rahmen der Forschungsarbeit überschritten.

Der Vorteil, der durch GD2 gegeben ist, besteht allerdings nicht nur aus der selektiven Expression auf NB-Zellen. Ein weiterer Pluspunkt ist, dass GD2 bei nahezu jedem Patienten, der am Neuroblastom erkrankt ist, in einer Vielzahl auf der Tumorzelloberfläche exprimiert ist (Cheung, Lazarus, et al. 1987; Z. L. Wu et al. 1986) und weder durch eine Chemotherapie, noch durch eine Anti-GD2-Therapie herunterreguliert wird (Kramer et al. 1998). Neben dem Neuroblastom exprimieren noch weitere Tumorentitäten wie das Retinoblastom, das Ewing-Sarkom und das Melanom in unterschiedlichem Maße GD2 (Nazha, Inal, & Owonikoko 2020), sodass eine neu entwickelte Therapiemethode auch bei diesen Entitäten zum Einsatz kommen könnte. Terzic et al. konnten beweisen, dass auch das Maß der Expression einen Einfluss auf die Effektivität einer Anti-GD2-Therapie hat und Neuroblastomzellen eine große Heterogenität in Bezug auf die Expressionsmenge von GD2 aufweisen können (Terzic et al. 2018). In diesem Aspekt liegt gleichzeitig die Kehrseite: nicht jedes Neuroblastom exprimiert genügend GD2. So existieren Tumorzelllinien wie die hier verwendete SHSY5Y, die nahezu kein GD2 auf ihrer Zelloberfläche tragen.

Terzic et al. wiesen weiterhin nach, dass eine geringe GD2-Expression mit einem höheren Risiko für einen Tumorrückfall nach Anti-GD2 Therapie mit ch14.18 assoziiert ist (Terzic et al. 2018). Schumacher-Kuckelkorn et al. konnten bereits 2017 nachweisen, dass die Zahl der NB-Patienten ohne oder nur mit sehr wenig GD2-Expression mit 12% höher liegt als bisher angenommen (Schumacher-Kuckelkorn et al. 2017). Dabei liegt das Problem nicht nur im fehlenden Ansprechen auf eine Anti-GD2-Therapie. Diese Patienten erfahren Nebenwirkungen wie Schmerzen, Fieber und hypersensitive Reaktionen (Armideo, Callahan, & Madonia 2017; Yu et al. 2010), ohne jedoch von der Therapie zu profitieren.

Um nutzlose, aber zugleich schädliche Therapieanwendungen in Zukunft zu vermeiden, könnte eine prätherapeutische Testung der GD2-Expression hilfreich sein. Allerdings liegen noch keine Ergebnisse in der Literatur vor, ab welcher Molekülanzahl eine Anti-GD2-Therapie wirksam ist; weitere Studien zur Evaluation dieser Schwelle sollten durchgeführt werden. Darüber hinaus müssen Nachforschungen zu weiteren, potenziell nutzbaren Antigenen wie beispielsweise B7-H3 (CD276) oder HSN1.2 intensiviert werden, um auch GD2-negativen

Patienten eine optimale Therapie bieten zu können und deren Überlebenschancen zu erhöhen (Keyel & Reynolds 2019). Die zusätzliche Suche nach tumorspezifischen Antigenen, die nur auf Tumorzellen und nicht auf gesundem menschlichen Gewebe exprimiert sind, könnte sich als hilfreich erweisen (Jo, Ali, Shim, Lee, & Hong 2020).

Ein weiterer Ansatz, um unerwünschte Nebenwirkungen durch eine Anti-GD2-Therapie zu vermeiden, wäre die Nutzung von O-acetyliertem GD2. Alvarez-Rueda et al. konnten bereits zeigen, dass O-acetyliertes GD2 nicht auf peripheren Nerven nachweisbar ist und ein gegen dieses besondere Antigen gerichteter Antikörper vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Zytotoxizität liefert wie ein herkömmlicher GD2-Antikörper, ohne jedoch Nebenwirkungen wie Schmerzen hervorzurufen. Dies erlaubt gleichzeitig eine Dosisescalation und mögliche Verbesserung der Wirkintensität (Alvarez-Rueda et al. 2011).

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollten jedoch nur immuntherapeutische Strategien gegen GD2 genauer betrachtet werden, unter anderem bispezifische Antikörper.

4.2 Funktionalität und Effektivität der bispezifischen GD2-Antikörper

Die erste Beschreibung von bispezifischen Antikörpern erfolgte bereits in den 1960er Jahren. Die Zahl der Veröffentlichungen zu diesem Thema stieg in den letzten Jahrzehnten rasant an (Sedykh, Prinz, Buneva, & Nevinsky 2018). Besondere Beachtung genießt in diesem Kontext der bispezifische Antikörper Blinatumomab, welcher auf der einen Seite gegen CD19 auf B-Lymphozyten, auf der anderen Seite gegen den CD3-Rezeptor auf zytotoxischen T-Lymphozyten gerichtet ist. Seit 2014 ist er in den USA zur Therapie der Akuten lymphatischen B-Zell Leukämie als second-line Medikament zugelassen (Sedykh et al. 2018). Die Potenz dieses Antikörpers liegt darin, dass bereits geringe Konzentrationen von 10-100 pg/ml *in vitro* ausreichend sind, um einen zytotoxischen Effekt hervorzurufen (J. Wu, Fu, Zhang, & Liu 2015). Auch *in vivo* ist er für seine geringe Wirkkonzentration bekannt. Er wird Patienten bis zu einer maximalen Dosis von 0,6 mg/m²/Tag verabreicht, während monoklonale Antikörper wie Rituximab (Anti-CD20) auf Konzentrationen von bis zu 375 mg/m²/Tag angewiesen sind (Smits & Sentman 2016).

Eine ähnliche Effektivität erhofft man sich für bispezifische Antikörper bei der Therapie des Neuroblastoms. Die in dieser Forschungsarbeit anfänglich durchgeführte Antikörpertitration konnte belegen, dass bei den für das Neuroblastom konstruierten bispezifischen Antikörper, vor allem CD3-GD2 und CD3-GD2 + CD28-GD2, geringe Antikörperkonzentrationen von 5 ng/ml *in vitro* ausreichend sind, um zusammen mit PBMCs in den E/T-Ratios 2:1 und 1:1 eine signifikante Tumorlyse hervorzurufen. Diese Anwendungskonzentration erwies sich für die hier durchgeführten Versuche als optimal, da sie auch bei der niedrigen E/T-Ratio von 1:1 zu einer signifikanten, aber zunächst nicht übermäßigen Tumorlyse führte. Vermutlich werden sich bei *in vivo* Experimenten ähnliche Wirkkonzentrationen wie bei Blinatumomab ergeben, bestätigende Studien sollten durchgeführt werden.

Während sich nun die hier genutzte Antikörperkonzentration ähnlich zu der von Blinatumomab zeigt, ist sie längst nicht zu vergleichen mit der Anwendungskonzentration von Dinutuximab (ch14.18). Dieser monoklonale Anti-GD2-Antikörper, welcher seit 2017 auch in Europa zugelassen ist (Voeller & Sondel 2019), wirkt in *in vitro* Experimenten erst im Bereich von 1 µg/ml, mit einer E/T-Ratio von 20:1 (Siebert, Seidel, Eger, Juttner, & Lode 2014). Bispezifische Antikörper sind bereits bei 200-fach niedrigeren Konzentrationen wirksam, was für ihre starke Effektivität spricht.

Trotz dieser Tatsache ist das optimale Ergebnis einer neuen Therapie nicht nur von der Effektivität der Antikörper, sondern auch von der daraus resultierenden Effektorzellfunktion abhängig.

4.3 Die Effektorzellfunktion: Vergleich der Aktivierung und Proliferation

Bei der Verwendung von Immuntherapeutika zur Bekämpfung eines Tumors entfalten Antikörper ihre Wirkung über antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität, über komplementvermittelte Zytotoxizität oder durch direkte Zytotoxizität (Voeller & Sondel 2019). Mit Hilfe des GD2-Antikörpers ch14.18 konnten bereits Verbesserungen der Überlebenswahrscheinlichkeit und des ereignisfreien Überlebens für Neuroblastompatienten erreicht werden. Nichtsdestotrotz hat auch diese Therapie ihre Limitationen, das Gesamtüberleben

konnte nur geringfügig gesteigert werden (McGinty & Kolesar 2017). Die Gründe für die beschränkte Wirksamkeit liegen vermutlich in einer unzureichenden Exposition der Tumorzellen gegenüber den Antikörpern, der Unfähigkeit des Immunsystems des Patienten die Antikörper zu erkennen und Tumorzellen zu töten oder in der Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer solchen Antikörpertherapie (Keyel & Reynolds 2019). Umso wichtiger ist es, bei neuartigen Therapieansätzen eben diese Effektorzellfunktion, fokussiert auf die Aktivierung und Proliferation, zu untersuchen und sicherzustellen. Das größte Hindernis, das sich einer adäquaten Effektorzellfunktion in den Weg stellt, ist das immunsuppressive Tumor-Mikroenvironment. Es hindert vor allem T-Zellen durch Mechanismen wie die Ausschüttung von immunsuppressiven Zytokinen (TGF β 1 oder IL-10), Rekrutierung immunsuppressiver Zellen oder Dysregulation von Immun-Checkpoint Molekülen in die unmittelbare Umgebung von soliden Tumoren zu gelangen (Pistoia et al. 2013). Da Antikörper auf die Funktion von T-Zellen angewiesen sind, könnte dadurch die begrenzte Wirksamkeit der bisher verwendeten Antikörper erklärt werden.

Immuntherapeutische Ansätze, die bereits bei der Behandlung von Leukämien und Lymphomen erfolgreich sind, mussten sich einem solchen Gegenspieler nicht stellen (Jo et al. 2020). Umso wichtiger ist es nun, neue Generationen von CAR-T Zellen und bispezifischen Antikörpern zu entwickeln, welche in der Lage sind, die Barrieren solider Tumore zu überwinden und im Rahmen des Tumor-Mikroenvironments zur Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen zu führen.

4.3.1 CD3-GD2

Im Zuge dieser Forschungsarbeit konnte explizit gezeigt werden, dass durch den bispezifischen Antikörper CD3-GD2 Effektorzellen in unmittelbarer Tumorumgebung aktiviert werden, insbesondere verdeutlicht durch die Co-Expression von CD25⁺/CD69⁺. Diese Aktivierung ist ferner ausreichend, um zu einer Proliferation der Effektorzellen zu führen und ist spezifisch auf die GD2-positiven Zelllinien LS und LAN-1 zurückzuführen.

Dass diese Beobachtungen kein Einzelfall sind, zeigt auch die Literatur. Ähnliche Ergebnisse liefern beispielsweise Yankelevich et al.: sie konnten nachweisen, dass aktivierte T-Zellen, welche zuvor mit einem CD3-GD2-bispezifischen Antikörper armiert wurden, zu einer spezifischen Lyse von GD2-positiven Tumorzellen führten sowie zu einer signifikanten Zytokinausschüttung (Yankelevich et al. 2012). Und

auch Cheng et al. präsentierten einen bispezifischen Antikörper (gerichtet gegen GD2 und CD3), welcher zu einer GD2-spezifischen Tumorzelllyse und T-Zell-Aktivierung, gemessen am Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle sowie Zytokinausschüttung, führt (Cheng et al. 2016).

Dass bispezifische Antikörper mit CD3 als Effektorzelltarget effektiv sind, zeigen Studien auch bei anderen Tumorentitäten wie der Leukämie (J. Wu et al. 2015). Robinson et al. konnten zeigen, dass der bispezifische Antikörper CD3-CD19 zu einer signifikanten T-Zell-Aktivierung sowohl von CD4^+ - als auch CD8^+ -T-Zellen führte, gemessen an der Expression von $\text{CD25}^+/\text{CD69}^+$. Nach erfolgter Aktivierung führte der Kontakt mit Tumorzellen zu einer nachweisbaren Proliferation (Robinson et al. 2018)

Und auch bei anderen soliden Tumorentitäten zeigen sich bispezifische Antikörper mit CD3 als T-Zell-Target effektiv. Hipp et al. untersuchten beispielsweise den BCMA (B-Zell Maturation Antigen) - CD3-Antikörper gegen das Multiple Myelom und konnten mit den gleichen Untersuchungsmethoden wie in dieser Forschungsarbeit sowohl eine Aktivierung (gemessen an der Expression von CD25^+ und CD69^+) und Proliferation der Effektorzellen, als auch die Zytokinausschüttung und Tumorzelllyse nachweisen (Hipp et al. 2017).

Interessanterweise kann durch den CD3-GD2-Antikörper eine spezifische Lyse von Tumorzellen sowie Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen erreicht werden, ohne dass eine Co-Stimulation oder MHC-Klasse-I-Präsentation notwendig ist. Dies ist zwar bereits bekannt (Brischwein et al. 2007), spricht allerdings deutlich für die besondere Potenz des hier konstruierten Antikörpers.

Zusammenfassend beweist sich der CD3-GD2 bispezifische Antikörper als effektive Therapiemethode gegen das Neuroblastom. Wie auch ähnliche Untersuchungen bei unterschiedlichen Tumorentitäten zeigen, ist ein bispezifischer Antikörper mit CD3 als T-Zell-Target in der Lage, das immunsuppressive Mikroenvironment zu überwinden und T-Zellen in unmittelbarer Tumorumgebung ausreichend zu aktivieren, sodass diese anschließend proliferieren. Gleichzeitig darf man auch von einer ausreichenden Effektivität *in vivo* ausgehen, wenn man die Ergebnisse mit dem bereits in der Therapie von Leukämie zugelassenem Antikörper CD3-CD19 vergleicht. Dahingehend sollten weitere Studien erfolgen.

Enorm wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die erprobten bispezifischen Antikörper nicht wahllos alle T-Zellen aktivieren, wie dies beispielsweise mit einem monoklonalen Anti-CD3 Antikörper der Fall wäre (Chatenoud, Ferran, & Bach 1991), sondern dass die T-Zell-Aktivierung spezifisch in Anwesenheit von Tumorzellen stattfindet. Der HER2-CD3-bispezifische Antikörper führte beispielsweise durch seinen Fcγ-Rezeptor zu einer ausgeprägten immunologischen Reaktion mit vielen unerwünschten Nebenwirkungen (Kiewe et al. 2006). Die Befürchtung, CD3-GD2 könnte durch eine ungerichtete T-Zell-Aktivierung ohne Tumorzellkontakt zu einer ähnlichen Symptomatik führen, kann mit den hier gezeigten Ergebnissen minimiert werden, bei der Behandlung der nahezu GD2-negativen Zelllinie SHSY5Y kam es zu kaum einer Aktivierung, proliferierte T-Zellen konnten gar nicht nachgewiesen werden.

Ob eine Co-Stimulation, beispielsweise durch einen bispezifischen Antikörper mit CD28 als Target auf T-Zellen, effektiv oder gar unverzichtbar ist, wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.3.2 CD28-GD2

Die Anwendung des Antikörpers CD28-GD2 allein führte zelllinienunabhängig zu nahezu keinem Aktivierungszuwachs der Effektorzellen, noch zu einer Proliferation. Seine Wirkung liegt damit weit unter der des CD3-GD2-Antikörpers.

Während monoklonale Anti-CD28-Antikörper in der Lage sind lebensbedrohliche Zytokinstürme auszulösen (Eastwood et al. 2013), kann dies bei bispezifischen Antikörpern gegen CD28 und tumorspezifische Antigene (TSA) glücklicherweise nicht beobachtet werden: Skokos et al. zeigen ebenfalls, dass die Nutzung eines einzelnen CD28-TSA-Antikörpers nur zu einer sehr begrenzten Aktivierung führt, eine Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität wurde nachweislich nicht hervorgerufen (Skokos et al. 2020). Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von Waite et. al überein, welche für zwei bispezifische Antikörper (CD28 als T-Zell-Target und ein Prostatakarzinom sowie einen epithelialen Tumor als TSA) keine nennenswerte Toxizität zur Folge hatte (Waite et al. 2020).

Ob allerdings die Co-Stimulation mit einem CD28-GD2 Antikörper bei gleichzeitiger Nutzung eines CD3-GD2-Antikörpers gegen Tumorzellen sinnvoll ist, wird im folgenden Kapitel abgehandelt.

4.3.3 Kombinationstherapie CD3-GD2 + CD28-GD2

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass auch die Kombination der zwei bispezifischen Antikörpern CD3-GD2 und CD28-GD2 zu einem deutlichen Aktivierungszuwachs sowie Proliferationszuwachs von T-Zellen führte, hochspezifisch für die GD2-positiven Zelllinien LS und LAN. Während die zu erwartende Wirksteigerung durch den CD28-GD2-Antikörper in Bezug auf die Aktivierung ausblieb, ist dieser bei Betrachtung der Proliferation deutlich nachweisbar.

Die Entwicklung einer solchen Therapiemethode gestaltete sich allerdings abwechslungsreich. Nachdem die Erprobung eines monoklonalen Anti-CD28-Antikörpers in einer Tragödie mit lebensbedrohlichen Komplikationen endete, hervorgerufen durch die ungerichtete Aktivierung von T-Zellen und resultierendem Zytokinsturm (Suntharalingam et al. 2006), wurde die Forschung an CD28-stimulierenden Antikörpern zunächst eingestellt. Die Hoffnung, dass zusätzlich zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors (Signal 1) eine Wirkverstärkung durch Co-Stimulation von CD28 (Signal 2) zu erreichen sei, wurde zunichte gemacht. Der Einsatz eines monoklonalen, superagonistischen Anti-CD28-Antikörpers führte zu einer ungerichteten und unspezifischen Aktivierung aller T-Zellen unabhängig vom T-Zell-Rezeptor (Luhder et al. 2003), was nicht im Interesse einer spezifischen, antitumoralen Therapie steht.

Erfreulicherweise nahm die Forschung wieder Fahrt auf, nachdem deutlich wurde, dass eine spezifische Co-Stimulation von CD28 durch bispezifische Antikörper möglich ist und unerwünschte Nebenwirkungen wie eine massive Zytokinfreisetzung nicht zu erwarten sind. Zahlreiche Studien zeigen mittlerweile, dass der Einsatz eines bispezifischen CD28-TSA-Antikörpers zusammen mit einem CD3-TSA-Antikörper eine Wirkverstärkung gegenüber der alleinigen Nutzung eines CD3-TSA-Antikörpers bewirkt. Waite et al. weisen nach, dass bispezifische CD28-TSA-Antikörper allein keine Nebenwirkungen aufweisen, während sie in Kombination mit PD-1 Liganden eine Wirkverstärkung verursachen können (Waite et al. 2020). Auch Skokos, Waite et al. zeigen eine verstärkte Wirkung gegen Tumorzellen und einen Aktivierungszuwachs der Effektorzellen bei Kombination von bispezifischen CD3-TSA-Antikörpern zusammen mit CD28-TSA-Antikörpern (Skokos et al. 2020).

Neuste Untersuchungen durch Warwas et al. können darüber hinaus eine Wirkverstärkung durch einen CD28-TSA- bispezifischen Antikörper bei Behandlung von EpCAM-positiven Karzinomzellen nachweisen. Während der besagte Antikörper allein keine zytotoxischen Effekte zeigt, führt er in Kombination mit einem CD3-TSA Antikörper zu einer stärkeren Aktivierung, Proliferation und Zytokinausschüttung. Durch diese Wirkverstärkung konnte darüber hinaus eine Reduktion der CD3-TSA-Dosis *in vitro* erreicht werden, außerdem erhofft man sich eine Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen *in vivo*. Gleichzeitig konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Effektorzellen sich als weniger anfällig für das immunsuppressive Mikroenvironment präsentierten, wenn eine Co-Stimulation durch CD28-TSA bispezifische Antikörper erfolgte (Warwas et al. 2021).

Insgesamt zeigen die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse, im Einklang mit der Literatur, dass eine Co-Stimulation durch einen CD28-TSA-bispezifischen Antikörper eine vielversprechende Möglichkeit zur Verstärkung der antitumoralen Immunantwort durch einen CD3-TSA-bispezifischen Antikörper darstellt. In weiteren Studien sollte zudem untersucht werden, ob durch die Hinzunahme costimulatorischer, bispezifischer Antikörper die Dosis von CD3-TSA-bispezifischen Antikörpern bei der Behandlung des Neuroblastoms verringert werden kann und ob durch bispezifische Antikörper gegen andere costimulatorische Domäne wie OX40L oder 4-1BBL eine ähnliche oder sogar größere Wirkverstärkung erreicht werden kann.

Ob die Nutzung von CAR-T Zellen ähnlich Erfolge liefern kann, wird im folgenden Kapitel behandelt.

4.3.4 CAR-T Zellen

Die Entwicklung von T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor für die Behandlung von hämatologischen Erkrankungen nahm in den letzten Jahrzehnten rasant Fahrt auf. Nachdem klinische Studien erfolgsversprechende Remissionsraten bei refraktären oder rückfälligen B-Zell Lymphomen zeigten, wurden bereits 2018 zwei Präparate in Europa zugelassen: Tisagenlecleucel zur Behandlung der Vorläufer-ALL und dem großzelligen B-Zell Lymphom sowie Axicabtagene ciloleucel zur Behandlung des B-Zell Lymphoms (Schwerdtfeger et al. 2021). Doch während diese gegen CD19 gerichteten CAR-T Zellen ihr Target bereits in der Blutbahn auffinden und bekämpfen können, ergeben sich bei der

Behandlung von soliden Tumoren einige Hindernisse: zum einen müssen die CAR-T Zellen zunächst den Tumor lokalisieren und trotz dichter extrazellulärer Matrix infiltrieren können. Gleichzeitig werden von soliden Tumoren Signalmoleküle wie beispielsweise Chemokine sezerniert, welche zusammen mit immunsuppressiven Zellen wie regulatorischen T-Zellen ein CAR-T Zell Homing verhindern und somit die zytotoxischen Effekte abschwächen können (Zhao et al. 2020). Diese Mechanismen, zusammenfassend als immunsuppressives Mikroenvironment bezeichnet, gilt es mit neuen und verbesserten CAR-T Zellen zu überwinden.

In der hier vorliegenden Arbeit kann deutlich gezeigt werden, dass CAR-T Zellen eben dazu in der Lage sind: bei Behandlung der stark GD2-positiven Tumorzelllinien LS und LAN-1 kommt es zu einem bedeutenden Aktivierungszuwachs und zu einer ersichtlichen Proliferation. In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse zu finden: Gargett, Yu et al. zeigen, dass CAR-T Zellen durch eine Stimulation mit Neuroblastomzellen der Linie LAN-1 aktiviert werden, ausgedrückt durch die Marker CD25⁺ und CD69⁺. Interessanterweise kann diese Arbeitsgruppe nachweisen, dass die CAR-T Zellviabilität in diesem Setting gleichzeitig sinkt, vermutlich durch Aktivierungs-induzierten Zelltod (Gargett et al. 2016). Dieses Problem ist nicht neu: als Strategie des Immunsystems gegen mögliche Autoimmunität sollen so vermutlich zu ungerichtete und stark aktivierte Immunzellen gehemmt werden (Hoseini, Dobrenkov, Pankov, Xu, & Cheung 2017). Hoseini, Dobrenkov et al. zeigen: während vor allem CAR-T Zellen vom aktivierungsinduzierten Zelltod betroffen sind, können bei durch bispezifische Antikörper aktivierte T-Zellen solche Effekte nicht nachgewiesen werden (Hoseini et al. 2017). Diverse Strategien gegen diesen Mechanismus werden bereits entwickelt: die Nutzung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (Gargett et al. 2016), Veränderung der CAR-T Zell Struktur (Long et al. 2015) und die zusätzliche Aktivierung von Überlebens-Signalwegen in CAR-T Zellen (J. Sun et al. 2010). Die Datenlage in Bezug auf GD2-CAR-T Zellen bleibt allerdings uneindeutig. Dahingehend sollten weitere Untersuchungen zur Evaluierung einer bestmöglichen Vermeidungsstrategie von Aktivierungs-induziertem Zelltod durchgeführt werden.

Einen interessanten Ansatz liefert auch die Arbeitsgruppe von Rodgers et al.: diese haben eine neuartige switch-CAR-T Technik entwickelt, mit welcher die CAR-T-Zell-Aktivierung und damit Funktion steuerbarer gemacht werden soll. Die

Forschenden entwickelten ein System, in welchem CAR-T Zellen erst nach Zugabe eines speziell entwickelten und titrierbaren Antikörpers an die Tumorzellen binden. Sie können nachweisen, dass eine Aktivierung der CAR-T Zellen mit Expression der Marker CD25⁺ und CD69⁺ spezifisch in Anwesenheit von Tumorzellen und switch-Antikörpern auftritt (Rodgers et al. 2016). Mit Hilfe eines solchen Systems ist es denkbar, den aktivierungsinduzierten Zelltod und eine übermäßige Zytokinausschüttung von CAR-T Zellen und damit die bedrohlichen Nebenwirkungen für Patienten zu kontrollieren. Ähnliche Systeme sollten ebenfalls für das Neuroblastom untersucht werden.

Die Nutzung von CAR-T Zellen birgt weitere Vorteile: sogar die Exposition gegenüber der nur sehr schwach GD2-positiven Zelllinie SHSY5Y führt zu einer Aktivierung, jedoch nicht zu einer Proliferation. Diese Ergebnisse zeigen, dass die genutzten CAR-T Zellen der 2. Generation schon durch geringe Antigenmengen aktiviert werden können. Sie bieten den Vorteil, alle drei Signale der T-Zellaktivierung zu vereinen: nachdem bereits vor der Behandlung eine Konditionierung der CAR-T Zellen mit den Zytokinen IL-7 und IL-15 durchgeführt worden ist, folgt bei Tumorkontakt das Signal 1 über den CD3ζ-T-Zell-Rezeptor, gleichzeitig wird durch die costimulatorische Domäne (hier 4-1BB) das Signal 2 vermittelt, es kommt zur Zytokinausschüttung (Signal 3). Während bei Nutzung von bispezifischen Antikörpern eine T-Zell Aktivierung nur über das Signal 1 und nur bei Nutzung von costimulatorischen bispezifischen Antikörpern (hier beispielsweise CD28-GD2) auch über das Signal 2 erfolgt, fehlt bei *in vivo* Nutzung die prätherapeutische Konditionierung mit Zytokinen. Zusätzlich läuft die Bindung an GD2 und die Co-Stimulation über zwei unterschiedliche Signalwege ab (die Unterschiede sind in Abbildung 42 graphisch veranschaulicht). Dies könnte ein Nachteil gegenüber der Nutzung von CAR-T Zellen sein, insbesondere bei Tumorzelllinien mit geringen Antigenmengen. Weitere Studien sollten dahingehend allerdings durchgeführt werden, um die möglichen Auswirkungen zu untersuchen.

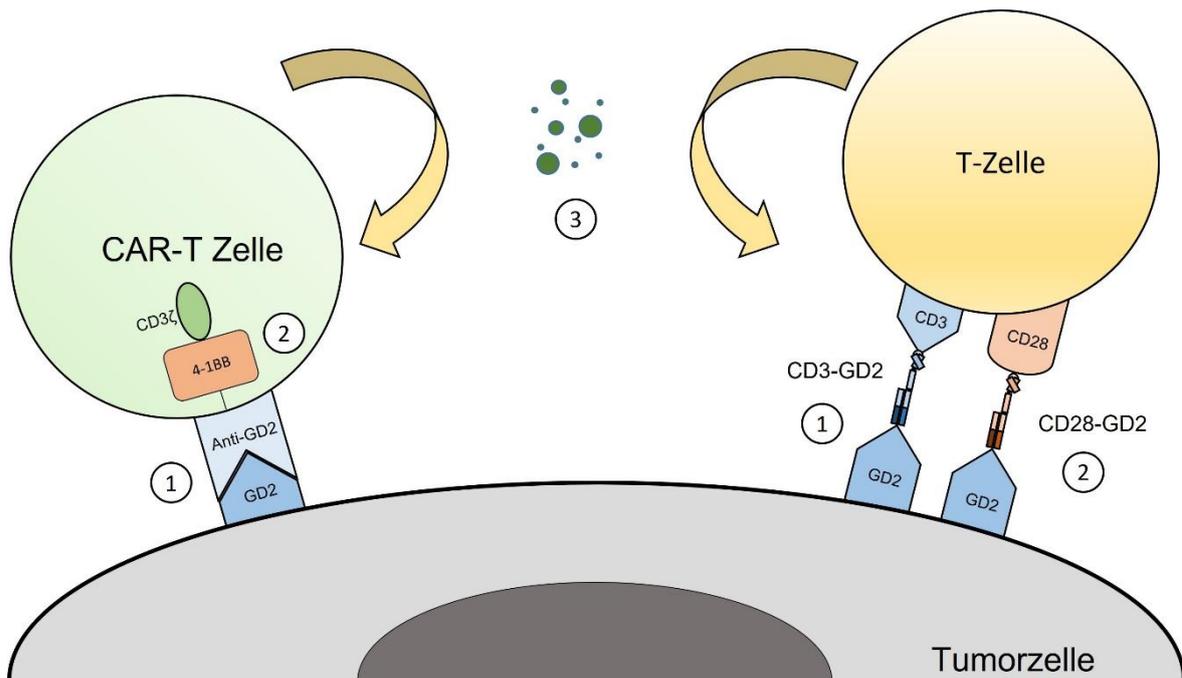


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Aktivierung in drei Schritten von CAR-T Zellen durch GD2 auf Tumorzellen sowie von T-Zellen durch die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und CD28-GD2 sowie GD2 auf Tumorzellen.

Links im Bild wird die CAR-T Zelle über drei Schritte aktiviert: 1.: über an GD2 bindendes Anti-GD2, welches mit dem CD3 ζ -T-Zell-Rezeptor verbunden ist, 2.: über das costimulatorische Molekül 4-1BB, und 3.: über die Ausschüttung von Zytokinen. Rechts im Bild wird die T-Zelle ebenfalls über drei Schritte aktiviert: 1.: durch einen bispezifischen CD3-GD2 Antikörper, welcher an GD2 auf Tumorzellen bindet, 2.: durch den bispezifischen Antikörper CD28-GD2, welcher als Co-Stimulation dienen kann und ebenfalls an GD2 auf Tumorzellen bindet, und 3.: über Zytokinausschüttung.

Zur vollständigen Tumorbekämpfung durch einen neuen Therapieansatz reicht der alleinige Nachweis der Effektorzellaktivierung und späteren Tumorlyse allerdings nicht aus. Vielmehr muss die ausreichende Effektorfunktion sichergestellt werden. Dazu sollten die Effektorzellen zunächst adäquat aktiviert werden, um anschließend zu proliferieren und die langfristige Tumorkontrolle sicherzustellen. Erst bei Nachweis der Proliferation kann von einem potenziellen Therapieansatz gesprochen werden.

4.3.5 Außerordentliche Proliferation der Effektorzellen

Die durchgeführten *in vitro* Experimente legen nahe, dass eine Proliferation der Effektorzellen durch die hier genutzten Therapien erfolgt. Insbesondere durch die Behandlung mit CD3-GD2 + CD28-GD2 bei der stark GD2-positiven Zelllinie LAN-1 können signifikant mehr proliferierte Effektorzellen nachgewiesen werden als durch eine Alleintherapie mit CD3-GD2. Dieser Effekt rührt höchstwahrscheinlich von der erfolgreichen Co-Stimulation durch den CD28-GD2-Antikörper her, wie bereits vermutet. Auch die Behandlung mit CAR-T Zellen führt zu zahlreich

proliferierten T-Zellen, die Ergebnisse unterscheiden sich diesbezüglich nicht signifikant von denen der bispezifischen Antikörpern CD3-GD2 + CD28-GD2. Nichtsdestotrotz lässt sich ein messbarer Unterschied zur Alleinbehandlung mit CD28-GD2 feststellen: diese Therapie führt zu nahezu keiner Proliferation der Effektorzellen. Die alleinige Co-Stimulation einer Effektorzelle reicht dementsprechend nicht zur Proliferation aus, es wird eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors benötigt. Trotz mäßig aktivierter Effektorzellen durch die Zelllinie SHSY5Y ist dies nicht ausreichend, um eine Proliferation hervorzurufen. Dies beweist wiederum die GD2-Abhängigkeit der Ergebnisse.

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass sowohl die genutzten CAR-T Zellen als auch durch bispezifische Antikörper aktivierte Effektorzellen in der Lage sind, das immunsuppressive Mikroenvironment *in vitro* zu überwinden und die Aktivierung zur Proliferation der Effektorzellen ausreicht. Beachtenswerte Ergebnisse erzielen insbesondere die Therapieansätze CD3-GD2 + CD28-GD2 wie auch die CAR-T Zellen.

Dass CAR-T Zellen ebenfalls in der Lage sind, nach Infusion im menschlichen Körper zu proliferieren, ist durch zahlreiche Studien bei Leukämiepatienten bekannt. Grupp, Kalaos et al. konnten nachweisen, dass sich CAR-T Zellen im Körper von Leukämie-Patienten bis zu 1.000-fach vermehren können (Grupp et al. 2013), Mamonkin, Rouce et al. zeigen, dass *in vitro* sogar eine 100.000-fache Expansion möglich ist (Mamonkin, Rouce, Tashiro, & Brenner 2015). Auch bispezifische Antikörper sind generell in der Lage, T-Zellen zu aktivieren und zu einer Proliferation zu führen, wie Bargou et al. bei der Untersuchung von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom und dem Antikörper Blinatumomab zeigen konnten (Bargou et al. 2008). Neuste Studien, welche die Expansion von CAR-T Zellen bei Neuroblastompatienten *in vivo* untersuchten, kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Straathof, Flutter et. al beweisen, dass auch in diesem Setting eine Expansion der CAR-T Zellen zustande kommt (Straathof et al. 2020). Vergleichende *in vitro* Studien, welche die Proliferationstendenzen von CAR-T Zellen sowie aktivierten T-Zellen nach Anwendung von verschiedenen bispezifischen Antikörpern beim Neuroblastom in ähnlicher Art und Weise wie in dieser Dissertation untersuchen, sind allerdings nicht vorhanden. Während sich die meisten Veröffentlichungen auf die Tumorzelllyse und Zytokinausschüttung konzentrieren, konnte hier durch zusätzliche Betrachtung der Aktivierung und Proliferation eine vollständige und

umfassende Evaluation der Effektorzellfunktion durchgeführt werden. Denn bevor nicht sichergestellt ist, dass die Effektorzellen *in vitro* im immunsuppressiven Tumor-Mikroenvironment überleben, aktiviert werden und proliferieren können, sollte keine präklinische *in vivo* Evaluation durchgeführt werden. Welchen Einfluss dabei CD4⁺- und CD8⁺-Effektorzellen spielen, wird im folgenden Kapitel besprochen.

4.3.6 Stellenwert der Unterscheidung zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

Ein Teilergebnis dieser Dissertation ist, dass durch CAR-T Zellen und die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 sowie CD3-GD2 + CD28-GD2 sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen aktiviert werden. Während die CD8⁺-T-Zellen ihre Aktivierung durch CD25⁺-Positivität und CD25⁺/CD69⁺-Doppeltpositivität ausdrücken, exprimieren die CD4⁺-T-Zellen vorwiegend CD69⁺.

Verschiedene Studien belegen, dass die Aktivierung von sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen für eine effektive und langfristige Tumorbekämpfung notwendig sind. Bei der Nutzung von CAR-T Zellen werden meist beide T-Zell-Subpopulationen mit dem chimären Antigenrezeptor ausgestattet. Yang et al. haben nachgewiesen, dass CD8⁺-T-Zellen zwar den Hauptbeitrag zur Zytolyse leisten, sie allerdings kürzer *in vivo* persistieren als CD4⁺- T-Zellen. Diese tragen ebenfalls zur Tumorlyse bei, sind gleichzeitig aber weniger anfällig für T-Zell-Erschöpfung und können länger *in vivo* nachgewiesen werden (Yang et al. 2015). Daneben liegen klinische Studien vor, welche verschiedene Verhältnisse von CD4⁺- und CD8⁺-CAR-T Zellen bei der Behandlung von Leukämien untersuchten. Turtle et al. beispielsweise zeigen, dass bei einem Verhältnis von 1:1 bei 27 von 29 Patienten mit refraktärer, akuter B-ALL eine Knochenmarksremission erreicht werden kann (Turtle, Hanafi, Berger, Gooley, et al. 2016). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte bei der Behandlung von refraktären B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen eine komplette Remission bei 64% der Patienten erreichen, indem ebenfalls eine Ratio von 1:1 angewendet wurde (Turtle, Hanafi, Berger, Hudecek, et al. 2016). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivierung beider T-Zell-Subtypen notwendig ist, um bei Patienten eine komplette Remission zu erreichen. Welches Verhältnis allerdings das Optimum darstellt, sollte in weiteren Studien geklärt werden. Insbesondere sollten Versuche dieser Art auch beim Neuroblastom durchgeführt werden.

Doch auch bispezifische Antikörper sind in der Lage, sowohl an CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen zu binden und diese zu aktivieren, wie beispielsweise Mack et al. bei der Untersuchung von bispezifische Antikörpern, gerichtet gegen EpCAM und CD3, bereits 1997 nachweisen konnten. Dabei zeigen CD8⁺-T-Zellen, ähnlich zu den CAR-T Zellen, bereits nach 4 Stunden zytotoxische Effekte, während CD4⁺-T-Zellen erst nach 20 Stunden zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Des Weiteren wird eine erhöhte Expression von CD25⁺ auf den Effektorzellen als Zeichen der Aktivierung nachgewiesen (Mack, Gruber, Schmidt, Riethmuller, & Kufer 1997). Auch neuere Studien beweisen, dass bispezifische Antikörper sowohl an CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen binden können und Targetzellen durch Ausschüttung von Perforinen und Granzym B lysieren können (Haas et al. 2009).

Die dadurch ebenfalls ausgelöste Zytokinausschüttung birgt allerdings einige Nachteile.

4.4 Das Problem des Zytokinsturmes

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass insbesondere die Therapieansätze CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 und CAR-T Zellen bei den Zelllinien LS und LAN-1 zu einer stärkeren Ausschüttung von TNF- α , IL-2 und IFN- γ führen als die Kontrollen. Dabei kann bei nahezu allen untersuchten Konstellationen (Tumorzellen und Zytokinen) beobachtet werden, dass die CAR-T Zellen zur stärksten Zytokinausschüttung führen, in absteigender Reihenfolge gefolgt von den Antikörpern CD3-GD2 + CD28-GD2 und CD3-GD2 allein. Der bispezifische Antikörper CD28-GD2 ist ebenfalls in der Lage, signifikant höhere Zytokinkonzentrationen als die Kontrollen hervorzurufen, auch wenn die Ausschüttung nur gering ausfällt. Gleichzeitig bestätigen die Ergebnisse die Vermutung, dass die Zytokinausschüttung spezifisch nur in Gegenwart von GD2-positiven Zellen erfolgt, wie auch Seitz et al. bereits postulierten (Seitz et al. 2020).

Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann exemplarisch für die zwei GD2-exprimierenden NB-Zelllinien gezeigt werden, dass durch die genannten Therapieansätze eine ausreichende Zytokinausschüttung sichergestellt ist. Dies ist bedeutend, da die Zytokine als Boten- und Signalstoffe für andere Effektorzellen wie Makrophagen und T-Zellen dienen und dadurch die Immunantwort verstärken (Xu et al. 2015). Textor et al. konnten zeigen, dass INF- γ und angelockte Makrophagen entscheidend sind

bei der Tumorbekämpfung auf zellulärer Ebene (Textor et al. 2014). Auch IL-2 kommt als T-Zell-Wachstumsfaktor und essenzieller Bestandteil der autokrinen Aktivierung einer T-Zelle eine hohe Bedeutung zu (Horn 2020). Doch hängt von diesem Zytokin gleichzeitig die Ausprägung eines Zytokinsturmes ab, wie Eastwood et al. durch die Testung von Anti-CD28- und Anti-CD3-Antikörpern darlegten (Eastwood et al. 2013). Insbesondere CAR-T Zellen sind in der Literatur mit der Entwicklung eines fulminanten Zytokinsturmes assoziiert, welcher durch eine systemische Entzündungsantwort mit Symptomen wie Fieber, Tachykardie und Hypotonie charakterisiert ist (Brudno & Kochenderfer 2019). Auch die in dieser Dissertation gesammelten Ergebnisse stimmen darin überein, dass die Zytokinausschüttung durch CAR-T Zellen, unabhängig von der Zelllinie, signifikant stärker ausgeprägt ist als durch die bispezifischen Antikörper. Die gleichzeitige Notwendigkeit einer ausreichenden Zytokinausschüttung zur Effektorzellrekrutierung stellt ein Problem dieser Immuntherapeutika dar.

Während in der Literatur für das Auftreten eines Zytokinsturmes durch Therapie mit bispezifischen Antikörpern bei Leukämien eine Wahrscheinlichkeit von 7-15% angegeben ist, liegt das Auftreten bei Studien zur Verwendung von CAR-T Zellen um einiges höher bei 13-26% (Strohl & Naso 2019). Dies beruht vermutlich auf der stärkeren Aktivierung und Expansion von CAR-T Zellen (Brudno & Kochenderfer 2016). Doch sind CAR-T Zellen aus diesem Grund nicht zu vernachlässigen. Verschiedene Verfahren zur Bewältigung oder Vermeidung eines Zytokinsturmes werden aktuell getestet: zum einen IL-6-Rezeptor blockierende Antikörper (Brudno & Kochenderfer 2016), IL-1 β blockierende Antikörper (Giavridis et al. 2018) sowie die Deletion des Gens für GM-CSF, welches bereits Erfolg im Sinne einer Reduktion des Auftretens eines Zytokinsturmes gezeigt hat (Sternier et al. 2019).

4.5 Die Tumorlyse als Maß der Therapieeffektivität

Zum Abschluss der Untersuchungen lag der Fokus auf der effektiven Tumorlyse, welche zwischen den genutzten Therapieansätzen durch Messung der Tumorviabilität verglichen wurde. Es konnte verdeutlicht werden, dass zum einen zwischen den Therapieansätzen CD3-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 sowie CAR-T Zellen bei Behandlung der GD2-starkpositiven NB-Zelllinien LS und LAN-1 kein Unterschied besteht. Bezüglich der schwachpositiven bzw. nahezu negativen NB-Zelllinie SHSY5Y zeigte allerdings nur die Therapie mit CAR-T Zellen eine

signifikante Lyse. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Untersuchungen von Stone et al., welche ebenfalls eine stärkere Zytolyse durch CAR-T Zellen bei niedrigen Antigenkonzentrationen im Vergleich zu bispezifischen Antikörpern festgestellt haben (Stone, Aggen, Schietinger, Schreiber, & Kranz 2012). Des Weiteren belegen die durchgeführten Experimente, dass die Zytolyse dosisabhängig ist: je höher die E/T-Ratio, desto stärker die Lyse; dies gilt insbesondere bei den drei oben genannten Therapieansätzen für die Zelllinien LS und LAN-1. Erstaunlicherweise zeigt auch die Therapie mit CD28-GD2, zumindest in der E/T-Ratio 1:1, eine effektive Lyse trotz nicht nachweisbarer Aktivierung oder Proliferation. Gleichzeitig kann allerdings davon ausgegangen werden, dass der Antikörper allein *in vivo* keine adäquate Alternative darstellt, da er nur zur einmaligen Lyse führt und nicht zu einer langanhaltenden Aktivierung des Immunsystems beitragen kann.

Die Literatur bestätigt die Beobachtungen: auch bei Brischwein et al. ist eine Lyse bei geringeren Antikörperkonzentrationen nachweisbar, während zum Nachweis der Aktivierung *in vitro* entweder höhere Antikörperkonzentrationen oder E/T-Ratios benötigt werden (Brischwein et al. 2007). Man vermutet, dass zur Lyse von Targetzellen nur einige wenige T-Zellen aktiviert werden müssen.

Die dosisabhängige Lyse gilt ebenfalls für die Behandlung der NB-Zelllinie SHSY5Y mit CAR-T Zellen. Hier zeigt sich eine Lyse nur für die hohe E/T-Ratio von 1:1, während die anderen Therapieansätze, E/T-Ratio-unabhängig, keine Lyse hervorrufen. Dieselbe E/T-Ratio führt zwar auch zu einer mäßigen Aktivierung der Effektorzellen, doch reicht diese nicht zur Proliferation aus. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den oben Genannten von Stone et al. (Stone et al. 2012). Dass CAR-T Zellen eine größere Potenz im Hinblick auf die Lyse von Targetzellen aufweisen könnte damit zusammenhängen, dass sie zum einen vor der Nutzung durch Inkubation mit Zytokinen aktiviert worden sind und dadurch die Überwindung des immunsuppressiven Tumor-Mikroenvironments leichter fällt, während bei Nutzung der bispezifischen Antikörper *in vivo* die T-Zellen erst in der unmittelbaren Tumorumgebung aktiviert werden müssen. Zum anderen ist bei CAR-T Zellen die costimulatorische Domäne direkt integriert, während diese bei den bispezifischen Antikörpern fehlt bzw. extra durch einen zweiten Antikörper ersetzt werden müsste.

Im Gegensatz zu den bisher herausgearbeiteten Ergebnissen konnte durch die Kontrolltherapie mit aTc und CD3-CD19 sowie aTc allein wie erwartet keine Lyse nachgewiesen werden, dies ist unabhängig von der E/T-Ratio oder der Zelllinie. Schlussendlich wird hier dargelegt, dass bispezifische Antikörper in den genutzten niedrigen Konzentrationen von 5 ng/ml ohne passendes Zielantigen weder eine Aktivierung und Proliferation von T-Zellen noch eine Lyse bewirken können und die therapeutischen Effekte auf eine spezifische T-Zell-Aktivierung durch das Antigen GD2 zurückzuführen sind. Interessant ist, dass allerdings monoklonale anti-CD3-Antikörper wie zum Beispiel OKT-3 und Anti-CD28-Antikörper sehr wohl zu einer Aktivierung und Zytokinausschüttung führen können, im Falle von Anti-CD28 können diese sogar lebensbedrohlich sein (Chatenoud 1993; Suntharalingam et al. 2006). Dass bispezifische Antikörper zu einer solchen Reaktion ohne Anwesenheit von Zielzellen nicht imstande sind, ist ein enormer Vorteil dieser Therapeutika. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass bispezifische Antikörper in sehr niedrigen Konzentrationen an die T-Zellen binden sowie eine niedrige Affinität aufweisen, was bei fehlendem Antigen insgesamt zu einer unterschwelligeren T-Zell-Aktivierung führt (Brischwein et al. 2007).

4.6 Allgemeiner Vergleich von CAR-T Zellen und bispezifischen Antikörpern

Während bisher bispezifische Antikörper und CAR-T Zellen im Rahmen der Ergebnisse dieser Doktorarbeit verglichen worden sind, gibt es darüber hinaus noch weitere Aspekte zu bedenken.

Zunächst ist zu bemerken, dass bispezifische Antikörper aufgrund ihrer geringen Größe eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen, bei Blinatumomab (CD3-CD19) zum Beispiel nur ca. zwei Stunden (Nagorsen, Kufer, Baeuerle, & Bargou 2012). Dieser Umstand führt einerseits dazu, dass bispezifische Antikörper durch eine kontinuierliche intravenöse Infusion verabreicht werden müssen und dies die Flexibilität der behandelten Patienten einschränkt. Gleichzeitig ist diese charakteristische Eigenschaft ein nützlicher Sicherheitsaspekt, da bei auftretenden unerwünschten Nebenwirkungen die Infusion sofort gestoppt oder die Dosis angepasst werden kann (Aldoss et al. 2017). Die Persistenz von CAR-T Zellen *in vivo* allerdings variiert von mehreren Tagen bis zu einigen Jahren und ist von mehreren Aspekten abhängig: zum einen von lymphodepletierenden Maßnahmen,

zum anderen von der Herstellung der CAR-T Zellen sowie den Krankheitseigenschaften des Empfängers (Aldoss et al. 2017). Dadurch lassen sich Nebenwirkungen nahezu nicht regulieren. Gleichzeitig zeigen aber bereits Studien aus den Jahren 2008 und 2011, dass die Zeit bis zum Tumorrezidiv verlängert ist bei Patienten mit längerer CAR-T Zell Persistenz (Louis et al. 2011; Pule et al. 2008). Daraus lässt sich schließen, dass CAR-T Zellen durch ihre Persistenz im menschlichen Körper einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf einer Tumorerkrankung haben, auch lange Zeit nach Abschluss der Therapie.

Ein weiterer Aspekt ist, dass CAR-T Zellen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Bei der Anwendung von CD19-CAR-T Zellen bei Patienten mit Leukämie zeigten mehrere Patienten neurotoxische Symptome, gleichzeitig waren erhöhte Spiegel von CAR-T Zellen im Liquor nachweisbar (Aldoss et al. 2017). Diese Eigenschaft von CAR-T Zellen kann sich bei einigen Tumorentitäten als nützlich erweisen, da hierdurch zum Beispiel auch intrakranielle Tumore behandelt werden können (Akhavan et al. 2019). Weiterhin wäre denkbar, dass durch CAR-T Zellen auch Metastasen im zentralen Nervensystem mitbehandelt werden können. Bispezifische Antikörper dagegen können nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Aldoss et al. 2017; Davis 2014). Somit sind sie zwar nicht in der Lage, direkt neurotoxische Effekte hervor zu rufen (im Rahmen des Zytokinsturmes können trotzdem neurotoxische Schäden auftreten), doch können durch üblich konstruierte bispezifische Antikörper auch keine Metastasen im ZNS behandelt werden (Davis 2014).

Ein Problem von bispezifischen Antikörpern stellen die unterschiedlichen Affinitäten der beiden Arme dar. Aufgrund der höheren Affinität zur Tumorseite verteilen sie sich nach der Infusion zunächst auf den Tumorantigenen. Zytotoxische T-Zellen müssen zunächst den Weg durch das immunsuppressive Mikroenvironment finden und durch die Bindung an die Antikörper aktiviert werden. Hinzu kommt, dass die Aktivierung der T-Zellen abhängig ist vom CD3-Rezeptor, kein zweites costimulatorisches Signal vorhanden ist (außer bei Verwendung eines zusätzlichen costimulatorischen bispezifischen Antikörpers) und der Gesamteffekt der bispezifischen Antikörper durch das Tumor-Mikroenvironment beeinträchtigt werden kann (Strohl & Naso 2019).

Im Gegensatz dazu sind CAR-T Zellen bereits bei Infusion mit dem richtigen Antikörper ausgestattet und werden durch integrierte, costimulatorische Domäne

stärker aktiviert (Strohl & Naso 2019). Darüber hinaus werden sie schon vor der *in vivo* Nutzung durch Antikörper oder Zytokine aktiviert und sind so widerstandsfähiger gegenüber dem immunsuppressiven Mikroenvironment (Stone et al. 2012). Außerdem muss beachtet werden, dass die Therapieansätze an mit diversen immunsuppressiven und zytostatischen Medikamenten vorbehandelten Patienten angewendet werden. Bei den CAR-T Zellen kommt eine prätherapeutisch obligatorische Lymphodepletion hinzu. Somit können die bei den Immuntherapeutika so wichtigen Effektorzellen in ihrer Funktion eingeschränkt sein und die Effekte längst nicht so stark ausfallen wie gewünscht und *in vitro* getestet. Die CAR-T Zellen gleichen diese Einschränkung aus, indem sie durch den Entstehungsprozess einerseits Zeit zur Regeneration haben, andererseits durch Antikörper oder Zytokine bereits initial aktiviert werden können (Strohl & Naso 2019).

Als letzten Punkt sollte noch die Handhabung beider Therapiemethoden diskutiert werden. Bispezifische Antikörper weisen den Vorteil der leichten Herstellung auf, sie bestehen für alle Patienten aus den gleichen Strukturen und sind somit sofort verfügbar. Insbesondere die kurze Halbwertszeit ermöglicht eine genaue Dosiskontrolle und sofortige Dosisreduktion bei unerwünschten Komplikationen. CAR-T Zellen müssen dagegen vor Anwendung in einem von mehreren Tagen bis einigen Wochen dauernden Prozess hergestellt werden, dies geschieht bisher nur in wenigen Zentren und ist sehr kostspielig. Weiterhin brauchen viele Patienten sofort nach der Diagnosestellung eine Therapie, jede Zeitverzögerung könnte die Prognose verschlechtern (Stone et al. 2012; Strohl & Naso 2019).

4.7 Weiterführende Therapieoptionen

Bereits heute sind in der Literatur einige interessante Ideen zu finden, um die bisher entwickelten Therapieansätze zu verbessern und Nebenwirkungen zu reduzieren.

Zur Vermeidung von Nebenwirkungen der Anti-GD2-Therapien wurden Antikörper getestet, welche gegen O-acetyliertes GD2 gerichtete sind, anstatt gegen herkömmliches GD2. Solche Antikörper zeigen *in vivo* und *in vitro* vergleichbare tumorlytische Effekte, ohne jedoch Kreuzreaktionen mit peripheren Nervenfasern und somit Schmerzen hervorzurufen (Alvarez-Rueda et al. 2011). Weitere Studien mit CAR-T Zellen gegen O-acetyliertes GD2 werden aktuell durchgeführt, um diese Ergebnisse zu bestätigen und so möglicherweise in Zukunft ein neues,

nebenwirkungsärmeres, tumorassoziiertes Antigen als Target nutzen zu können (Fleurence et al. 2017).

Weiterhin hat eine Forschungsgruppe aus Tübingen ein System entwickelt, mit dem CAR-T Zellen abschaltbar sein können, falls zu starke unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Diese sogenannten Adapter CAR-T Zellen verfügen über einen T-Zellrezeptor, welcher gegen eine Biotinbindungsstelle an bispezifischen Adapterantikörpern gerichtet ist. Dieses System ermöglicht die Erkennung mehrerer Oberflächenantigene eines einzigen Tumors durch Adaptermoleküle unterschiedlicher Spezifitäten mit denselben CAR-T Zellen und verhindert ein Antigenescape durch Selektionsdruck des Tumors. Außerdem können zum einen die Kosten, aber auch die Herstellungszeit von CAR-T Zellen deutlich reduziert werden (Grote et al. 2020; Seitz et al. 2021).

4.8 Abschließende Gegenüberstellung beider Therapieansätze

Es kann festgehalten werden, dass bei beiden Therapieansätzen die Rekrutierung der Effektorzellen erfolgreich war, indem eine messbare Aktivierung, Proliferation, Zytokinausschüttung und Tumorlyse zu verzeichnen war. Im Speziellen gilt diese Aussage den Antikörpern CD3-GD2, den Antikörpern CD3-GD2 + CD28-GD2 im Mix sowie den CAR-T Zellen. Ähnliche Studien zu CD3-CD19 zeigen, dass auch dieser Antikörper bereits in einer sehr geringen Konzentration in der Lage ist, maligne Zellen mit dem Antigen CD19 zu CD3⁺-T-Zellen zu rekrutieren, den eigentlichen spezifischen T-Zellrezeptor zu umgehen und MHC-unabhängig eine T-Zellaktivierung und Tumorlyse hervorzurufen (Leone et al. 2013; Loffler et al. 2003; Loffler et al. 2000). Man kann somit behaupten, dass die bispezifischen Antikörper CD3-GD2 und die Antikörper CD3-GD2 + CD28-GD2 im Mix bezüglich der Funktion und Effektivität mit dem bereits zugelassenen bispezifischen Antikörper CD3-CD19 vergleichbar sind. Auch die hier getesteten GD2-CAR-T Zellen können ihre volle Funktionsfähigkeit unter Beweis stellen und ähneln diesbezüglich den CD19-CAR-T Zellen. Die durchgeführten Studien haben ihren besonderen Stellenwert in der aktuellen Krebsforschung, da erstmals eine umfassende und vergleichende Untersuchung T-Zell-rekrutierender Therapieoptionen, von der Aktivierung über die Proliferation und Zytokinausschüttung der Effektorzellen bis hin zur Tumorlyse von Neuroblastomzellen, durchgeführt worden ist.

Nichtsdestotrotz darf nicht vergessen werden, dass Immuntherapeutika gegen CD19 für Leukämien und Lymphome angewendet werden. Diese hämatologischen Erkrankungen unterscheiden sich von soliden Tumoren wie dem Neuroblastom, indem sie kein immunsuppressives Mikroenvironment aufbauen können. Die Überwindung dieser Barriere ist im Rahmen dieser Dissertation bereits *in vitro* gelungen. Nun müssen *in vivo* Versuche an Mausmodellen zeigen, dass die Ergebnisse auf Lebewesen übertragbar sind.

Im direkten Vergleich der beiden Therapieansätze zeigen CAR-T Zellen einen klaren Vorteil bei geringen Antigenmengen, während sie gleichzeitig mehr Zytokine bei Aktivierung ausschütten und somit die Gefahr eines Zytokinsturmes im Körper des Patienten größer ist. Bispezifische Antikörper erzielen bei großen Antigenmengen die gleichen Effekte, sind jedoch sowohl günstiger und schneller in der Produktion als auch durch eine kurze Halbwertszeit besser adaptierbar und sicherer in der Anwendung. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, stellen denkbare Therapieoptionen der Zukunft dar und sollten weiter im Mittelpunkt intensiver Forschung stehen. Um die Vorteile beider Ansätze nutzen zu können, wäre es denkbar, CAR-T Zellen vor allem bei Tumoren mit niedriger Antigenkonzentration zu nutzen, während bispezifische Antikörper bei hohen Antigenkonzentrationen Anwendung fänden. Um diese Differenzierung durchzuführen, müsste zunächst ein Schwellenwert an Antigenkonzentration evaluiert werden. Weiterhin wäre eine intensivere, prätherapeutische Testung notwendig, welche im Rahmen der sowieso erfolgenden histologischen Tumoruntersuchung umgesetzt werden könnte.

Insgesamt betrachtet haben immuntherapeutische Ansätze die Therapie fortgeschrittener Tumorerkrankungen in der letzten Dekade revolutioniert. Insbesondere die gegen GD2 gerichtete Immuntherapie in Kombination mit einer allogenen Stammzelltransplantation konnte beim fortgeschrittenen Neuroblastomrezidiv im Stadium IV ein hervorragendes langfristiges Überleben ermöglichen, während GD2-CAR-T Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem Neuroblastom ebenfalls vollständige Remissionen induzieren konnten. Die Weiterentwicklung dieser vielversprechenden immuntherapeutischen Ansätze und insbesondere der frühe Einsatz könnte in der Zukunft das Gesamtüberleben von Neuroblastompatienten verbessern und komplementär zu bereits etablierten Therapieoptionen zur Anwendung kommen. Damit werden Komplikationen von

hochtoxischen Therapieverfahren reduziert und insbesondere die autologe und allogene Stammzelltransplantation im Laufe der Zeit verdrängt. Die bisherigen Erfahrungen mit immuntherapeutischen Ansätzen haben gezeigt, dass ein komplementärer Einsatz mit konventionellen Therapien zur Reduktion der Tumormasse durch chirurgische Maßnahmen, Chemotherapie, Bestrahlung und nuklearmedizinische Maßnahmen zum besten Therapieerfolg führt. Ziel ist es, durch die genannten zielgerichteten Therapien das Gesamtüberleben und die Lebensqualität durch reduzierte Toxizität maßgeblich zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste, solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter. Trotz umfassender Forschung beträgt die Überlebensrate im Hochrisikostadium nur ca. 50%. Neue Strategien sind auf dem Weg, so sollen CAR-T Zellen und bispezifische Antikörper gegen GD2 auf Neuroblastomzellen eine ausreichende Effektorzellantwort mit langfristiger Tumorkontrolle auslösen. Ziel der Arbeit ist es, beide immuntherapeutische Ansätze unter den Gesichtspunkten I.) Aktivierung von Effektorzellen, II.) Proliferation von Effektorzellen, III.) Zytokinausschüttung von Effektorzellen sowie IV.) zytotoxische Wirkung auf GD2-positive NB-Tumorzellen zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden die bispezifischen Antikörper CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 sowie CD3-CD19 als Kontrolle zusammen mit aktivierten T-Zellen sowie CAR-T Zellen gegen drei NB-Zelllinien (LS, LAN-1 und SHSY5Y) untersucht.

Die Experimente ergeben, dass sowohl eine Therapie mit dem bispezifischen Antikörper CD3-GD2 als auch mit CAR-T Zellen zu einer ausreichenden Aktivierung und Proliferation von Effektorzellen führt. Durch Zugabe von CD28-GD2 zu dem CD3-GD2-Antikörper kann eine Steigerung der Proliferation von Effektorzellen erreicht werden, während der Antikörper allein keine Aktivierung und Proliferation hervorruft. CAR-T Zellen schütten signifikant mehr TNF- α , IL-2 und IFN- γ aus im Vergleich zu aktivierten T-Zellen, welche mit bispezifischen Antikörpern inkubiert werden. Die Untersuchung der Zytotoxizität ergibt eine dosisabhängige, zytolytische Wirkung auf NB-Tumorzellen durch beide Therapieansätze. Je höher die E/T-Ratio ist, desto stärker die Lyse. CAR-T Zellen führen im Gegensatz zu bispezifischen Antikörpern auch bei der schwach positiven NB-Zelllinien SHSY5Y zu einer Lyse und Effektorzellaktivierung bei fehlender Proliferationstendenz.

Während CAR-T Zellen das Problem des Zytokinsturmes sowie einer komplexen und teuren Herstellung bergen, weisen bispezifische Antikörper eine geringere Potenz auf. Neuste Studien, welche eine Kontrolle von CAR-T Zellen und somit ihrer Nebenwirkungen erforschen, werden bereits durchgeführt. Doch es fehlt noch an vielen weiteren Untersuchungen, bis die Therapie mit bispezifischen Antikörpern und CAR-T Zellen den Einzug in die First-Line Therapie des Neuroblastoms schafft.

6 Abstract

Neuroblastoma is the most common, solid, extracranial tumor in childhood. Despite recent advances, the survival rate is just about 50% in high-risk patients. New immunotherapeutic strategies are on the way. CAR-T cells and bispecific antibodies against GD2 (diasialogangliosid 2) on Neuroblastoma cells may be capable to induce robust and long-term immune effector cell response. The aim of this work is the comparison of these two immunotherapy strategies with regards to I.) activation of effector cells, II.) proliferation of effector cells, III.) cytokine release and IV.) cytotoxic effects on GD2-positive NB-tumor cells. For this purpose, the bispecific antibodies CD3-GD2, CD28-GD2, CD3-GD2 + CD28-GD2 and CD3-CD19 were investigated in conjunction with activated T cells versus CAR-T cells in three distinct neuroblastoma models utilizing the cell lines LS, LAN-1, SHSY5Y.

The experiments demonstrate that therapy with bispecific CD3-GD2 antibody as well as with CAR-T cells leads to sufficient activation and proliferation of effector cells. By adding CD28-GD2 to the CD3-GD2 antibody, an increase of proliferation of effector cells is detectable, while the antibody alone cannot cause any activation or proliferation. CAR-T cells release significantly more TNF- α , IL-2 and IFN- γ compared to activated T cells incubated with bispecific antibodies. The investigation of cytotoxicity reveals a dose-dependent, cytolytic effect on NB cells for both approaches. At higher E/T-Ratios, NB cell lines were lysed more efficiently. In contrast to bispecific antibodies, CAR-T cells can recognize the GD2-low expressing cancer cell line SHSY5Y. However, no proliferation was induced indicating a limited tumor control.

In summary, both immunotherapeutic approaches are potent treatment approaches for neuroblastoma. While CAR-T cells mainly struggle with cytokine storm, complex production procedures and high costs, bispecific antibodies show lower potency. Recent studies investigating the controllability of CAR-T cells and their side effects are under way, but there are still many more investigations necessary until the therapy with bispecific antibodies and CAR-T cells may achieve standard treatment consideration.

Literaturverzeichnis

- Akhavan, D., Alizadeh, D., Wang, D., Weist, M. R., Shepphird, J. K., & Brown, C. E. (2019). CAR T cells for brain tumors: Lessons learned and road ahead. *Immunol Rev*, 290(1), 60-84.
- Aldoss, I., Bargou, R. C., Nagorsen, D., Friberg, G. R., Baeuerle, P. A., & Forman, S. J. (2017). Redirecting T cells to eradicate B-cell acute lymphoblastic leukemia: bispecific T-cell engagers and chimeric antigen receptors. *Leukemia*, 31(4), 777-787.
- Alvarez-Rueda, N., Desselle, A., Cochonneau, D., Chaumette, T., Clemenceau, B., Leprieur, S., Bougras, G., Supiot, S., Mussini, J. M., Barbet, J., Saba, J., Paris, F., Aubry, J., & Birkle, S. (2011). A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*, 6(9), e25220.
- Armideo, E., Callahan, C., & Madonia, L. (2017). Immunotherapy for High-Risk Neuroblastoma: Management of Side Effects and Complications. *J Adv Pract Oncol*, 8(1), 44-55.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., & Kufer, P. (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, 321(5891), 974-977.
- BD Biosciences, S. J., CA. (2017). Technical Data Sheet: Fixable Viability Stain 780 Retrieved from <https://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/565388.pdf> (letzter Zugriff: 08.02.2021, 14:53)
- Bosse, K. R., Raman, P., Zhu, Z., Lane, M., Martinez, D., Heitzeneder, S., Rathi, K. S., Kendersky, N. M., Randall, M., Donovan, L., Morrissy, S., Sussman, R. T., Zhelev, D. V., Feng, Y., Wang, Y., Hwang, J., Lopez, G., Harenza, J. L., Wei, J. S., Pawel, B., Bhatti, T., Santi, M., Ganguly, A., Khan, J., Marra, M. A., Taylor, M. D., Dimitrov, D. S., Mackall, C. L., & Maris, J. M. (2017). Identification of GPC2 as an Oncoprotein and Candidate Immunotherapeutic Target in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Cell*, 32(3), 295-309 e212.
- Brischwein, K., Parr, L., Pflanz, S., Volkland, J., Lumsden, J., Klinger, M., Locher, M., Hammond, S. A., Kiener, P., Kufer, P., Schlereth, B., & Baeuerle, P. A. (2007). Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J Immunother*, 30(8), 798-807.
- Brise, H. J., McCarville, M. B., Granata, C., Krug, K. B., Wootton-Gorges, S. L., Kanegawa, K., Giammarile, F., Schmidt, M., Shulkin, B. L., Matthay, K. K., Lewington, V. J., Sarnacki, S., Hero, B., Kaneko, M., London, W. B., Pearson, A. D., Cohn, S. L., Monclair, T., & International Neuroblastoma Risk Group, P. (2011). Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology*, 261(1), 243-257.
- Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3(3), 203-216.

- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F., & et al. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, *11*(8), 1466-1477.
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2016). Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*, *127*(26), 3321-3330.
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*, *34*, 45-55.
- Burchill, S. A., Beiske, K., Shimada, H., Ambros, P. F., Seeger, R., Tytgat, G. A., Brock, P. R., Haber, M., Park, J. R., & Berthold, F. (2017). Recommendations for the standardization of bone marrow disease assessment and reporting in children with neuroblastoma on behalf of the International Neuroblastoma Response Criteria Bone Marrow Working Group. *Cancer*, *123*(7), 1095-1105.
- Capasso, M., Devoto, M., Hou, C., Asgharzadeh, S., Glessner, J. T., Attiyeh, E. F., Mosse, Y. P., Kim, C., Diskin, S. J., Cole, K. A., Bosse, K., Diamond, M., Laudenslager, M., Winter, C., Bradfield, J. P., Scott, R. H., Jagannathan, J., Garris, M., McConville, C., London, W. B., Seeger, R. C., Grant, S. F., Li, H., Rahman, N., Rappaport, E., Hakonarson, H., & Maris, J. M. (2009). Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*, *41*(6), 718-723.
- Chatenoud, L. (1993). OKT3-induced cytokine-release syndrome: prevention effect of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody. *Transplant Proc*, *25*(2 Suppl 1), 47-51.
- Chatenoud, L., Ferran, C., & Bach, J. F. (1991). The anti-CD3-induced syndrome: a consequence of massive in vivo cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol*, *174*, 121-134.
- Cheng, M., Santich, B. H., Xu, H., Ahmed, M., Huse, M., & Cheung, N. K. (2016). Successful engineering of a highly potent single-chain variable-fragment (scFv) bispecific antibody to target disialoganglioside (GD2) positive tumors. *Oncoimmunology*, *5*(6), e1168557.
- Cheung, N. K., Cheung, I. Y., Kushner, B. H., Ostrovnya, I., Chamberlain, E., Kramer, K., & Modak, S. (2012). Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol*, *30*(26), 3264-3270.
- Cheung, N. K., & Dyer, M. A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, *13*(6), 397-411.
- Cheung, N. K., Lazarus, H., Miraldi, F. D., Abramowsky, C. R., Kallick, S., Saarinen, U. M., Spitzer, T., Strandjord, S. E., Coccia, P. F., & Berger, N. A. (1987). Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol*, *5*(9), 1430-1440.
- Cheung, N. K., Neely, J. E., Landmeier, B., Nelson, D., & Miraldi, F. (1987). Targeting of ganglioside GD2 monoclonal antibody to neuroblastoma. *J Nucl Med*, *28*(10), 1577-1583.
- Cheung, N. K., Saarinen, U. M., Neely, J. E., Landmeier, B., Donovan, D., & Coccia, P. F. (1985). Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res*, *45*(6), 2642-2649.

- Davis, T. P. (2014). *Pharmacology of the blood brain barrier : targeting CNS disorders* (First edition. ed.). Amsterdam ; Boston : Elsevier/AP.
- Diskin, S. J., Hou, C., Glessner, J. T., Attiyeh, E. F., Laudenslager, M., Bosse, K., Cole, K., Mosse, Y. P., Wood, A., Lynch, J. E., Pecor, K., Diamond, M., Winter, C., Wang, K., Kim, C., Geiger, E. A., McGrady, P. W., Blakemore, A. I., London, W. B., Shaikh, T. H., Bradfield, J., Grant, S. F., Li, H., Devoto, M., Rappaport, E. R., Hakonarson, H., & Maris, J. M. (2009). Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature*, *459*(7249), 987-991.
- Duman, B. B., Sahin, B., Ergin, M., & Guvenc, B. (2012). Loss of CD20 antigen expression after rituximab therapy of CD20 positive B cell lymphoma (diffuse large B cell extranodal marginal zone lymphoma combination): a case report and review of the literature. *Med Oncol*, *29*(2), 1223-1226.
- Eastwood, D., Bird, C., Dilger, P., Hockley, J., Findlay, L., Poole, S., Thorpe, S. J., Wadhwa, M., Thorpe, R., & Stebbings, R. (2013). Severity of the TGN1412 trial disaster cytokine storm correlated with IL-2 release. *Br J Clin Pharmacol*, *76*(2), 299-315.
- Fleurence, J., Fougeray, S., Bahri, M., Cochonneau, D., Clemenceau, B., Paris, F., Heczey, A., & Birkle, S. (2017). Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*, *2017*, 5604891.
- Gargett, T., Yu, W., Dotti, G., Yvon, E. S., Christo, S. N., Hayball, J. D., Lewis, I. D., Brenner, M. K., & Brown, M. P. (2016). GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *24*(6), 1135-1149.
- Giavridis, T., van der Stegen, S. J. C., Eyquem, J., Hamieh, M., Piersigilli, A., & Sadelain, M. (2018). CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*, *24*(6), 731-738.
- Giesecke, C., Kaiser, T. . (2017). Neue Spektren in der Durchflusszytometrie. *Biospektrum*, *23*, 658–661.
- Gonzalez-Amaro, R., Cortes, J. R., Sanchez-Madrid, F., & Martin, P. (2013). Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*, *19*(10), 625-632.
- Grote, S., Mittelstaet, J., Baden, C., Chan, K. C.-H., Seitz, C., Schlegel, P., Kaiser, A., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2020). Adapter chimeric antigen receptor (AdCAR)-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*, *9*(1), 1825177.
- Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., Milone, M. C., Levine, B. L., & June, C. H. (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, *368*(16), 1509-1518.
- Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P., & Baeuerle, P. A. (2009). Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110. *Immunobiology*, *214*(6), 441-453.
- Handgretinger R, H. F., Schlegel P. (2018). *Targeting B7-H3 (CD276) in Neuroblastoma: Generation and In Vitro Evaluation of Different anti-CD276 Antibodies and Immunocytokines*. Abstract presented at: Advances in Neuroblastoma Research, (May 9–12, 2018). San Francisco, CA, USA.

- Hipp, S., Tai, Y. T., Blanset, D., Deegen, P., Wahl, J., Thomas, O., Rattel, B., Adam, P. J., Anderson, K. C., & Friedrich, M. (2017). A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo. *Leukemia*, 31(8), 1743-1751.
- Hof, H. S., D. (2019). *Medizinische Mikrobiologie* (Vol. 7). Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Horn, F. (2020). *Biochemie des Menschen* (Vol. 8. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Hoseini, S. S., Dobrenkov, K., Pankov, D., Xu, X. L., & Cheung, N. K. (2017). Bispecific antibody does not induce T-cell death mediated by chimeric antigen receptor against disialoganglioside GD2. *Oncoimmunology*, 6(6), e1320625.
- Jin, H. J., Nam, H. Y., Bae, Y. K., Kim, S. Y., Im, I. R., Oh, W., Yang, Y. S., Choi, S. J., & Kim, S. W. (2010). GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 67(11), 1845-1858.
- Jo, Y., Ali, L. A., Shim, J. A., Lee, B. H., & Hong, C. (2020). Innovative CAR-T Cell Therapy for Solid Tumor; Current Duel between CAR-T Spear and Tumor Shield. *Cancers (Basel)*, 12(8).
- June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S., & Milone, M. C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 359(6382), 1361-1365.
- Kaatsch P, G. D., Spix, C. (2020). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMEBI) at the University Medical Center Johannes Gutenberg University Mainz*.
- Keyel, M. E., & Reynolds, C. P. (2019). Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy. *Biologics*, 13, 1-12.
- Kholodenko, I. V., Kalinovskiy, D. V., Doronin, I., Deyev, S. M., & Kholodenko, R. V. (2018). Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *J Immunol Res*, 2018, 7394268.
- Kiewe, P., Hasmuller, S., Kahlert, S., Heinrigs, M., Rack, B., Marme, A., Korfel, A., Jager, M., Lindhofer, H., Sommer, H., Thiel, E., & Untch, M. (2006). Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12(10), 3085-3091.
- Kramer, K., Gerald, W. L., Kushner, B. H., Larson, S. M., Hameed, M., & Cheung, N. K. (1998). Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 4(9), 2135-2139.
- Lammie, G., Cheung, N., Gerald, W., Rosenblum, M., & Cordoncardo, C. (1993). Ganglioside gd(2) expression in the human nervous-system and in neuroblastomas - an immunohistochemical study. *Int J Oncol*, 3(5), 909-915.
- Langsdorf, C., Bradford, J., Buller, G., Dolman, N., Gee, K., Kang, H., & Liu, J. (2010). *Functional Characterization of a Novel Fluorescent Dye for Proliferation Analysis*.
- Leone, P., Shin, E. C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., & Racanelli, V. (2013). MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 105(16), 1172-1187.

- Loffler, A., Gruen, M., Wuchter, C., Schriever, F., Kufer, P., Dreier, T., Hanakam, F., Baeuerle, P. A., Bommert, K., Karawajew, L., Dorken, B., & Bargou, R. C. (2003). Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia*, *17*(5), 900-909.
- Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmuller, G., Dorken, B., & Bargou, R. C. (2000). A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*, *95*(6), 2098-2103.
- Lomakina, G. Y., Modestova, Y. A., & Ugarova, N. N. J. B. (2015). Bioluminescence assay for cell viability. *80*(6), 701-713.
- Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J., & Mackall, C. L. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*, *21*(6), 581-590.
- Louis, C. U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Diouf, O., Liu, E., Liu, H., Wu, M. F., Gee, A. P., Mei, Z., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, *118*(23), 6050-6056.
- Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K. M., Guntermann, C., Muller, I., Winkler, E., Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S. J., Hanke, T., & Hunig, T. (2003). Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med*, *197*(8), 955-966.
- Mack, M., Gruber, R., Schmidt, S., Riethmuller, G., & Kufer, P. (1997). Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity. *J Immunol*, *158*(8), 3965-3970.
- Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H., & Brenner, M. K. (2015). A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*, *126*(8), 983-992.
- Maris, J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*, *362*(23), 2202-2211.
- Maris, J. M., Mosse, Y. P., Bradfield, J. P., Hou, C., Monni, S., Scott, R. H., Asgharzadeh, S., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Laudenslager, M., Winter, C., Cole, K. A., Glessner, J. T., Kim, C., Frackelton, E. C., Casalunovo, T., Eckert, A. W., Capasso, M., Rappaport, E. F., McConville, C., London, W. B., Seeger, R. C., Rahman, N., Devoto, M., Grant, S. F., Li, H., & Hakonarson, H. (2008). Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med*, *358*(24), 2585-2593.
- McGinty, L., & Kolesar, J. (2017). Dinutuximab for maintenance therapy in pediatric neuroblastoma. *Am J Health Syst Pharm*, *74*(8), 563-567.
- Mehta, A. K., Gracias, D. T., & Croft, M. (2018). TNF activity and T cells. *Cytokine*, *101*, 14-18.

- Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G., von Schweinitz, D., Simon, T., Cohn, S. L., Pearson, A. D., & Force, I. T. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*, *27*(2), 298-303.
- Mora, J. (2016). Dinutuximab for the treatment of pediatric patients with high-risk neuroblastoma. *Expert Rev Clin Pharmacol*, *9*(5), 647-653.
- Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A. J., Winter, C. L., Rappaport, E., & Maris, J. M. (2004). Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*, *75*(4), 727-730.
- Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M., & Maris, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, *455*(7215), 930-935.
- Mueller, B. M., Romerdahl, C. A., Gillies, S. D., & Reisfeld, R. A. (1990). Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol*, *144*(4), 1382-1386.
- Mukohara, T. (2011). Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci*, *102*(1), 1-8.
- Nagorsen, D., Kufer, P., Baeuerle, P. A., & Bargou, R. (2012). Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther*, *136*(3), 334-342.
- Navid, F., Santana, V. M., & Barfield, R. C. (2010). Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets*, *10*(2), 200-209.
- Nazha, B., Inal, C., & Owonikoko, T. K. (2020). Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front Oncol*, *10*, 1000.
- O'Flynn, K., Russul-Saib, M., Ando, I., Wallace, D. L., Beverley, P. C., Boylston, A. W., & Linch, D. C. (1986). Different pathways of human T-cell activation revealed by PHA-P and PHA-M. *Immunology*, *57*(1), 55-60.
- Picarda, E., Ohaegbulam, K. C., & Zang, X. (2016). Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, *22*(14), 3425-3431.
- Pistoia, V., Morandi, F., Bianchi, G., Pezzolo, A., Prigione, I., & Raffaghello, L. (2013). Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. *Front Oncol*, *3*, 167.
- Pule, M. A., Savoldo, B., Myers, G. D., Rossig, C., Russell, H. V., Dotti, G., Huls, M. H., Liu, E., Gee, A. P., Mei, Z., Yvon, E., Weiss, H. L., Liu, H., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*, *14*(11), 1264-1270.
- Richards, R. M., Sotillo, E., & Majzner, R. G. (2018). CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol*, *9*, 2380.
- Robinson, H. R., Qi, J., Cook, E. M., Nichols, C., Dadashian, E. L., Underbayev, C., Herman, S. E. M., Saba, N. S., Keyvanfar, K., Sun, C., Ahn, I. E., Baskar, S., Rader, C., &

- Wiestner, A. (2018). A CD19/CD3 bispecific antibody for effective immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era. *Blood*, *132*(5), 521-532.
- Rodgers, D. T., Mazagova, M., Hampton, E. N., Cao, Y., Ramadoss, N. S., Hardy, I. R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., Ma, J., Nunez, V., Shen, J., Woods, A. K., Wright, T. M., Schultz, P. G., Kim, C. H., & Young, T. S. (2016). Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(4), E459-468.
- Roland Fuchs, P. S., Tim Brümmendorf. (2013). *Manual Hämatologie* (23. Auflage ed.). Stolberg: Nora-Verlag.
- Saxena, S., Wahl, J., Huber-Lang, M. S., Stadel, D., Braubach, P., Debatin, K. M., & Beltinger, C. (2013). Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One*, *8*(5), e64454.
- Schilling, F. H., Spix, C., Berthold, F., Erttmann, R., Sander, J., Treuner, J., & Michaelis, J. (2003). Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. *Cancer Lett*, *197*(1-2), 19-28.
- Schumacher-Kuckelkorn, R., Volland, R., Gradehandt, A., Hero, B., Simon, T., & Berthold, F. (2017). Lack of immunocytological GD2 expression on neuroblastoma cells in bone marrow at diagnosis, during treatment, and at recurrence. *Pediatr Blood Cancer*, *64*(1), 46-56.
- Schwerdtfeger, M., Benmebarek, M. R., Endres, S., Subklewe, M., Desiderio, V., & Kobold, S. (2021). Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells and T Cell-Engaging Bispecific Antibodies: Different Tools for the Same Job. *Curr Hematol Malign Rep*, *16*(2), 218-233.
- Sedykh, S. E., Prinz, V. V., Buneva, V. N., & Nevinsky, G. A. (2018). Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther*, *12*, 195-208.
- Seitz, C. M., Mittelstaet, J., Atar, D., Hau, J., Reiter, S., Illi, C., Kieble, V., Engert, F., Drees, B., Bender, G., Krahl, A.-C., Knopf, P., Schroeder, S., Paulsen, N., Rokhvarguer, A., Scheuermann, S., Rapp, E., Mast, A.-S., Rabsteyn, A., Schleicher, S., Grote, S., Schilbach, K., Kneilling, M., Pichler, B., Lock, D., Kotter, B., Dapa, S., Miltenyi, S., Kaiser, A., Lang, P., Handgretinger, R., & Schlegel, P. (2021). Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting. *Oncoimmunology*, *10*(1), 2003532.
- Seitz, C. M., Schroeder, S., Knopf, P., Krahl, A. C., Hau, J., Schleicher, S., Martella, M., Quintanilla-Martinez, L., Kneilling, M., Pichler, B., Lang, P., Atar, D., Schilbach, K., Handgretinger, R., & Schlegel, P. (2020). GD2-targeted chimeric antigen receptor T cells prevent metastasis formation by elimination of breast cancer stem-like cells. *Oncoimmunology*, *9*(1), 1683345.
- Siebert, N., Seidel, D., Eger, C., Juttner, M., & Lode, H. N. (2014). Functional bioassays for immune monitoring of high-risk neuroblastoma patients treated with ch14.18/CHO anti-GD2 antibody. *PLoS One*, *9*(9), e107692.
- Simon, T. (2019). S1 Leitlinie: Neuroblastom. *AWMF-Leitlinien-Registernummer 025/008*. Verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-008l_S1_Neuroblastom_2019-07_01.pdf.

- Simon, T., Haberle, B., Hero, B., von Schweinitz, D., & Berthold, F. (2013). Role of surgery in the treatment of patients with stage 4 neuroblastoma age 18 months or older at diagnosis. *J Clin Oncol*, 31(6), 752-758.
- Simon, T., Hero, B., Schulte, J. H., Deubzer, H., Hundsdoerfer, P., von Schweinitz, D., Fuchs, J., Schmidt, M., Prasad, V., Krug, B., Timmermann, B., Leuschner, I., Fischer, M., Langer, T., Astrahantseff, K., Berthold, F., Lode, H., & Eggert, A. (2017). 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klin Padiatr*, 229(3), 147-167.
- Skokos, D., Waite, J. C., Haber, L., Crawford, A., Hermann, A., Ullman, E., Slim, R., Godin, S., Ajithdoss, D., Ye, X., Wang, B., Wu, Q., Ramos, I., Pawashe, A., Canova, L., Vazzana, K., Ram, P., Herlihy, E., Ahmed, H., Oswald, E., Golubov, J., Poon, P., Havel, L., Chiu, D., Lazo, M., Provoncha, K., Yu, K., Kim, J., Warsaw, J. J., Stokes Oristian, N., Siao, C. J., Dudgeon, D., Huang, T., Potocky, T., Martin, J., MacDonald, D., Oyejide, A., Rafique, A., Poueymirou, W., Kirshner, J. R., Smith, E., Olson, W., Lin, J., Thurston, G., Sleeman, M. A., Murphy, A. J., & Yancopoulos, G. D. (2020). A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies. *Sci Transl Med*, 12(525).
- Slaney, C. Y., Wang, P., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2018). CARs versus BiTEs: A Comparison between T Cell-Redirection Strategies for Cancer Treatment. *Cancer Discov*, 8(8), 924-934.
- Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 34(10), 1131-1133.
- Sotillo, E., Barrett, D. M., Black, K. L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., Sussman, R., Lanauze, C., Ruella, M., Gazzara, M. R., Martinez, N. M., Harrington, C. T., Chung, E. Y., Perazzelli, J., Hofmann, T. J., Maude, S. L., Raman, P., Barrera, A., Gill, S., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Allman, D., Jacoby, E., Fry, T., Mackall, C., Barash, Y., Lynch, K. W., Maris, J. M., Grupp, S. A., & Thomas-Tikhonenko, A. (2015). Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*, 5(12), 1282-1295.
- Sterner, R. M., Sakemura, R., Cox, M. J., Yang, N., Khadka, R. H., Forsman, C. L., Hansen, M. J., Jin, F., Ayasoufi, K., Hefazi, M., Schick, K. J., Walters, D. K., Ahmed, O., Chappell, D., Sahmoud, T., Durrant, C., Nevala, W. K., Patnaik, M. M., Pease, L. R., Hedin, K. E., Kay, N. E., Johnson, A. J., & Kenderian, S. S. (2019). GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood*, 133(7), 697-709.
- Stone, J. D., Aggen, D. H., Schietinger, A., Schreiber, H., & Kranz, D. M. (2012). A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs). *Oncoimmunology*, 1(6), 863-873.
- Straathof, K., Flutter, B., Wallace, R., Jain, N., Loka, T., Depani, S., Wright, G., Thomas, S., Cheung, G. W., Gileadi, T., Stafford, S., Kokalaki, E., Barton, J., Marriott, C., Rampling, D., Ogunbiyi, O., Akarca, A. U., Marafioti, T., Inglott, S., Gilmour, K., Al-Hajj, M., Day, W., McHugh, K., Biassoni, L., Sizer, N., Barton, C., Edwards, D., Dragoni, I., Silvester, J., Dyer, K., Traub, S., Elson, L., Brook, S., Westwood, N., Robson, L., Bedi, A., Howe, K., Barry, A., Duncan, C., Barone, G., Pule, M., & Anderson, J. (2020). Antitumor activity without on-target off-tumor toxicity of GD2-chimeric antigen receptor T cells in patients with neuroblastoma. *Sci Transl Med*, 12(571).

- Strohl, W. R., & Naso, M. (2019). Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells. *Antibodies (Basel)*, 8(3).
- Sun, J., Dotti, G., Huye, L. E., Foster, A. E., Savoldo, B., Gramatges, M. M., Spencer, D. M., & Rooney, C. M. (2010). T cells expressing constitutively active Akt resist multiple tumor-associated inhibitory mechanisms. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(11), 2006-2017.
- Sun, S., Hao, H., Yang, G., Zhang, Y., & Fu, Y. (2018). Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *J Immunol Res*, 2018, 2386187.
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., & Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*, 355(10), 1018-1028.
- Suzuki, M., & Cheung, N. K. (2015). Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 19(3), 349-362.
- Suzuki, M., Curran, K. J., & Cheung, N. K. (2015). Chimeric antigen receptors and bispecific antibodies to retarget T cells in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer*, 62(8), 1326-1336.
- Swerts, K., Ambros, P. F., Brouzes, C., Navarro, J. M., Gross, N., Rampling, D., Schumacher-Kuckelkorn, R., Sementa, A. R., Ladenstein, R., & Beiske, K. (2005). Standardization of the immunocytochemical detection of neuroblastoma cells in bone marrow. *J Histochem Cytochem*, 53(12), 1433-1440.
- Tarek, N., Le Luduec, J. B., Gallagher, M. M., Zheng, J., Venstrom, J. M., Chamberlain, E., Modak, S., Heller, G., Dupont, B., Cheung, N. K., & Hsu, K. C. (2012). Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest*, 122(9), 3260-3270.
- Terzic, T., Cordeau, M., Herblot, S., Teira, P., Cournoyer, S., Beaunoyer, M., Peuchmaur, M., Duval, M., & Sartelet, H. (2018). Expression of Disialoganglioside (GD2) in Neuroblastic Tumors: A Prognostic Value for Patients Treated With Anti-GD2 Immunotherapy. *Pediatr Dev Pathol*, 21(4), 355-362.
- Textor, A., Listopad, J. J., Wuhrmann, L. L., Perez, C., Kruschinski, A., Chmielewski, M., Abken, H., Blankenstein, T., & Charo, J. (2014). Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFN γ . *Cancer Res*, 74(23), 6796-6805.
- Tiu, R. V., Mountantonakis, S. E., Dunbar, A. J., & Schreiber, M. J., Jr. (2007). Tumor lysis syndrome. *Semin Thromb Hemost*, 33(4), 397-407.
- Tomolonis, J. A., Agarwal, S., & Shohet, J. M. (2018). Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell Tissue Res*, 372(2), 245-262.
- Trochet, D., Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Deville, A., de Pontual, L., Schleiermacher, G., Coze, C., Philip, N., Frebourg, T., Munnich, A., Lyonnet, S., Delattre, O., & Amiel, J. (2004). Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet*, 74(4), 761-764.
- Turtle, C. J., Hanafi, L. A., Berger, C., Gooley, T. A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T. M., Robinson, E., Steevens,

- N. N., Chaney, C., Soma, L., Chen, X., Yeung, C., Wood, B., Li, D., Cao, J., Heimfeld, S., Jensen, M. C., Riddell, S. R., & Maloney, D. G. (2016). CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 126(6), 2123-2138.
- Turtle, C. J., Hanafi, L. A., Berger, C., Hudecek, M., Pender, B., Robinson, E., Hawkins, R., Chaney, C., Cherian, S., Chen, X., Soma, L., Wood, B., Li, D., Heimfeld, S., Riddell, S. R., & Maloney, D. G. (2016). Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med*, 8(355), 355ra116.
- Vanichapol, T., Chutipongtanate, S., Anurathapan, U., & Hongeng, S. (2018). Immune Escape Mechanisms and Future Prospects for Immunotherapy in Neuroblastoma. *Biomed Res Int*, 2018, 1812535.
- Voeller, J., & Sondel, P. M. (2019). Advances in Anti-GD2 Immunotherapy for Treatment of High-risk Neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 41(3), 163-169.
- Waite, J. C., Wang, B., Haber, L., Hermann, A., Ullman, E., Ye, X., Dudgeon, D., Slim, R., Ajithdoss, D. K., Godin, S. J., Ramos, I., Wu, Q., Oswald, E., Poon, P., Golubov, J., Grote, D., Stella, J., Pawashe, A., Finney, J., Herlihy, E., Ahmed, H., Kamat, V., Dorvilliers, A., Navarro, E., Xiao, J., Kim, J., Yang, S. N., Warsaw, J., Lett, C., Canova, L., Schulenburg, T., Foster, R., Krueger, P., Garnova, E., Rafique, A., Babb, R., Chen, G., Stokes Oristian, N., Siao, C. J., Daly, C., Gurer, C., Martin, J., Macdonald, L., MacDonald, D., Poueymirou, W., Smith, E., Lowy, I., Thurston, G., Olson, W., Lin, J. C., Sleeman, M. A., Yancopoulos, G. D., Murphy, A. J., & Skokos, D. (2020). Tumor-targeted CD28 bispecific antibodies enhance the antitumor efficacy of PD-1 immunotherapy. *Sci Transl Med*, 12(549).
- Ward, N. C., Yu, A., Moro, A., Ban, Y., Chen, X., Hsiung, S., Keegan, J., Arbanas, J. M., Loubeau, M., Thankappan, A., Yamniuk, A. P., Davis, J. H., Struthers, M., & Malek, T. R. (2018). IL-2/CD25: A Long-Acting Fusion Protein That Promotes Immune Tolerance by Selectively Targeting the IL-2 Receptor on Regulatory T Cells. *J Immunol*, 201(9), 2579-2592.
- Warwas, K. M., Meyer, M., Goncalves, M., Moldenhauer, G., Bulbuc, N., Knabe, S., Luckner-Minden, C., Ziegelmeier, C., Heussel, C. P., Zornig, I., Jager, D., & Momburg, F. (2021). Co-Stimulatory Bispecific Antibodies Induce Enhanced T Cell Activation and Tumor Cell Killing in Breast Cancer Models. *Front Immunol*, 12, 719116.
- Williams, M. A., Tzynik, A. J., & Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*, 441(7095), 890-893.
- Wu, J., Fu, J., Zhang, M., & Liu, D. (2015). Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol*, 8, 104.
- Wu, Z. L., Schwartz, E., Seeger, R., & Ladisch, S. (1986). Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*, 46(1), 440-443.
- Xu, H., Cheng, M., Guo, H., Chen, Y., Huse, M., & Cheung, N. K. (2015). Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using Bispecific humanized antibody. *Cancer Immunol Res*, 3(3), 266-277.

- Yanagisawa, M., Yoshimura, S., & Yu, R. K. (2011). Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. *ASN Neuro*, 3(2).
- Yang, Y., Lin, T., Jacoby, E., Qin, H., Gardner, E. G., Chien, C. D., Lee, D. W., III, & Fry, T. J. (2015). CD4 CAR T Cells Mediate CD8-like Cytotoxic Anti-Leukemic Effects Resulting in Leukemic Clearance and Are Less Susceptible to Attenuation By Endogenous TCR Activation Than CD8 CAR T Cells. *Blood*, 126(23), 100-100.
- Yankelevich, M., Kondadasula, S. V., Thakur, A., Buck, S., Cheung, N. K., & Lum, L. G. (2012). Anti-CD3 x anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets. *Pediatr Blood Cancer*, 59(7), 1198-1205.
- Ye, J. N., & Cheung, N. K. (1992). A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int J Cancer*, 50(2), 197-201.
- Yoshida, S., Fukumoto, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., & Furukawa, K. (2001). Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*, 61(10), 4244-4252.
- Yu, A. L., Gilman, A. L., Ozkaynak, M. F., London, W. B., Kreissman, S. G., Chen, H. X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J. G., Matthay, K. K., Shimada, H., Grupp, S. A., Seeger, R., Reynolds, C. P., Buxton, A., Reisfeld, R. A., Gillies, S. D., Cohn, S. L., Maris, J. M., Sondel, P. M., & Children's Oncology, G. (2010). Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*, 363(14), 1324-1334.
- Zhao, Z., Xiao, X., Saw, P. E., Wu, W., Huang, H., Chen, J., & Nie, Y. (2020). Chimeric antigen receptor T cells in solid tumors: a war against the tumor microenvironment. *Sci China Life Sci*, 63(2), 180-205.
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Konrad Reinshagen als meinem Doktorvater für die Bereitstellung des interessanten Themas und herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

An dieser Stelle danke ich auch Prof. Dr. Michael Böttcher für die stets hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Ein außerordentlicher Dank geht an Prof. Dr. Patrick Schlegel, der sich stets die Zeit genommen hat, alle aufkommenden Fragen und Herausforderungen zu bewältigen. Darüber hinaus danke ich für die zur Verfügung gestellten Materialien.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Laia Pagerols Raluy, Dr. rer. nat. Georg Eschenburg, Magdalena Trochimiuk und Birgit Appl für die rege Unterstützung und hilfreichen Ratschläge im Labor bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, welche mir das Studium erst ermöglichten, sowie meinem Bruder, meinem Partner und meinen Freunden für die immer ermutigenden Zusprüche und Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: