

**CD45-Directed CAR-T Cells with CD45 Knockout Efficiently
Kill Myeloid Leukemia and Lymphoma Cells In-Vitro Even
After Extended Culture**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Maraïke Christine Harfmann
aus Eckernförde

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Francis Ayuketang Ayuk
Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Ingo Müller
Vorsitz der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Ingo Müller
Mitglied der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Boris Fehse
Mitglied der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Linda Diehl
Datum der mündlichen Prüfung:	04.11.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Darstellung der Publikation	4
1.1	Einleitung	4
1.2	Material und Methoden	6
1.2.1	Zellkultur	6
1.2.2	Klonierung des CD45-CAR und des retroviralen Vektors	7
1.2.3	Retrovirale Transduktion	7
1.2.4	CRISPR/Cas RNP Herstellung und Transfektion	8
1.2.5	Durchflusszytometrie und Zellsortierung	9
1.2.6	Killing Assays	9
1.2.7	Statistik	10
1.3	Ergebnisse	11
1.3.1	Effizienter CD45-KO in humanen Zelllinien und primären T-Zellen	11
1.3.2	Kombination von CD45CAR-Transduktion und CD45-KO	11
1.3.3	Fratrizid von CD45 ^{pos} T-Zellen durch CD45 ^{ko} CD45CAR-T-Zellen	11
1.3.4	CD45 ^{ko} CD45CAR-T-Zellen killen effizient Ramos B-Zellen	12
1.3.5	Eliminierung humaner AML-Zellen auch nach langer In-vitro-Kultivierung	13
1.3.6	Proliferation und Effektorfunktionen von CD45 ^{ko} CAR-T-Zellen in-vitro	13
1.3.7	CD45 ^{ko} CD19CAR-T-Zellen killen repetitiv in vitro	14
1.4	Diskussion	16
1.4.1	CD45-gerichtete Therapien	17
1.4.2	Ansätze zur Umgehung von Fratrizid	19
1.4.3	CAR-T basierte Myeloablation – Problematik und Lösungsansätze	20
1.4.4	Transiente CAR-Expression	20
1.4.5	Einbau von Safety-Switches	20
1.5	Ausblick	21
1.5.1	Bispezifische Antikörper gegen CD45	21
1.5.2	CD45-NK-Zelllinie	23
2	Publikation	25
4	Zusammenfassung	41
4.1	Englisch	41
4.2	Deutsch	41
5	Literaturverzeichnis	42
6	Abkürzungsverzeichnis	48
7	Abbildungsverzeichnis	50
8	Tabellenverzeichnis	50
9	Erklärung des Eigenanteils	51
10	Eidesstattliche Versicherung	52
11	Danksagung	53

1 Darstellung der Publikation

1.1 Einleitung

Immuntherapien gewinnen in der Hämatologie und Onkologie immer mehr an Bedeutung. Das wachsende Verständnis immunologischer Vorgänge wird genutzt, um die körpereigene Tumorabwehr zu stärken. Die Chimäre Antigen-Rezeptor (CAR)-T-Zelltherapie gehört zu den zellbasierten Immuntherapien und ist inzwischen v.a. bei hämatoonkologischen Erkrankungen der B-Zellreihe relevant. Das Prinzip der CAR-T-Zelltherapie beruht darauf, dass mittels Gentransfer Immuneffektorzellen, insbesondere T- oder NK-Zellen mit einem CAR ausgestattet werden. Der CAR besteht aus mehreren Komponenten, u.a. einem Element zur Erkennung und Bindung an ein Oberflächenantigen auf der Zielzelle. Dabei handelt es sich in der Regel um ein „*single chain variable fragment*“ (scFv). Dieses Antikörperfragment ist gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet, welches auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert wird. Anders als bei der T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelten T-Zellaktivierung, erfolgt die Antigenerkennung und Effektorzellaktivierung ohne Antigenpräsentation über Humane Leukozytenantigene (HLA). Der CAR ist zudem mit intrazellulären Domänen ausgestattet, die durch Signaltransduktion eine Effektorzellaktivierung und -proliferation zur Folge haben (Baker et al., 2023).

Als erste CAR-T-Zelltherapie wurde 2017 Tisagenlecleucel von der Food and Drug Administration (FDA) für die Therapie Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) bei Kindern und jungen Erwachsenen zugelassen (Maude et al., 2018). Seitdem wurde das Anwendungsgebiet auf weitere Malignome der B-Zelllinie ausgeweitet, sodass inzwischen sechs von der FDA zugelassene CAR-Produkte auf dem Markt sind (Stand Februar 2025). Neben ALL wird die CAR-T-Zelltherapie auch bei B-Zell-Lymphomen sowie Multiplem Myelom erfolgreich eingesetzt (Maude et al., 2018, Berdeja et al., 2021, Munshi et al., 2021, Abramson et al., 2020, Schuster et al., 2018, Neelapu et al., 2017). Zielantigene sind die Oberflächenantigene CD19 und *BCMA* (*B-cell maturation antigen*), welche vor allem auf B-Zellen bzw. Plasmazellen exprimiert sind.

Die Anwendungsmöglichkeiten der CAR-T-Zelltherapie sind maßgeblich durch die Identifikation eines geeigneten Zielantigens auf der Oberfläche der Zielzellen (in der Regel Tumorzellen) limitiert. Idealerweise ist ein solches Antigen Tumorzell-spezifisch und nicht auf gesunden Geweben exprimiert bzw. der Verlust gesunder Zellen tolerierbar wie z.B. durch Immunglobulin-Gabe bei Verlust gesunder CD19-positiver B-Zellen.

Stand heute gibt es daher keine zugelassene CAR-T-Zelltherapie für Patienten mit Akuter myeloischer Leukämie (AML). In Studien werden bislang v.a. die AML-assoziierten Antigene CD33 und CD123 getestet, welche durch „*on-target off-tumor*“ Toxizität limitiert sind, da diese auch auf gesunde hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Gewebe exprimiert werden. CD33 ist auch auf Hepatozyten zu finden und steht bei CD33-AK-basierter Therapie im Zusammenhang mit dem sinusoidalen Obstruktionssyndrom SOS (Godwin et al., 2017). Das Antigen CD123 ist ebenfalls auf Endothelzellen exprimiert und Endothelzellschäden spielen eine Rolle beim Zytokinfreisetzungssyndrom sowie beim kapillären Leak-Syndrom (Sun et al., 2019). Sowohl die Antigene CD33, CD123 als auch das in dieser Arbeit untersuchte Zielantigen CD45 sind auf gesunden hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Eine CAR-T-Zelltherapie, welche gegen eines dieser Antigene gerichtet ist, kann entsprechend unerwünscht zu einer Panzytopenie führen, welche ggf. eine Stammzelltransplantation notwendig machen kann.

Als mögliches Zielantigen einer CAR-T-Zell-Therapie für Patienten mit AML wurde in dieser Studie das Protein CD45 untersucht. CD45 wird auf fast allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Somit ist das Protein ein attraktives Ziel für Antigen-gerichtete Therapien für potenziell alle hämatoonkologischen Erkrankungen. CD45 ist auf 85-90% aller ALL und auf fast allen AML-Zellen zu finden, nicht jedoch auf nicht-hämatopoetischen Geweben (Omary et al., 1980, Andres and Kadin, 1983). Allerdings sind auch die Effektorzellen selbst (T- sowie NK-Zellen) CD45-positiv. Somit ist zu erwarten, dass eine CD45-gerichtete CAR-Therapie durch einen sog. Fratrizid („Brudermord“) in ihrer Effektivität stark eingeschränkt ist.

Ein Weg, dies zu umgehen, ist ein CD45-Knockout (KO). Mit Ribonukleinprotein-Komplexen (RNP) bestehend aus rekombinantem Cas9 und *Single Guide RNA* (sgRNA) konnte bereits ein effektives CD45KO in humanen T- und NK-Zellen gezeigt werden (Gundry et al., 2016, Rautela et al., 2020). In jenen Studien wurde jedoch nicht die Funktionalität der CD45KO-Zellen getestet. Aufgrund der beschriebenen zentralen Rolle von CD45 bei Zellaktivierung, Signaltransduktion und Zytotoxizität (Holmes, 2006) war ein negativer Einfluss auf die Effektorfunktionen von T- und NK-Zellen zu erwarten.

Ziel dieser Studie war es, erstmalig ein Protokoll für die Herstellung von CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen zu entwickeln und die so produzierten Zellen auf ihre Funktionalität im Sinne der zytotoxischen Aktivität sowie ihrer Proliferationsfähigkeit zu untersuchen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Zellkultur

Die humanen primären T-Zellen wurden aus *Buffy Coats (BCs)* gesunder Blutspender isoliert. *Buffy Coats* entstehen als Nebenprodukt bei der Vollblutspende und wurden freundlicherweise anonymisiert von Institut für Transfusionsmedizin des UKE zur Verfügung gestellt. Mithilfe von *Secoll Lymphozyten Separationsmedium* (Serana, Pessin, Deutschland) wurden über einen Dichtegradienten periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) isoliert. Diese wurden anschließend mit *T Cell TransAct (TA)* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) für drei Tage nach Herstellerprotokoll aktiviert, um T-Zellen zu erhalten. Zur Kultivierung primären T-Zellen wurde *TexMACS Medium* (Miltenyi Biotec) mit 3% humanem Serum (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 200 U/ml hIL-2 (Proleukin S, Novartis, Basel, Schweiz) verwendet. Bei langer Kulturzeit wurde der Aktivierungsschritt mit *TransAct* nach 14 Tagen wiederholt. Die Kulturbedingungen der Zelllinien und ihre Referenz sind im Folgenden in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Kulturbedingungen und Referenz der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Referenz, Medium und Zusätze
Ramos Ursprung: Burkitt-Lymphom	ATCC, CRL-1596
	RPMI-Medium 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland) mit 100U/ml und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco), 13% hitze-inaktiviertes FCS (Gibco), 25 mM HEPES (Gibco)
KHYG-1 Ursprung: NK-Zell Leukämie	DSMZ, ACC-725
	RPMI 1640 mit 100 U/ml und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 20% FCS, 1% Natriumpyruvat (Gibco), 1 % NEAA (Gibco), 200 U/ml IL-2
PM-1 Ursprung: Sézary Zellen (T-Zell Lymphom)	(Lusso et al., 1995)
	RPMI 1640 mit 100 U/ml und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 10% FCS, 1% Natriumpyruvat
Nos-1FD4 mit / ohne FTL3-Mutation Ursprung: Akute myeloische Leukämie	Horn et al., Manuskript in Vorbereitung
	RPMI 1640 mit 100 U/ml und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 10% FCS, 1% Natriumpyruvat, 1% NEAA, 0,1% β-Mercaptoethanol (Gibco)

	GM-CSF-abhängige Variante (FTL3-Mutation): zusätzlich 5 ng/ml humanes GM-CSF (Peprotech/ThermoFisher Scientific)
HEK293T-Zellen	ATCC CRL-3216
Ursprung: Humane embryonale Niere	DMEM Glutamax (Life Technologies, Carlsbad, USA) mit 100 U/ml und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 10% FCS

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert.

1.2.2 Klonierung des CD45-CAR und des retroviralen Vektors

Zur Transduktion der T-Zellen mit dem CD45-CAR wurde ein retroviraler Vektor verwendet, welcher zuvor mithilfe rekombinanter DNA-Techniken (Weber et al., 2008) kloniert wurde. Als Grundlage wurde ein bereits veröffentlichtes CAR-Konstrukt der dritten Generation genutzt (Hambach et al., 2020). Die CD45-Erkennungssequenz für das scFv-Fragment wurde von dem murinen anti-human CD45-Antikörper (AK)-Klon BC8 abgeleitet (Lin et al., 2006). Zu den weiteren Bestandteilen gehört die Transmembranregion (TM), sowie die kostimulatorischen Domänen CD28 und 4-1BB, welche an eine CD3ζ-Signaldomäne geknüpft wurden. Zwischen TM und scFv befindet sich zudem ein sog. *Spacer* (Abstandshalter). In dieser Studie wurden zwei Spacer mit unterschiedlicher Länge eingesetzt. Der kürzere ist abgeleitet vom CD28-Protein und der längere vom Immunglobulin IgG4 inklusive der Fc-Region mit CH2 und CH3-Domäne, die Spacer werden im Verlauf als CD28c und h23c bezeichnet. Die CAR-Sequenz wurde in den γ-retroviralen Vektor pRSF91.iB.pre*-Puro+ stromaufwärts der *IRES* (*internal ribosome entry site*) einkloniert (Hambach et al., 2020). Stromabwärts der *IRES* befinden sich kodierende Regionen für ein blau-fluoreszierende Protein (BFP) und eine Puromycin-Resistenz, welche eine spätere Selektion reiner CAR-positiver Zellkulturen über Puromycinzugabe im Kulturmedium ermöglicht.

1.2.3 Retrovirale Transduktion

Zur Herstellung retroviraler Vektorpartikel wurden HEK293T-Zellen mit der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert (Mirow et al., 2021). Dabei wurden die Partikel mit dem Hüllprotein (*envelope*) des *Gibbon-ape leukemia virus* (GALV)-pseudotypisiert und nachfolgend über Zentrifugation konzentriert.

Primäre T-Zellen wurden für drei Tage mit TA aktiviert (s. 1.2.1) und anschließend auf *RetroNectin* (RN, Takara Bio, Europe AB, Göteborg, Schweden) transduziert. Für eine effektive Transduktion wurden 6-well Suspensionsplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit RN nach Protokoll des Herstellers beschichtet. Anschließend wurde *TexMACS* zusammen mit vektorhaltigem Überstand in einem Gesamtvolumen von 1 ml hinzugefügt, die MOI (engl. *multiplicity of infection*) betrug dabei 10. Nachfolgend wurden die Platten für 1 h bei mit 1000 x g und 4°C zentrifugiert, um das *RetroNectin* mit den Vektorpartikeln zu beladen. Nach Entfernung des Mediums wurden 1×10^6 aktivierte primäre T-Zellen in 2 ml T-Zell-Medium hinzugefügt. Schließlich wurden die transduzierten T-Zellen nach 24 h Inkubation bei 37°C vorsichtig von der Platte geerntet.

1.2.4 CRISPR/Cas RNP Herstellung und Transfektion

Die T-Zellen von BC#3 wurden wie bereits beschrieben drei Tage vor Elektroporation mit TA aktiviert. Für alle nachfolgenden Experimente wurde dem Protokoll ein zusätzlicher Schritt hinzugefügt. An Tag 3 nach TA-Aktivierung wurden die T-Lymphozyten auf RN-beschichteten Platten ausgesät und 24 h später folgte der Elektroporations-Schritt.

Für die Herstellung eines *CRISPR-Cas9-sgRNA* RNP wurde das Cas9 Protein *TrueCut v2* (ThermoFisher Scientific) mit einer auf das CD45-Gen gerichteten *sgRNA* (Zielsequenz GGCTTAAACTCTTGGCATTGG“) in einem PCR-Tube gemixt. Das molare Verhältnis von Cas9 und *sgRNA* wurde in einem Volumen von ca. 2 µl auf 1:2,5 eingestellt. Die RNP-Mixtur wurde anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden die Zellen einmalig mit einem Zentrifugationsschritt (310 x g, 5 min, RT) gewaschen und anschließend auf eine Zellkonzentration von 4×10^5 / 15 µl *OPTI-MEM* (Gibco) eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 15 µl zu den bereits gebildeten RNP-Komplexen gegeben, kurz gemischt und zügig ohne die Bildung von Luftblasen in eine 1mm Küvette pipettiert. Die RNP-Zellmixtur wurde mit dem *GenePulser Xcell* (BioRad, München, Deutschland) elektroporiert. Die Elektroporationsbedingungen variierten je nach Zellart und sind in Tabelle 2 Elektroporationsbedingungen dargestellt. Anschließend wurden die Zellen mithilfe ihres entsprechenden Zellmediums aus der Küvette geborgen und in einer 24-well Suspensionsplatte in 1 ml Medium kultiviert.

Tabelle 2 Elektroporationsbedingungen

Zellart	Spannung [V]	Pulsform	Pulslänge [ms]	Pulsanzahl	Pause [ms]
Primäre T-Zellen	90	Square-wave	10	3	0,1
KHYG-1	75				
PM-1	85		5		

1.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Für die Durchflusszytometrie (DFZ) und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) wurden die Geräten *FACSCanto II* und *FACS Aria IIIu* (beides BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) genutzt. Vor beiden Verfahren wurden die Zellen mittels Zentrifugation gewaschen (310 x g, 5 min, RT) und in ca. 250 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit *FITC*- oder *VioBlue*-gekoppelten anti-humanen monoklonalen *REAffinity* CD45-Antikörpern (Miltenyi Biotec) nach Herstellerprotokoll gefärbt und ungefärbte Zellen zur Kontrolle eingesetzt. DFZ-Daten wurden mit der Software *FlowJo 10* (BD Biosciences) analysiert und dargestellt.

Mithilfe magnetischer Zellsortierung (MACS) wurden CD45-positive und CD45^{ko}/CD19CAR-T-Zellen drei Tage nach CD45KO-Elektroporation separiert. Hierfür wurden die Zellen mit CD45(*TIL*) *MicroBeads* (Miltenyi) den Herstelleranweisungen folgend markiert und über MACS-Säulen in die beiden Fraktionen CD45^{pos} und CD45^{ko} sortiert. Die erfolgreiche Sortierung wurde nach 24 h mittels DFZ bestätigt.

1.2.6 Killing Assays

Die zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen wurde in Luciferase-basierten Assays untersucht. Als Zielzellen wurden Ramos und Nos-1FD4 eingesetzt, deren Oberflächenexpression von CD45 vorher mit AK-Färbung und DFZ geprüft wurde.

Zur Herstellung von Ramos^{Luc} und Nos-1FD4^{Luc} wurden parenterale Zellen mit dem Vektor LeGO-Luc2-iG2-Puro+ transduziert, welcher von Dr. Kristoffer Rieken freundlicherweise nach üblicher Methode hergestellt und zur Verfügung gestellt wurde (Weber et al., 2008). Durch Zugabe von 1 µg/ml Puromycin (Merck) in das Kulturmedium konnte eine reine Luciferase-exprimierende Zellkultur hergestellt werden. Hierdurch war es möglich, die Vitalität der Luc2⁺ Zellen nach Zugabe von Luciferin mithilfe eines Biolumineszenz-Plattenlesegeräts zu ermitteln.

Für die Killing Assays wurden Ziel- und Effektorzellen gezählt und in weißen 96-*well* *OptiPlate* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) zusammen ausgesät. 10.000 Zielzellen wurden in 100 μ l/*well* in Effektorzellmedium ausgesät. Die Effektorzellen wurden in unterschiedlichen Effektor-Zielzell-Verhältnissen (E:T) hinzugegeben. Die *wells* wurden mit Effektorzellmedium auf ein Totalvolumen von 200 μ l aufgefüllt und die Zellen für 4 h bei 37°C kokultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen in den Platten bei 1000 x g (5 min, RT) pelletiert. 100 μ l des zellfreien Überstandes konnten danach vorsichtig mit einer Mehrkanal-Pipette entfernt werden. *D-Luciferin Firefly* (Biosynth, Staad, Schweiz), verdünnt in PBS (16 ng in 100 μ l BPS), wurde hinzugefügt und die Platten für 20 min im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die Biolumineszenz-Intensität mithilfe des Plattenlesers *Infinite 200 pro* (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit 2000 ms Integrationszeit gemessen.

1.2.7 Statistik

GraphPad PRISM (Version 9) wurde für die Erstellung von Graphen und statistische Analysen eingesetzt. Dabei wurde der statistische Test 2-way ANOVA angewendet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die Signifikanzniveaus waren wie folgt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Effizienter CD45-KO in humanen Zelllinien und primären T-Zellen

Das CD45-KO wurde an den Zelllinien PM-1 (T-Zellen) und KHYG-1 (NK-Zellen) getestet. Hier zeigte sich eine grundsätzliche Funktionalität unserer gewählten Knockout-Methode, wenn auch mit geringer KO-Effizienz von unter 10%. Mittels FACS-Sortierung wurden je eine CD45^{neg} PM-1 sowie KHYG-1-Zelllinie etabliert, welche eine normale Proliferationsfähigkeit aufwiesen. Bei den primären T-Zellen konnte das CD45-Protein mit gleicher Methode deutlich effizienter ausgeknockt werden. 7 Tage nach Elektroporation waren durchschnittlich 51,7% ($\pm$ 4,5%) Zellen CD45^{neg}, vgl. Figure 2C der dieser Schrift zugrundeliegenden Publikation (Harfmann et al., 2024), welche ebenfalls die Quelle der folgenden Abbildungsverweise ist. Die CD45^{ko} T-Zellen von drei unterschiedlichen Spendern (BC#13-#15) wurden zusammen mit den nicht-editierten CD45^{pos} T-Zellen desselben Spenders über 17 Tage kokultiviert. Anders als erwartet, zeigte sich für die CD45^{ko} T-Zellen kein Proliferationsnachteil, dargestellt in Figure 2D.

1.3.2 Kombination von CD45CAR-Transduktion und CD45-KO

Für die Herstellung von CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen wurden die CD45KO-Elektroporation mit der Transduktion mit dem Vektor CD45CAR_CD28c_GALV kombiniert. Hierfür wurden unterschiedliche Protokolle getestet, wobei Reihenfolge und Abstand (24 h bis 7 Tage) der beiden Schritte variierten. Zwei der Protokolle, nachfolgend P1 und P2 genannt, sind in Tabelle 3 kurz zusammengefasst. Weitere Protokolle führten zu einer zu geringen Zellzahl doppelt-editierter T-Zellen und werden daher nicht weiter erläutert.

Tabelle 3 Zeitlicher Ablauf der Protokolle P1 und P2

Protokoll	Gewinnung und Aktivierung T-Zellen	Schritt 1	Pause	Schritt 2
P1	3 Tage vor Schritt 1	CD45-CAR Transduktion	24 h	CD45KO-Elektroporation
P2		CD45KO-Elektroporation	3 Tage	CD45-CAR Transduktion

1.3.3 Fratrizid von CD45^{pos} T-Zellen durch CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen

Nach erfolgreicher Herstellung von CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen wurden diese kultiviert und im Verlauf wiederholt mittels DFZ auf CAR- sowie CD45-Expression untersucht.

Überraschenderweise, konnte hier bereits im ersten Versuch mit BC#4 eine deutliche Reduktion der verbliebenen CD45^{pos} T-Zellen beobachtet werden, dargestellt in Figure 4A und 4B. Fünf Tage nach CD45KO-Elektroporation waren nur noch 16,6% der T-Zellen CD45^{pos} und weitere 48 h später nahezu verschwunden (0,9%). Dieser Effekt konnte in wiederholenden Experimenten mit T-Zellen unterschiedlicher Spender (BC#13-#15) bestätigt werden (Figure 4C).

Damit wurde die Funktionalität und Spezifität des CD45-CARs sowie die zytotoxische Wirksamkeit von CD45^{ko}CD45CAR-T Zellen gezeigt.

1.3.4 CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen killen effizient Ramos B-Zellen

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen in Luciferase-basierten Killing Assays mit der B-Zell-Leukämiezelllinie Ramos als Zielzellen getestet. Die CD45-Expression der Ramos-Zellen wurde zuvor per DFZ bestätigt. Es wurden CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen mit zwei unterschiedlichen Spacern, CD28c und h23c, als Effektorzellen eingesetzt. Auch im Luciferase-Assay killten die CD45CAR-T-Zellen effektiv ihre Zielzellen. Bereits nach 4 h gemeinsamer Inkubation waren bei einer Effektor-Target-Verhältnis (E:T) von 10 zu 1 bis zu 43,7% der Ramos-Zellen eliminiert (Figure 5A). Dabei waren der CAR mit dem kürzeren CD28c-Spacer in wiederholten Versuchen dem längeren h23c numerisch leicht überlegen.

Wie in 1.3.2 beschreiben wurden unterschiedliche Protokolle zur Herstellung der CD45CAR-T-Zellen miteinander verglichen. Dabei zeigten sich einige Protokolle bereits im Herstellungsprozess als ungeeignet, da eine zu geringe Zahl an T-Zellen den Prozess überlebten bzw. doppelt-modifiziert waren. Die zwei Protokolle P1 und P2 führten schließlich zu einer ausreichenden Anzahl CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen und wurden in einem weiteren Luciferase-Killing-Assay verglichen. Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Protokollen, mit Ausnahme der E:T 5:1 (Figure 5B), bei dem das Protokoll P1 mit bis zu 79,8% Killing effektiver die Targetzellen eliminierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf P1 als Standardherstellungsprotokoll verwendet.

Anschließend wurden die CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen auf ihre zytotoxische Aktivität nach längerer Kulturzeit getestet. Nach 22 Tagen In-vitro-Kulturzeit konnte erneut ein effektives Killen der Ramos-Zellen zu beobachtet werden (Figure 5C).

Zusammenfassend wurde in Killing Assays mithilfe der T-Zellen unterschiedlicher gesunder Blutspender wiederholt die Funktionalität von CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen nachgewiesen.

1.3.5 Eliminierung humaner AML-Zellen auch nach langer In-vitro-Kultivierung

Um der Anwendung von CD45CAR-T Zellen bei AML-Patienten in vitro näher zu kommen, wurde die in unserem Labor entwickelte AML-Zelllinie Nos-1FD4 (Horn et al., Manuskript in Vorbereitung) als Zielzelle in Killing-Assays eingesetzt. CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen wurden mit GFP-exprimierenden Nos-1FD4-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 kokultiviert und der jeweilige Zellanteil über GFP-Detektion (DFZ) im Zeitverlauf dokumentiert. In der Kontrollkultur von untransduzierten T-Zellen und AML-Zellen war nach 42 h der Anteil der AML-Zellen erhöht. Im Gegensatz dazu war im CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen-Ansatz der Anteil der CD45CAR-T-Zellen deutlich höher, woraus ein Wachstumsvorteil der CD45CAR-T-Zellen bzw. ein Killing Effekt gegenüber den AML-Zellen geschlossen werden kann. Nach 70 h waren die Nos-1FD4 nahezu vollständig eliminiert (Figure 6A), womit die zytotoxische Wirksamkeit der CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen auch gegen AML-Zellen gezeigt wurde.

Zur Bekräftigung dieser Ergebnisse wurde erneut ein Luciferase-Assay hinzugezogen. Die CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen eines anderen Blutspenders (BC#14) waren zum Zeitpunkt des Assays bereits 30 Tage in vitro kultiviert. Schon nach 4 h Inkubationszeit mit Nos-1FD4-Luc-gfp+ waren bis zu 60% der AML-Zellen eliminiert (Figure 6B).

Damit wurde die In-vitro-Langzeit-Effektorfunktion der CD45^{ko}CD45CAR-T-Zellen anhand von zwei CD45^{pos} Zelllinien gezeigt, die unterschiedliche Malignitäten repräsentieren (Burkitt-Lymphom und AML).

1.3.6 Proliferation und Effektorfunktionen von CD45^{ko}CAR-T-Zellen in-vitro

Anschließend galt es herauszufinden, ob das Knockout von CD45 einen Einfluss auf Proliferation und Effektorfunktionen der mit einem CAR modifizierten T-Zellen hat. Aufgrund des Fratrizides bei CD45^{pos}CD45CAR-T-Zellen musste hierfür ein Modell mit CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen entworfen werden. Die CD19CAR-T-Zellen von drei unterschiedlichen Blutspendern (BC#21-#23) wurden wie zuvor die CD45CAR-T-Zellen mit Protokoll P1 hergestellt und anschließend in eine CD45^{ko} und CD45^{pos} Fraktion mit magnetischer Zellsortierung (MACS) separiert. Beide Gruppen wurden parallel mit CD19^{pos} Ramos-gfp+ Zellen in einem E:T-Verhältnis von 1:5 kokultiviert

und die CAR-T-Zellzahl über eine Woche bestimmt (Figure 7A). Während die T-Zellen der jeweiligen Spender sehr unterschiedliche Wachstumskinetiken zeigten, wurden für die individuellen Spender im direkten Vergleich keine Unterschiede bei der Proliferation der CD45^{ko} vs. CD45^{pos} CD19CAR-T-Zellen beobachtet. Anders als zuvor vermutet, ergab sich durch die Abwesenheit des CD45-Proteins kein negativer Effekt auf das Proliferationsvermögen der CD19CAR-T-Zellen. Für eine Beurteilung der zytotoxischen Aktivität in den beiden Gruppen wurde die Rate an GFP-positiven Ramos-Zellen Ramos über DFZ ermittelt. Trotz des geringen E:T-Verhältnisses von 1:5 waren die CD19CAR-T-Zellen in der Lage, die Ramos-Zellen innerhalb der 7 Tage zu eliminieren. Erneut zeigte sich kein Unterschied zwischen der CD45^{ko} und CD45^{pos} Gruppe (Figure 7B). Dieses Ergebnis konnte in einem 4h-Luciferase-Assay an Tag 30 der Kultur bestätigt werden (Figure 7C).

Somit hatte das CD45-KO im direkten In-vitro-Vergleich keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die zytotoxische Aktivität von CD19CAR-T-Zellen.

1.3.7 CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen killen repetitiv in vitro

Abschließend wurden die CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen auf die Frage hin untersucht, ob sie auch bei mehrfacher Exposition mit Target-Zellen zytotoxisch wirksam sind. Die CD45^{pos} und CD45^{ko} CD19CAR-T Zellen aus dem vorherigen Experiment (BC#21-#23) wurden mit *TransAct* oder CD19^{pos}Ramos-gfp+ Zellen stimuliert. In der ersten Stimulationsrunde wurden die Ramos-Zellen im Verhältnis 5:1 (E:T) hinzugegeben. Da die CAR-T-Zellen hier innerhalb von 48 h alle Zielzellen zügig eliminiert hatten, wurden in der zweiten Re-Stimulationsrunde ein E:T von 1:5 gewählt, um einen Überschuss an Zielzellen zu gewährleisten. Sowohl CD45^{pos} als auch CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen wurden zur Proliferation angeregt und wuchsen stärker als die CAR-T-Zellen in der *TransAct*-restimulierten (Kontroll-)Gruppe. Der relative Anteil CD19CAR^{pos} T-Zellen verhielt sich unterschiedlich je nach gewählter Restimulationsmethode. Anders als in der *TransAct*-Gruppe konnte hier unabhängig von der CD45-Expression ein deutlicher Anstieg der CAR^{pos} Zellen in der Ramos-stimulierten Kultur beobachtet werden (Figure 8C). Zudem killten die CD19CAR-T-Zellen, ebenfalls unabhängig ihrer CD45-Expression, die Ramos-Zellen ungeachtet des geringen E:T-Verhältnisses nahezu vollständig innerhalb von 72 h (Figure 8D). Im anschließend durchgeführten Luciferase-Assay waren die mehrfach re-stimulierten CAR-T-Zellen im Vergleich zum vorherigen Versuch stärker zytotoxisch aktiv und killten unabhängig von CD45-

Expression und vorheriger Re-Stimulationsmethode ca. 90% der Zielzellen innerhalb von 4 h (Figure 8E). Nachfolgend wurden die mit T-Zell-Erschöpfung in Verbindung stehenden Oberflächenmarker PD-1 und TIM3 in DFZ nach AK-Färbung gemessen. Auch hier konnte kein Unterschied im Vergleich der CD45^{pos} mit der CD45^{ko} Gruppe festgestellt werden (Figure 8F).

Zusammenfassend waren die CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen in der Lage, mehrfach hintereinander effektiv in vitro zu killen und wiesen anschließend phänotypisch keine Anzeichen einer T-Zell-Erschöpfung auf.

1.4 Diskussion

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) ist die Standardkonsolidierungstherapie bei fitten AML-Patienten mit hohem Rezidivrisiko (Röllig et al., 2023) und ist aktuell die einzige kurative Therapieoption für Patienten mit Chemotherapie-refraktärer AML. Patienten müssen vor der Transplantation mit sog. Konditionierungsregimen vorbereitet werden, um maligne Zellen und gesunde Immunzellen des Empfängers zu eliminieren und somit ein Engraftment (Anwachsen) der Stammzellen und eine Heilung der Leukämie zu ermöglichen. Die myeloablative Standard-Konditionierung (MAC) ist stark toxisch und ein Hauptfaktor der Transplantations-assoziierten Mortalität (TRM). Daher wurden Regime mit reduzierter Intensität (*reduced intensity conditioning, RIC*) etabliert, v.a. für Patienten, für die eine myeloablative Konditionierung aufgrund von Alter oder Vorerkrankungen nicht in Frage kommen (Shimoni et al., 2024). In den letzten Jahren wurden immer mehr Konditionierungsprotokolle mit reduzierter Toxizität etabliert, sodass von der *EBMT* (*European Society for Blood and Marrow Transplantation*) ein neuer Score zur Messung der Konditionierungsintensität (*TCI*) veröffentlicht wurde. In retrospektiven Analysen zeigt sich sowohl bei Vergleich der *TCI*-Gruppen als auch nach der alten *RIC/MAC*-Einteilung kein signifikanter Effekt auf der Gesamtüberleben (OS) der untersuchten AML-Patienten. Die geringere Toxizität führt zu einer geringeren *TRM*, erhöht jedoch auf der anderen Seite das Rezidivrisiko (Spyridonidis et al., 2020).

Vor allem bei Patienten mit fortgeschrittenerer Erkrankung, ungünstiger Molekulargenetik oder Zytogenetik und / oder nicht vollständiger Remission zum Zeitpunkt der Transplantation sind die Rezidivraten sehr hoch, selbst im myeloablativem Konditionierungssetting (Gyurkocza et al., 2010). Rezidive sind mit ca. 40% Vorkommen der häufigste Grund für ein Therapieversagen der SZT bei AML (Horowitz et al., 2018, Tsirigotis et al., 2016). Cornelissen et al zeigten in einer vergleichenden Analyse Rezidivraten von bis zu 68% innerhalb der ersten 5 Jahre nach allo-SZT bei Patienten mit monosomalem Karyotyp, während Patienten mit normaler Zytogenetik in 23% der Fälle rezidierten (Cornelissen et al., 2012). Der *MRD*-Status (Minimale Resterkrankung) stellt einen unabhängigen Prognosefaktor dar und hatte in der mittleren Risikogruppe nach ELN (European Leukemia Network) 2017 den größten prognostischen Wert (Jentzsch et al., 2022). Die Prognose von AML-

Patienten mit Rezidiv nach allo-SZT ist sehr ungünstig mit einem 2-Jahresüberleben von unter 20% (Tsirigotis et al., 2016).

Eine intensive aber gleichzeitig zielgerichtete Tumorzellelimination und Immunsuppression im Rahmen der Konditionierung vor SZT könnte das Rezidivrisiko der Patienten reduzieren, ohne das Risiko für transplantationsassoziierte Komplikationen zu erhöhen und dadurch mehr Patienten die Chance einer Heilung ermöglichen.

1.4.1 CD45-gerichtete Therapien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Idee einer CD45-gerichteten zytotoxischen Therapie unter Verwendung von CD45CAR-T-Zellen untersucht. Die Funktionalität dieses Ansatzes konnte in vitro im Sinne eines *Proof-of-Principle* erfolgreich demonstriert werden.

Das breite Spektrum der Immuntherapien bietet zahlreiche Möglichkeiten für Antigen-gerichtete Therapien. Einige davon wurden im Zusammenhang mit CD45 bereits untersucht und werden im Folgenden erläutert.

Zusätzliche Therapieansätze, die im Rahmen dieses Projekts entwickelt wurden, werden in dem Kapitel 1.5 (Ausblick) vorgestellt.

In mehreren Studien wurden Antikörper-gebundene Radionuklide als CD45-gerichtete Konditionierungstherapie untersucht.

In klinischen Phase-1-Studien wurde Yttrium-90(Y90)-markierte CD45-Antikörper in der Konditionierungstherapie vor allogener Stammzelltransplantation (SZT) bei Hochrisikopatienten mit Multiplem Myelom (Tuazon et al., 2021), AML und Myelodysplastischen Syndromen (MDS) eingesetzt (Vo et al., 2020). Andere Gruppen verwendeten 131-Iod(I) (Pagel et al., 2006, Pagel et al., 2009). 131-I weist eine hoch-energetische Gamma-Komponente auf, die eine Isolation der Patienten zum Schutz anderer Menschen notwendig und damit die Behandlung schwer umsetzbar macht. Eine randomisierte kontrollierte Phase-3-Studie zeigte ein erfolgreiches Engraftment nach 131-I/Fludarabin/2Gy-TBI Konditionierung Patienten mit rezidivierter/refraktärer AML (Gyurkocza et al., 2021). Daten zur abschließenden Bewertung dieser Methode stehen jedoch noch aus.

Einen weiteren Ansatz stellen Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) dar. In Mausmodellen konnte mit unterschiedlichen CD45-gerichteten ADCs ein nachhaltiges Engraftment von Spenderstammzellen erreicht werden (Saha et al., 2022, Palchaudhuri et al., 2016, Srikanthan et al., 2020).

Die CD45CAR-T-Zell-Strategie wurde parallel von einer anderen Arbeitsgruppe verfolgt und die Ergebnisse kurz vor Einreichung der oben dargestellten Publikation veröffentlicht. Wellhausen et al. zeigten, dass CD45-Epitop-editierte CD45CAR-T-Zellen, Tumorzellen in einem AML-Xenograft-Mausmodell effektiv eliminieren. In einem 24h-Killing Assay in vitro wiesen CD19CAR-T-Zellen mit und ohne CD45KO ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in ihrer Zytotoxizität auf. Im Xenograft-Maus-Modell hingegen konnten die CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen im Gegensatz zu den CD19CAR-T-Zellen ohne CD45-KO das Tumorstadium nicht kontrollieren. Dabei ließen sich im peripheren Blut der Mäuse signifikant weniger CAR-T-Zellen nachweisen, was auf eine defiziente In-vivo-Expansion bzw. -Persistenz der CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen in jener Studie hindeutete (Wellhausen et al., 2023).

In meiner Arbeit wurden die CD45^{ko}CD19CAR-T-Zellen auch in Langzeit-in-vitro-Assays getestet. Auch nach einer Kulturzeit von 30 Tagen zeigte sich eine gleichwertige Proliferation und Zytotoxizität im Vergleich zu den CD45^{pos}CD19CAR-T-Zellen (vgl. 1.3.6). Zudem waren beide Zellpopulationen gleichermaßen fähig, wiederholt die CD19^{pos}-Ramos Zellen zu eliminieren (vgl. 1.3.7).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zur Arbeit von Wellhausen et al. ergibt sich aus der Wahl des CAR-Konstrukts. In meiner Arbeit wurde ein CAR der 3. Generation mit 4-1BB und CD28-Kostimulation verwendet, während Wellhausen et al. einen CAR der 2. Generation mit alleiniger 4-1BB-Kostimulation nutzten. CAR-T-Zellen der neueren Generationen haben in-vivo gesteigerte Proliferation, Tumorelimination und Persistenz gezeigt (Zhong et al., 2010, Zhao et al., 2015). Die Art der Kostimulation hatte dabei einen direkten Effekt auf die CAR-T-Zell-Kinetik. CD28-kostimierte CD19CAR-T-Zellen killten im Mausmodell schneller, 4-1BB-kostimierte persistierten dafür länger. CAR-Ts der 3. Generation mit beiden kostimulatorischen Domänen (1928z41BBL) haben die im Tiermodell potenziell die größte therapeutische Effizienz und erzielten, im Vergleich zu den CARs der 2. Generation, die höchste Tumorelimination und Langzeit-Remissions-Rate im ALL-Xenograftmodell (Zhao et al., 2015).

Demzufolge können die In-vivo-Ergebnisse von Wellhausen et al. nicht direkt auf CD45^{ko}CAR-T-Zellen der 3. Generation übertragen werden. Es sind weitere In-vivo-Experimente notwendig, um den Einfluss des CD45-KO auf die Effektorzellen im Mausmodell zu testen und die Wirksamkeit von CD45^{ko}CD45-CAR-T-Zellen in vivo zu prüfen.

1.4.2 Ansätze zur Umgehung von Fratrizid

Um negative Effekte durch eine vollständige CD45-Protein-Entfernung zu umgehen, hat die Gruppe um Wellhausen zur Gewinnung effektiver CD45CAR-T-Zellen ein sog. „*Epitope base editing*“ durchgeführt. Nach Identifikation der BC8-Bindungsregion im CD45-Protein wurden gezielt mit Hilfe eines *CRISPR-Cas9 Base Editor Tripletts* (Codons), die für einzelne Aminosäuren kodieren, modifiziert, sodass bei erhaltener Funktionalität das CD45-Protein nicht mehr über den vom BC8-Klon abgeleiteten scFv erkannt wird. Diese CD45-editierten CD45CAR-T-Zellen eliminierten effektiv AML-Zellen in vitro sowie in vivo in einem AML-Xenograft-Modell (Wellhausen et al., 2023). Es wurden bereits verschiedene Methoden zur Verhinderung von Fratrizid angewendet, um CAR-Therapien gegen unterschiedliche auf T-Zellen exprimierte Antigene zu ermöglichen (Alcantara et al., 2018). Präklinisch konnten CD5-CAR-T-Zellen über ein sog. *Tet-OFF*-System normal expandiert werden, indem durch Zugabe von Doxycyclin die CAR-Expression in vitro stark reduziert wurde. Anschließend vermittelten die CD5CAR-T-Zellen in Abwesenheit von Doxycyclin im T-Zellleukämie-Xenograft-Modell eine verbesserte Leukämiekontrolle, die zu einem längeren Mausüberleben führte. Diese Methode bietet die Möglichkeit einer Ex-vivo-CAR-T-Zell-Expansion ohne zusätzliche genetische Modifikation (Mamonkin et al., 2018).

Um eine CD7-gerichtete CAR-T-Zelltherapie bei T-ALL zu ermöglichen, wurden neben dem *CRISPR-Cas9*-vermittelten CD7-KO in klinischen Phase-I-Studien eine Baseneditierung sowie eine Proteinblockade (PEBL) eingesetzt. Bei PEBL ankert ein scFv CD7 intrazellulär und verhindert damit die Expression des Proteins auf der Oberfläche. Präklinisch gibt es zudem Versuche, CD7 mit einem anti-CD7-AK extrazellulär zu blockieren (Liu et al., 2023).

Ob und welche dieser Methoden auch für eine CD45CAR-T-Therapie geeignet sind, bleibt offen, solange die Auswirkungen der Abwesenheit von CD45 auf der Zelloberfläche nicht vollständig geklärt sind.

1.4.3 CAR-T basierte Myeloablation – Problematik und Lösungsansätze

In der klinischen Anwendung von CD19CAR-T-Zelltherapie hat sich gezeigt, dass langanhaltende In-vivo-Persistenz von CAR-T-Zellen die Remission aufrechterhalten kann (Porter et al., 2015, Maude et al., 2014). Die hier vorgestellten CD45CAR-T-Zellen sollen zu einer Myeloablation führen, um das Engraftment der Spenderzellen bei SZT zu ermöglichen. Anschließend könnten persistierende CD45CAR-T-Zellen jedoch ungewünscht die Spenderzellen angreifen. Dies kann mit unterschiedlichen Methoden verhindert werden.

1.4.4 Transiente CAR-Expression

Eine Möglichkeit besteht darin, die CARs nur transient zu exprimieren. Dies kann durch, eine einen CAR-Transfer mittels mRNA realisiert werden. Bisherige Studien haben dabei eine CAR-Expression über den Zeitraum von ungefähr einer Woche gezeigt (Billingsley et al., 2020). Aktuell ist die Elektroporation die primär klinisch angewendete Methode, um mRNA in Zellen zu transferieren. Allerdings sterben viele Zellen infolge der induzierten Membranschädigung und es resultiert eine Stress-induzierte veränderte Genexpression in überlebenden Zellen. Alternativ kann mRNA mit Hilfe ionisierbarer Lipidnanopartikel (*LNPs*) per Endozytose in Zellen eingeschleust werden. Mit dieser Methode konnte eine verringerte Zytotoxizität bei vergleichbarer CAR-Expression erreicht werden (Billingsley et al., 2022). *LNPs* wurden auch für den Transfer von Plasmid-DNA zur Herstellung von CAR-T-Zellen erfolgreich eingesetzt. Sowohl der Transfer von DNA als auch von mRNA über *LNPs* sind Möglichkeiten, CAR-T-Zellen ohne virale Vektoren herzustellen (Prazeres et al., 2023).

1.4.5 Einbau von Safety-Switches

Eine weitere Möglichkeit zur Begrenzung der Aktivität von CAR-Effektorzellen ist die Verwendung sogenannter Suizidgene (Gysel et al., 2023). So wurden beispielsweise allogene Spenderlymphozyten mit dem Gen für die Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK) transduziert und bei Auftreten einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (*GVHD*) gezielt durch Applikation von Ganciclovir eliminiert (Bonini et al., 1997, Fehse et al., 2004, Ayuk et al., 1999). Ähnlich funktioniert das Suizid-Gen *iCasp9*, welches bei *GVHD* T-Zellen nach Rimiducid-Zugabe eliminierte (Di Stasi et al., 2011) und zur Unterbindung schwere CAR-vermittelter Zytotoxizität im Mausmodell eingesetzt wurde

(Amatya et al., 2021). Die Gruppe um W. Qasim benutzte ein speziell designtes Sort-/Suizidepitop (RQR8) im Kontext von allogenen CAR-T-Zellen (Qasim et al., 2017).

1.5 Ausblick

1.5.1 Bispezifische Antikörper gegen CD45

Eine weitere Möglichkeit zur potenten, gezielten und gleichzeitig zeitlich begrenzten zellvermittelten Therapie bieten bispezifische Antikörper. Sie verfügen über zwei miteinander verbundene Bindungsdomänen, welche von Antikörpern abgeleitet sind. Eine bindet dabei spezifisch an ein Antigen auf der Ziel- bzw. Targetzelloberfläche und die andere an die Effektorzelloberfläche, bspw. über die CD3 ϵ -Kette des TZR (Klein et al., 2024). Blinatumomab, ein T-Zell-aktivierender gegen CD19 gerichteter Antikörper, wurde als erste bispezifische *Tcell-enganger* (*BiTE*)-Therapie von der *FDA* zur Therapie bei rezidivierter oder refraktärer B-ALL zugelassen (Bargou et al., 2008).

Über die oben beschriebenen CARs hinaus wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstmals CD45-gerichtete bispezifische Antikörper entwickelt, produziert und in vitro getestet. Dafür wurde wie bereits bei der Generation des CD45CAR die BC8-basierte Erkennungssequenz verwendet und mit einem anti-CD3-gerichteten scFv gekoppelt. Die Herstellung der Antikörper erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Constantin Möller (Doktorand AG Fehse).

Die Funktionalität der *BiTEs* wurde in Luciferase-basierten Killing Assays mit den CD45^{pos}Ramos-Targetzellen geprüft. Primäre T-Zellen wurden zusammen mit den Target Zellen für 22 h in aufsteigender Konzentration der CD45xCD3 *BiTEs* inkubiert. In Abbildung 1 ist der resultierende dosisabhängige zytotoxische Effekt dargestellt.

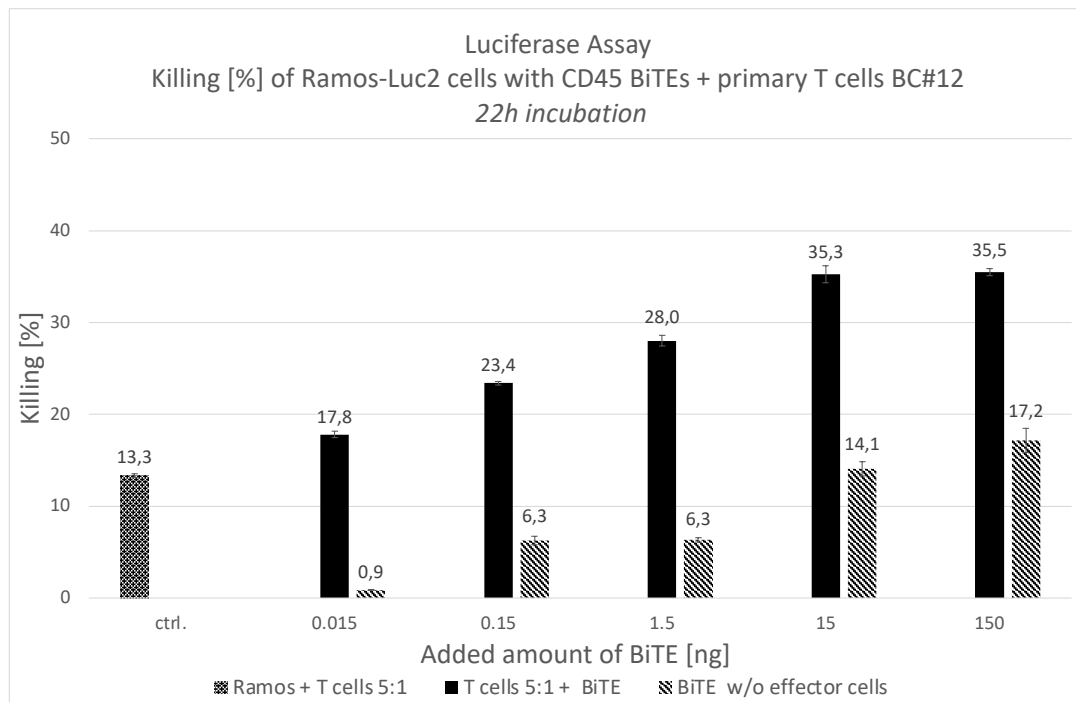


Abbildung 1 aus (Ayuk F et al., 2024b) Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von primären T-Zellen (BC#12) als Effektorzellen im Verhältnis 5:1. Read-out nach 22 h Inkubation.

Analog können bispezifische Antikörper auch mit Natürlichen Killer (NK)-Zellen als Effektorzellen eingesetzt werden. Es werden diverse NK-Zell-Engager in präklinischen und klinischen Studien untersucht (Zhang et al., 2023) u.a. auch gegen auf AML-Zellen exprimierte Antigene wie CD33 (Vallera et al., 2016) und CLEC12A (Arvindam et al., 2021).

Weiterhin habe ich bispezifische Antikörper entwickelt, welche auf der einen Seite CD45 binden und auf der anderen das auf NK-Zellen exprimierte CD16. Durch die CD16-Bindung kommt es ohne weitere Signale zu einer direkten Aktivierung der NK-Zellen, Zytokinausschüttung und Lyse der AK-markierten Zielzelle (Bryceson et al., 2006). Als Effektorzellen wurden NK-Zellen der Zelllinie KHYG-1 eingesetzt. Auch für diese bispezifischen Antikörper konnte in Luciferase-basierten Assays ein dosisabhängiger Killing-Effekt mit bis zu 43,9% lysierten Ramos-Zellen nach 4 h gezeigt werden (s. Abbildung 2).

Zusammen wurden die Ergebnisse mit den bispezifischen Antikörpern für die Schutzrechtsanmeldung EP22211271.6 benutzt, welche mit dem Titel „Antibody for use in a therapy involving effector cell engagement“ beantragt und veröffentlicht wurde (Ayuk F et al., 2024b).

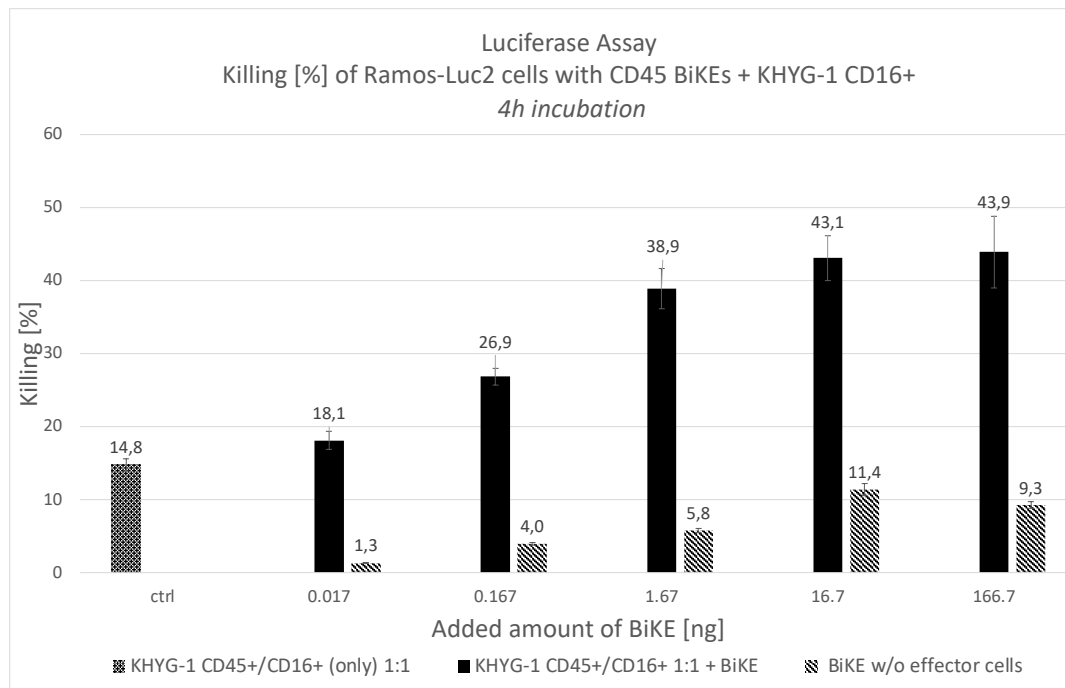


Abbildung 2 aus (Ayuk F et al., 2024b) Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von KHYG-1-Zellen als Effektorzellen im Verhältnis 1:1. Read-out nach 4 h Inkubation.

Anders als bei der aufwändigen und teuren Herstellung von CAR-T-Zellen müssen bispezifische Antikörper nicht individuell für die Patienten generiert werden, sondern stehen den Patienten als sog. „*Off-the-shelf*“-Produkte unmittelbar zur Verfügung. Die kurze Halbwertszeit, z.B. Blinatumomab 1-2 h (Portell et al., 2013) ist für eine Konditionierungstherapie vorteilhaft, da der myeloablativ Effekt nach SZT ausbleibt.

1.5.2 CD45-NK-Zelllinie

Einen weiteren *Off-the-shelf*-Ansatz bieten CAR-NK-Zellen und CAR-NK-Zelllinien. Die NK-Zelllinie NK92 wurde für den klinischen Einsatz entwickelt und bereits in unterschiedlichen Indikationen in der Klinik angewendet (Klingemann, 2023). Die erste klinische Phase-I-Studie mit CD33-CAR-NK92 Zellen bei Patienten mit R/R AML zeigte keine Hinweise auf schwere Nebenwirkungen (Tang et al., 2018).

Eine weitere relevante NK-Zelllinie ist die KHYG-1 (Yagita et al., 2000). In präklinischen Studien wurde die Zellen bereits als Grundlage für CAR-modifizierte NK-Zellen (CAR-KHYG-1) zur Behandlung von Glioblastom (Nakazawa et al., 2020) und Multiplem Myelom (Stikvoort et al., 2021) untersucht. In dieser Arbeit dienen die KHYG-1 als Ausgangszelllinie für weitere Experimente.

Um eine CD45^{neg}CD45CAR-KHYG-1 Zelllinie zu etablieren, wurde das CD45-Protein der KHYG-1 ausgeknockt (1.2.4) und mit gleicher Methode zusätzlich das Protein CD38 entfernt. Anschließend wurden die CD45^{neg}/CD38^{neg}-KHYG-1 Zellen mittels FACS selektiert und mit dem beschriebenen CD45CAR transduziert. Der zusätzliche Knockout von CD38 ermöglicht eine CD38-gerichtete bzw. Kombinationstherapie, welche auch CD38^{pos}/CD45^{neg} Plasmazellen abdecken würde. Zudem ist ein kombinierter CAR sinnvoll, um maligne Zellen zu eliminieren, welche nur eines der beiden Target-Antigene exprimieren und somit den „Escape“ von Krebszellen zu minimieren. Die CD45^{neg}/CD38^{neg} CD45CAR-KHYG-1 Zellen haben in Luciferase-basierten Killing Assays eine erhaltene und sehr effektive zytolytische Aktivität mit bis zu 91,1% Killing (E:T 5:1) nach 4 h Inkubation gezeigt. Für eine sichere In-vivo-Anwendung müssen die Zellen zuvor teilungsunfähig gemacht werden, was z.B. mit Bestrahlung vor Applikation möglich ist. Stikvoort et al konnte zeigen, dass die KHYG-1 Zellen auch nach Bestrahlung noch effektiv zytotoxisch wirksam sind (Stikvoort et al., 2021).

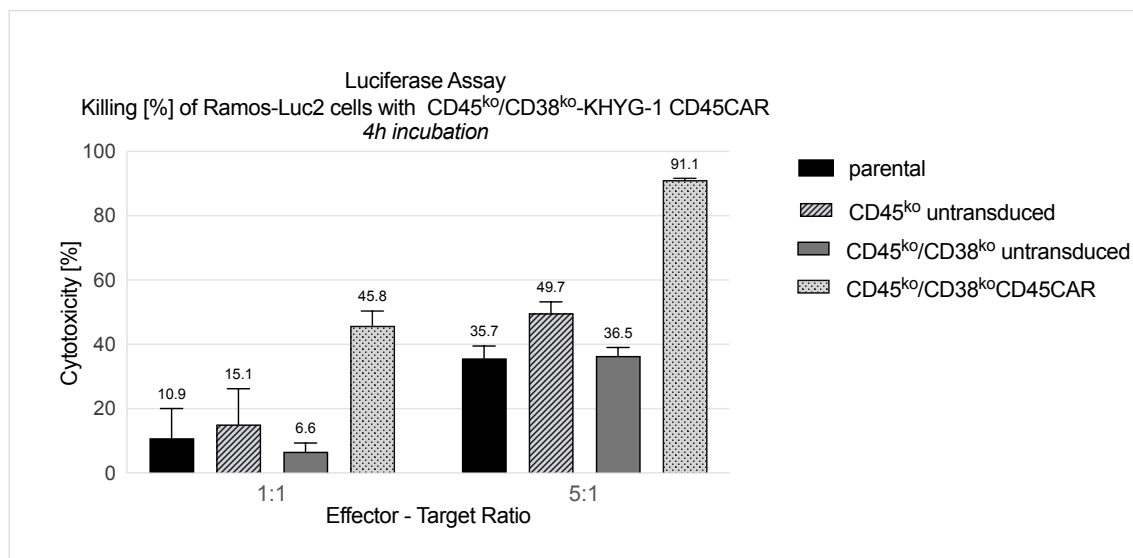


Abbildung 3 Unveröffentlichte Daten aus (Ayuk F et al., 2024a). Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von KHYG-1-Zellen als Effektorzellen im Verhältnis 1:1 und 5:1. Read-out nach 4 h Inkubation.

Diese Ergebnisse führten ebenfalls zu einer Schutzrechtanmeldung EP23183973.9, welche zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht publiziert ist.

Article

CD45-Directed CAR-T Cells with CD45 Knockout Efficiently Kill Myeloid Leukemia and Lymphoma Cells In Vitro Even after Extended Culture

Maraïke Harfmann ¹, Tanja Schröder ¹, Dawid Glów ¹, Maximilian Jung ¹, Almut Uhde ¹, Nicolaus Kröger ², Stefan Horn ¹, Kristoffer Riecken ¹ , Boris Fehse ^{1,*}  and Francis A. Ayuk ^{2,*}

¹ Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf (UKE), 20246 Hamburg, Germany; a.uhde@uke.de (A.U.)

² Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf (UKE), 20246 Hamburg, Germany

* Correspondence: fehse@uke.de (B.F.); ayuketang@uke.de (F.A.A.)



Citation: Harfmann, M.; Schröder, T.; Glów, D.; Jung, M.; Uhde, A.; Kröger, N.; Horn, S.; Riecken, K.; Fehse, B.; Ayuk, F.A. CD45-Directed CAR-T Cells with CD45 Knockout Efficiently Kill Myeloid Leukemia and Lymphoma Cells In Vitro Even after Extended Culture. *Cancers* **2024**, *16*, 334. <https://doi.org/10.3390/cancers16020334>

Academic Editor: Dimitrios Mougialakos

Received: 29 November 2023

Revised: 29 December 2023

Accepted: 9 January 2024

Published: 12 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Chimeric antigen receptors (CARs) are used to recognize highly specific antigens (“mugshots”) to target immune effectors (“policemen”) against cancer cells. Whereas this new immunotherapy has already set novel standards in the treatment of some specific types of blood cancer, it has not yet been successful with most blood (and solid) cancers for different reasons. In this work, the authors investigated the possibility of using a specific antigen called CD45 as target for CAR therapies. CD45 stands out by being present on all blood cells and therefore represents a promising target in any type of blood cancer. However, immune cells themselves also harbor CD45 at their cell surface, which is expected to lead to either inactivity of the CAR or self-killing of immune cells. To avoid these problems the Hamburg group used a trick—they applied the CRISPR/Cas gene scissors and thus produced CD45-knockout (CD45^{ko}) immune-effector cells. Even though CD45 had been supposed to be important for the functionality of immune-effector cells, the authors observed excellent survival, proliferation and killing activities of their CD45^{ko} CAR cells, independent of the targeted cancer-cell population. Their results thus provide initial proof-of-concept for the potential usefulness of CD45^{ko}/CD45-CAR immune cells to target blood cancer.

Abstract: Background: CAR-T cell therapy has shown impressive results and is now part of standard-of-care treatment of B-lineage malignancies, whereas the treatment of myeloid diseases has been limited by the lack of suitable targets. CD45 is expressed on almost all types of blood cells including myeloid leukemia cells, but not on non-hematopoietic tissue, making it a potential target for CAR-directed therapy. Because of its high expression on T and NK cells, fratricide is expected to hinder CD45CAR-mediated therapy. Due to its important roles in effector cell activation, signal transduction and cytotoxicity, CD45 knockout aimed at preventing fratricide in T and NK cells has been expected to lead to considerable functional impairment. Methods: CD45 knockout was established on T and NK cell lines using CRISPR/Cas9-RNPs and electroporation, and the successful protocol was transferred to primary T cells. A combined protocol was developed enabling CD45 knockout and retroviral transduction with a third-generation CAR targeting CD45 or CD19. The functionality of CD45^{ko} effector cells, CD45^{ko}/CD45CAR-T and CD45^{ko}/CD19CAR-T cells was studied using proliferation as well as short- and long-term cytotoxicity assays. Results: As expected, the introduction of a CD45-CAR into T cells resulted in potent fratricide that can be avoided by CD45 knockout. Unexpectedly, the latter had no negative impact on T- and NK-cell proliferation in vitro. Moreover, CD45^{ko}/CD45CAR-T cells showed potent cytotoxicity against CD45-expressing AML and lymphoma cell lines in short-term and long-term co-culture assays. A pronounced cytotoxicity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells was maintained even after four weeks of culture. In a further setup, we confirmed the conserved functionality of CD45^{ko} cells using a CD19-CAR. Again, the proliferation and cytotoxicity of CD45^{ko}/CD19CAR-T cells showed no differences from those of their CD45-positive counterparts in vitro. Conclusions: We report the efficient production of highly and durably active CD45^{ko}/CAR-T cells. CD45 knockout did not impair the functionality of CAR-T cells in vitro, irrespective of the target antigen. If their

activity can be confirmed in vivo, CD45^{ko}/CD45CAR-T cells might, for example, be useful as part of conditioning regimens prior to stem cell transplantation.

Keywords: chimeric antigen receptor (CAR); CD45; CRISPR-Cas; cytotoxicity; leukemia; immunotherapy; conditioning

1. Background

Chimeric antigen receptor (CAR-) T-cell therapy is now part of standard care in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL), B-cell lymphoma, and multiple myeloma [1–6]. This innovation has been enabled mainly by targeting B-cell lineage-specific cell surface antigens, namely CD19 and B-cell maturation antigen (BCMA). In contrast, the development of CAR-T cell therapy for myeloid diseases, especially acute myeloid leukemia (AML), has been hampered primarily by the absence of suitable AML-specific or at least AML-associated antigens. Indeed, the targeting of myeloid-lineage associated antigens such as CD33 and CD123 has been impeded by their expression in other tissues (CD33 in liver, CD123 in endothelial cells [7,8]), which raises issues of on-target off-tumor toxicity.

CD45 is a type-I transmembrane protein with various isoforms found on almost all hematopoietic cells (except erythrocytes and platelets) and a regulator of signaling thresholds in immune cells [9]. It is expressed on 85–90% of ALL and almost all AML cells but not on non-hematopoietic tissues [10,11]. Targeting CD45 with CAR-based cell therapy may therefore in principle be employed for the treatment of both lymphoid and myeloid hematological diseases. However, so far, CD45 has not been explored for CAR-based therapy for several reasons. Owing to its high expression on T cells and NK cells, the introduction of CD45-directed CARs is expected to result in fast and widespread fratricide strongly impairing efficacy. Moreover, since CD45 is present on all nucleated hematopoietic cells, successful CD45-directed CAR-T cell therapy is anticipated to result in profound myeloablation.

One potential approach to prevent fratricide is through CD45 knockout in effector cells prior to their transduction with a CD45-CAR. Highly efficient CD45 knockout (KO) in human T and NK cells was previously reported using “ready-to-go” ribonucleoprotein complexes consisting of synthetic sgRNA and recombinant Cas9, but the functionality of those cells was not studied [12,13]. Given the central role of CD45 in the regulation of cell activation, signal transduction, and cytotoxicity [14], a significant loss of function of immune effector cells is expected upon knockout of CD45.

In this study, we sought to generate CD45^{ko} CAR-effector cells and examine their functional properties in various in vitro assays.

2. Methods

2.1. Cell Culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats (BCs) via density gradient using Seccoll Lymphocyte Separation Medium (Serana, Pessin, Germany). BCs were anonymized leftovers of whole-blood donations from healthy donors. They were kindly provided for research (with informed consent) by the Institute of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. To obtain primary T cells, freshly isolated PBMCs were activated with T Cell TransAct for human T cells (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly, PBMCs were seeded in 6-well suspension cell culture plates at cell concentrations of 1.5×10^6 per mL. T cell TransAct was added according to the manufacturer’s instructions at a 1:100 ratio. The primary T cells were cultured in TexMACS medium (Miltenyi Biotec) supplemented with 3% human serum (Merck, Darmstadt, Germany) and 200 U/mL hIL-2 (Proleukin S, Novartis, Basel,

Switzerland). In the case of long-term culture, the activation step with T cell TransAct was repeated after 14 days.

Ramos (ATCC, CRL-1596), KHYG-1 (DSMZ, ACC-725), and PM-1 cells [15] were cultured in RPMI medium 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific, Schwerte, Germany) supplemented with penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL; Gibco) and 2 mM L-glutamine (Gibco). The medium was further supplemented (1) with 25 mM HEPES (Gibco) and 13% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco) for Ramos, (2) with 20% FCS, 1% sodium-pyruvate (Gibco), 1% non-essential amino acids (NEAA, Gibco), and 200 IU/mL IL-2 for KHYG-1, and (3) with 10% FCS, 1% sodium pyruvate for PM-1 cells. HEK293T cells (ATCC CRL-3216) were kept in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Glutamax, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FCS and penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL). The GM-CSF-dependent human AML-cell line Nos-1FD4 (established in our lab, Horn et al., manuscript in preparation) was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL), 1% sodium pyruvate, 1% NEAA, 0.1% beta-mercaptoethanol (Gibco) and 5 ng/mL human GM-CSF (Peprotech/ThermoFisher Scientific). A variant carrying an FLT3-mutation (Nos-1FD4-ITD) after lentiviral transduction was cultivated without GM-CSF. Cells were incubated under standard conditions: 37 °C, 100% relative humidity, 5% CO₂.

2.2. Cloning of the CD45-CAR and Retroviral Vector

Vector cloning was performed using established recombinant-DNA techniques, essentially as described [16]. The general structure of the CAR expression construct is shown in Figure 1 and largely follows previous work [17]. The used third-generation CAR contained the following elements: An anti-CD45 single-chain variable fragment (scFv) derived from the mouse anti-human CD45 antibody clone BC8 [18], spacer and CD28-derived transmembrane (TM) regions, and tandem CD28 and 4-1BB co-activation domains linked to the CD3ζ signaling domain. Two different spacer variants were used, a short CD28-derived spacer and a longer one derived from IgG4, including its hinge, CH2 and CH3 domain. DNA sequences were codon-optimized. The CAR was cloned into the γ-retroviral vector pRSF91.iB.pre*-Puro⁺ upstream of an encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosomal entry site (IRES) and the coding region for the blue fluorescent protein mTagBFP, linked to the puromycin resistance PAC by a 2A peptide. After integration in the host cell genome, the CAR is expressed under control of the SFV promoter.



Figure 1. Schematic of the γ-retroviral CD45CAR vector with the short CD28c spacer. The SF91 based γ-retroviral vector backbone pRSF91.iB.pre* [19] with the safety-optimized wPRE* [20] was chosen to facilitate efficient CAR expression. LTR = long terminal repeat; SD = splice donor; SA = splice acceptor, S = signal peptide; scFv = single chain variable fragment; TM = transmembrane; CD28, 4-1BB and CD3ζ = intracellular signal transduction elements for T-cell activation; IRES = internal ribosome entry site derived from encephalomyocarditis virus; mTagBFP = monomeric blue fluorescent protein; puro = puromycin resistance; wPRE = woodchuck hepatitis virus post-transcriptional response element. Not to scale.

2.3. Retroviral Transduction

Retroviral vector particles pseudotyped with the Gibbon-ape leukemia virus (GALV) envelope were produced by transiently transfecting HEK293T cells. To do so, we used the calcium phosphate method and titrated the obtained vector containing supernatants on HEK293T, both steps as described previously [21]. Titers of concentrated (by centrifugation) supernatants were in the range of 1–60 × 10⁶ transducing units per mL.

Primary T lymphocytes were transduced on RetroNectin (Takara Bio, Europe AB, Göteborg, Sweden) after the 3-day activation with T cell TransAct described above, earlier shown to be a very efficient way to transduce primary T cells using retroviral vectors [22]. To facilitate transduction, 6-well suspension plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) were coated with RetroNectin (RN) following standard procedures as suggested by the manufacturer. For transduction, vector-containing supernatant was added in TexMACS in a total volume of 1 mL to provide a multiplicity of infection of 10. Plates were centrifuged for 1 h ($1000\times g$, 4 °C) to preload vector particles onto the RetroNectin. The medium containing non-bound vector particles was removed and 1×10^6 human primary T cells were added in 2 mL T-cell medium. After 24 h incubation at 37 °C, transduced T cells were harvested by carefully removing them from the plate.

2.4. CRISPR/Cas RNP Generation and Transfection

Primary T cells of BC#3 were activated with T cell TransAct as described above three days prior to transfection (Figure 2A). For the following KO-experiments, an additional step was added to the protocol. On day 3, after activation with TransAct, the cells were seeded on RetroNectin-coated plates. Electroporation was performed 24 h after this step as for the combined transduction protocol later.

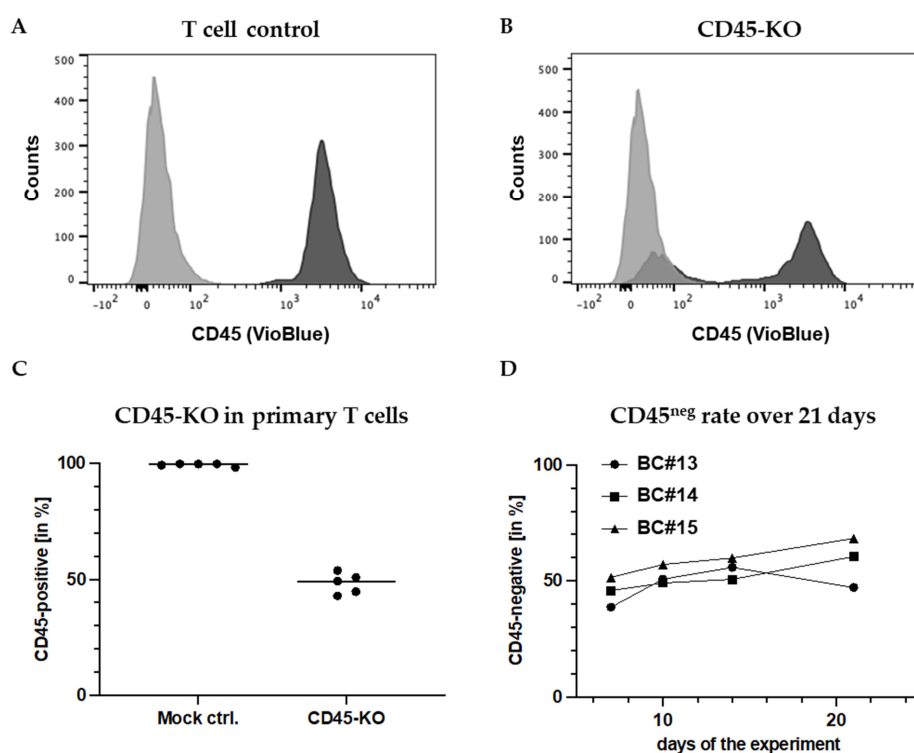


Figure 2. High-rate CD45 knockout in primary human T cells. FC measurement of CD45 expression on (A) mock (electroporated without RNPs) and (B) primary human T cells (BC#3) transfected with CRISPR/Cas9-RNPs to knockout CD45, seven days after electroporation. (C) Reproducibly high CD45-KO rates in primary T cells from different donors. As mock control cells, T cells were electroporated without RNPs. (D) CD45-KO rates remain stable in primary T cell cultures after the KO-electroporation for at least 2.5 weeks.

To assemble CRISPR-Cas9-sgRNA RNP-complexes, Cas9 protein TrueCut v2 (ThermoFisher Scientific) was mixed in a PCR tube with individual sgRNAs targeting the CD45 gene. Based on preliminary experiments in T- and NK-cell lines, we chose an sgRNA directed to nucleotides 261–279 (protospacer/crRNA) with the protospacer adjacent motif (PAM) at nucleotides 280–282 in exon 1 of the CD45 gene: GGCTTAAACTCTTG-GCAATTGG. The molar ratio was 1:2.5 of Cas9 to sgRNA in a total volume of approximately 2 μ L. The mixture was incubated for 10 min at RT.

After a washing step (centrifugation $310\times g$, 5 min, RT), cell concentrations were adjusted to 4×10^5 /15 μ L OPTI-MEM (Gibco). A sample of 15 μ L of cell suspension was added to the pre-built RNP-complexes, and the mixture was immediately transferred to a 1 mm cuvette avoiding generation of air bubbles. Cell-RNP mixtures were electroporated with the GenePulser Xcell (BioRad, Munich, Germany) under the following conditions:

- Primary T cells: 90 V, square-wave pulses, 10 ms pulse length, 3 pulses (0.1 ms pause)
- PM-1: 85 V, square-wave pulses, 5 ms pulse length, 3 pulses (0.1 ms pause)
- KHYG-1: 75 V square-wave pulses, 10 ms pulse length, 3 pulses (0.1 ms pause)

Electroporated cells were recovered from the cuvettes using their respective, pre-warmed growth medium and cultured in 1 mL in 24-well suspension plates at 37 °C.

2.5. Flow Cytometry, Fluorescence-Activated Cell Sorting and Magnetic Cell Sorting

Flow cytometry (FC) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were performed on a FACSCanto II and a FACS Aria IIIu (both BD Biosciences, Heidelberg, Germany), respectively. For FC and FACS, cells underwent a washing step by centrifugation at $310\times g$ for 5 min at RT and were resuspended in approx. 250 μ L PBS. Cells were stained with FITC- or VioBlue-labelled anti-human monoclonal REAfinity CD45 antibodies (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Unstained cells were used as controls. FC data were analyzed using FlowJo 10 (BD Biosciences).

Magnetic cell sorting (MACS) was used to separate CD45-positive (CD45^{pos}) and CD45^{ko}/CD19CAR-T cells three days after the CD45-KO electroporation. The cells were labeled using CD45 (TIL) MicroBeads (Miltenyi) and sorted through MACS columns into CD45^{pos} and CD45^{ko} fractions according to the manufacturer's protocol. Successful sorting was confirmed via FC 24 h later.

2.6. Killing Assays

Luciferase-based assays were employed to test the killing ability of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells. Ramos and Nos-1FD4 cells were chosen as target cells after confirming homogenous CD45 surface expression via antibody staining and FC. To generate Ramos^{Luc} and Nos-1FD4^{Luc} cells, parental cells were transduced with LeGO-Luc2-iG2-Puro⁺. Pure populations of luciferase-expressing cells were obtained by culturing in the presence of 1 μ g/mL puromycin (Merck). Based thereon, the viability of Luc2⁺ cells could be assessed after addition of luciferin by measuring the bioluminescence with a plate reader. For killing assays, target and effector cells were counted and seeded together in white 96-well OptiPlates (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). In brief, 10,000 target cells were seeded in 100 μ L/well in effector cell medium, and effector cells were added at different effector-to-target (E:T) ratios to a total volume of 200 μ L/well. Co-cultured cells were incubated at 37 °C for 4 h. Thereafter, plates were centrifuged at $1000\times g$ for 5 min at RT to pellet the cells. A sample of 100 μ L supernatant was carefully removed with a multi-channel pipette. D-Luciferin Firefly (Biosynth, Staad, Switzerland) diluted in PBS (16 ng in 100 μ L PBS) was added, and plates were incubated for 20 min in the dark. The bioluminescence intensity was analyzed with the plate reader Infinite 200 pro (Tecan, Männedorf, Switzerland) using 2000 ms integration time.

2.7. Statistics

Graphs and statistical analyses were made with GraphPad PRISM (version 9) using 2-way ANOVA. *p* values below 0.05 were considered to indicate significance. Levels of significance are designated as follows: * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, and **** *p* < 0.0001.

3. Results

3.1. Efficient and Stable Knockout of the CD45 Protein in Primary Human T Cells

Based on preliminary studies in T and NK cell lines, we chose the sgRNA indicated in the Section 2 to knockout CD45 in primary T cells. Surprisingly, CD45-KO worked far more efficiently in primary cells than in cell lines. FC measurements after 7 days reproducibly demonstrated high KO efficiencies with an average rate of CD45-negative (CD45^{ko}) cells of 51.7% ($\pm$ 4.5%) (Figure 2A–C). Unexpectedly, the CD45^{ko} T cells had no growth disadvantage in culture, which resulted in stable CD45^{ko} fractions despite the presence of competing CD45^{pos} cells, as shown for cells from three different donors (buffy coats (BC) #13–#15) for 17 days after the KO (Figure 2D). In conclusion, we established an efficient method to knockout the CD45-protein in primary T cells. Along the way, we established CD45-negative PM-1 and CD45-negative KHYG-1 cell lines. Remarkably, we did not observe any impact of CD45-KO on the growth of the cell lines nor the primary T cells in vitro.

3.2. Combined CD45-CAR Transduction and CD45-KO in Primary T Cells

Next, we aimed to establish a combined process for CD45-CAR transduction and CD45-KO in primary T cells. First, we transduced primary human T lymphocytes with the GALVenv-pseudotyped lentiviral CD45-CAR vector (CD45CAR_CD28c_GALV), depicted in Figure 1, following our standard protocol. In independent experiments using buffy coats from four different donors, we observed efficient transduction of 23.1–43.8% CD3 T cells. In these experiments, the gene transfer rates were determined based on BFP expression as measured on days 5–8 after transduction (Figure 3).

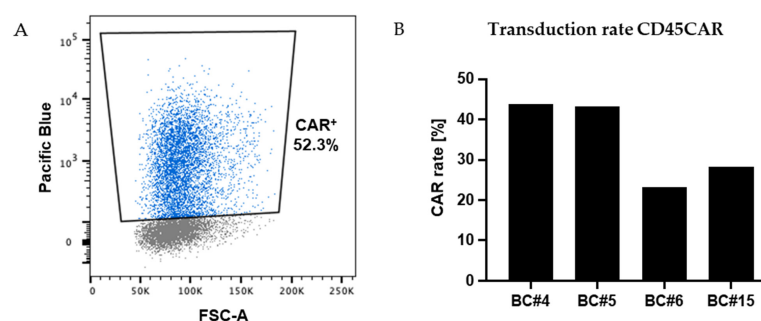


Figure 3. Efficient transduction of primary human T cells. (A) FC analysis revealed high level expression of the marker gene BFP in a relevant proportion of primary T cells as exemplarily shown for BC#4 at day 3 post transduction. (B) Transduction rates for T cells from four different donors as assessed by FC based on BFP expression 5–8 days post transduction.

In order to define the optimal procedure for the combined process, we varied several parameters, particularly the order of the two modification steps and the time lags between T-cell activation, transduction, and CD45 knockout (from 24 h to 7 days). While some of the resulting protocols were impracticable (e.g., due to substantial cell death) or did not result in sufficient numbers of double-modified T cells, two modi operandi gave promising results and will in the following be referred to as protocols P1 and P2.

P1: CD45-CAR transduction—24 h resting period—CD45KO electroporation

P2: CD45KO electroporation—3 days resting period—CD45-CAR transduction

3.3. CD45^{ko}/CD45CAR-T Cells Mediate High-Efficient Fratricide of CD45-Positive T Cells

As noted above, we did not observe any major impact of CD45-KO on T-cell growth characteristics. However, given the central role of CD45 in the regulation of effector cell activation, signal transduction, and cytotoxicity [14], a significant loss of function of these

cells had to be expected upon knockout of CD45. In fact, previous work had shown decreased NK cell activity in CD45-negative mutants, albeit to different extents [8–10], whereas data on the functionality of CD45-negative T cells are largely lacking, mainly because CD45^{-/-} mice develop only very few or no T cells [23].

Contrary to the expectation, we found CD45^{ko}/CD45CAR⁺ cells to mediate efficient fratricide killing of CD45^{pos} T cells as exemplified for BC#4 in Figure 4A,B. As shown in Figure 4A, using protocol P1, we obtained 41.4% CD45^{ko}/CD45CAR⁺ cells (Q3 of the dot plot) three days after RNP electroporation; at this time point approx. one of six T cells (16.6%) were still CD45^{hi} (Q1 + Q2). Only 48 h later almost no CD45-positive cells were left (0.9%, Figure 4B, (Q1 + Q2)).

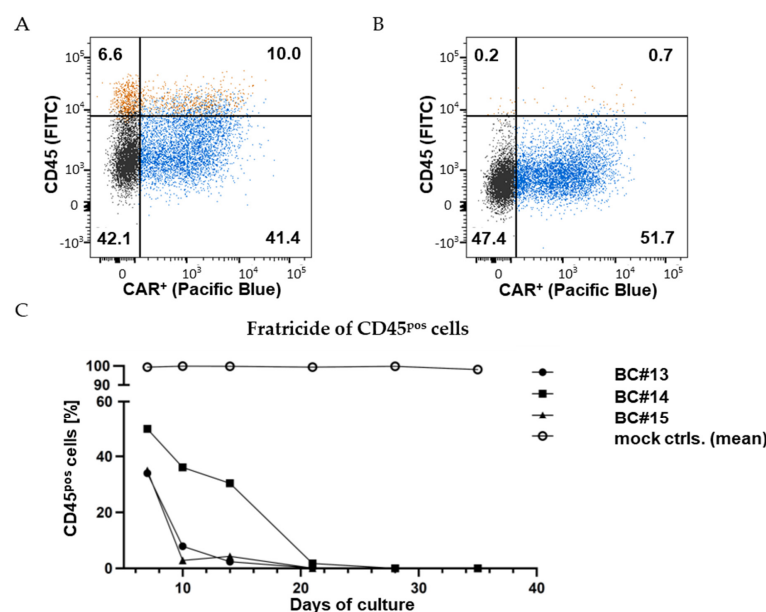


Figure 4. CD45CAR-T cells mediate fratricide. FC measurement 3 days (A) and 5 days (B) after the CD45-KO electroporation of primary CD45CAR-T cells (BC#4). The cells were stained with a CD45-antibody (FITC). Vector-mediated transgene expression was quantified based on detection of the IRES-driven BFP. Relative cell numbers (%) in the four quadrants are indicated. (C) Complete fratricide of CD45^{pos} T cells in three independent experiments by day 28. CD45^{ko}/CD45CAR-T cells were produced performing protocol P1.

These results could largely be reproduced using T cells from three different healthy blood donors (BC#13–#15); the experiment workflow is visualized in Figure S1. Initial transduction rates were 45.7%, 26.2% and 39.9% for BC#13–#15, respectively. In all cases, co-culture of CD45^{ko}/CD45CAR⁺ cells with CD45^{pos} T cells resulted in complete elimination of the CD45^{pos} cells over time, albeit with slightly different kinetics (Figure 4C). In three of four experiments (BC#4, BC#13, BC#15), percentages of CD45^{pos} cells were below 10% by day 10 of the culture. Only for BC#14 did the elimination of CD45^{pos} cells take longer, but it was almost completed by day 21. One obvious reason for the slower kinetics was the lower initial CD45-KO rate obtained in this experiment. Additionally, donor-specific factors such as primary T-cell fitness (again, potentially affecting cell growth, transduction, and transfection rates) might influence the outcome of individual experiments.

In summary, based on these experiments, we could conclude that (i) the novel CD45-CAR is functional and CD45-specific, (ii) primary human T cells survive the applied process

of combined CD45-KO and retroviral CAR transduction, and (iii) CAR-T cells do not require CD45 protein on their surface for efficient effector function in vitro.

3.4. Efficient Killing of Ramos B Cells by CD45^{ko}/CD45CAR-T Cells

To verify the activity of CD45CAR-T cells in the context of malignant targets, we tested them in luciferase-based killing assays against the B-cell leukemia line Ramos. First, we confirmed CD45-positivity of Ramos cells by CD45-antibody staining and flow cytometry; we found uniform and high CD45 expression (Figure S2A).

In the killing experiments, we tested CD45-CAR constructs with two different spacers differing in their lengths, namely CD45CAR_CD28c (CD28 derived) and CD45CAR_h23c (derived from human IgG4 CH2-CH3 domains, modified for reduced Fc receptor binding [24]). Both CD45CAR constructs facilitated efficient T-cell transduction and killing of Ramos cells, whereby the CAR construct with the shorter spacer (CD28c) was more effective in this setting. In fact, for CD45CAR_CD28c, we observed killing rates of up to 43.7% at an effector–target (E:T) ratio of 10:1 after just 4 h of co-incubation (Figure 5A).

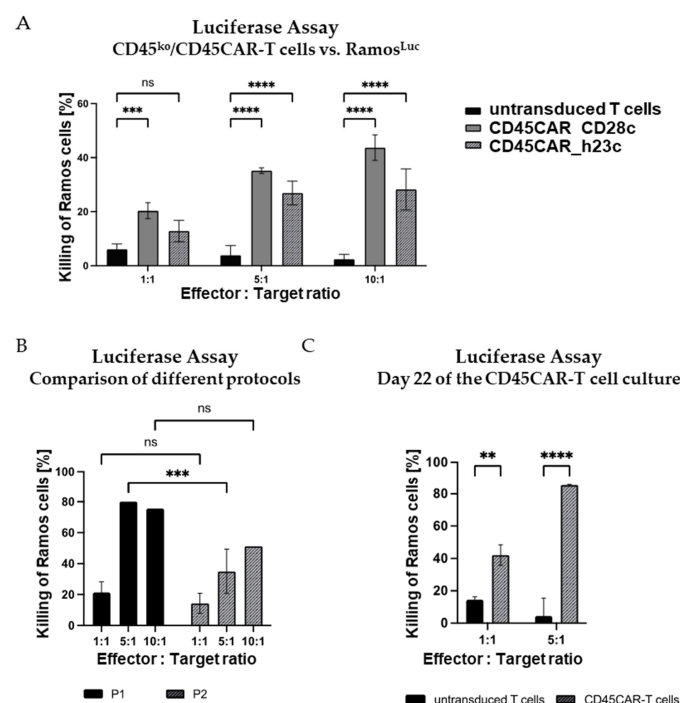


Figure 5. Efficient killing of Ramos B cells by CD45^{ko}/CD45CAR-T cells within 4 h. (A) CD45^{ko}/CD45CAR-T cells are functional with both the long and the short spacers. Transduction and electroporation of T cells from BC#4 were performed following protocol P1. The 4 h killing assays ($n = 3$) were carried out on day 10 of the experiment. (B) Comparison of killing activities of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells produced with the two different protocols P1 and P2. T cells were from BC#6, the killing assays ($n = 1–3$) were carried out on day 12 after T-cell activation. Only the short spacer was used in this experiment. (C) High killing activity of CD45^{ko}/CD45CAR T cells after prolonged in vitro culture. CAR-T cells were produced following protocol P2 using BC#5. The killing assays ($n = 2–3$) were performed on culture day 22. Levels of significance are designated as follows: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$, ns = not significant.

As described above, we tested different protocols for the production of the CD45^{ko}/CD45 CAR-T cells. A comparison of the results obtained with the two protocols P1 and P2 is provided in Figure 5B. In this experiment performed with BC#6, CAR-T cells generated following protocol P1 killed up to 79.8% of Ramos target cells at an E:T ratio of 5:1 during 4 h incubation. The killing activity of P2-CAR-T cells was lower, but still reached 50.4% at a 10:1 E:T ratio (Figure 5B). A summary of the numbers of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells for BC#6 obtained using the two protocols in small scale is provided in Table S1.

Lastly, we asked whether prolonged in vitro cultivation might impair the functional activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T. To address this question, the luciferase-based killing assay was performed on day 22 of ex vivo culture (Figure 5C). Notably, the killing of Ramos cells at that late time point was at least as efficient as 10 days earlier (compare Figure 5B). The conserved or even increased functional activity of those cultured CD45^{ko}/CD45CAR-T cells might be due to the higher purity after completion of fratricide (compare Figure 4C).

In conclusion, we demonstrated the functionality of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells in several experiments with T cells from various healthy donors thus providing proof of concept for the proposed strategy. Moreover, our data led us to conclude that protocol P1 was not only the fastest method, but also resulted in the best-performing effector cells. Therefore, protocol P1 was used for further experiments.

3.5. CD45^{ko}/CD45CAR-T Cells Effectively Eliminate Human AML Cells

In order to assess the lytic activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells against human AML cells, we made use of the novel AML cell line Nos-1FD4 recently established in our laboratory (Horn et al., manuscript in preparation). Nos-1FD4 cells show high CD45 expression as confirmed by FC (Figure S2B). First, we co-incubated GFP-expressing Nos-1FD4 with CD45^{ko}/CD45CAR-T cells at a 1:1 ratio. We reasoned that killing of the AML cells would be easily detectable by the disappearance of GFP⁺ cells in flow cytometry. For control, we in parallel cultured Nos-1FD4 cells in T-cell medium and did not observe any growth-inhibiting effects on Nos-1FD4 cells due to the change in culture conditions. Further, we co-cultured non-transduced T cells from the same donor with Nos-1FD4 cells to assess any potential unspecific or allo-reactive killing. In this control experiment, Nos-1FD4-GFP⁺ cells showed a clear growth advantage over the T cells dominating the cell culture already after 42 h and representing >80% of cells after 70 h, as estimated by FC (Figure 6A). In striking contrast, co-culture with CD45^{ko}/CD45CAR-T cells resulted in almost complete elimination of the Nos-1FD4-GFP⁺ cells after 70 h, independent of the spacer used (Figure 6A).

To verify the oncolytic activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells in an independent experimental setting, we also performed the luciferase-based killing assay as above. In the experiment shown in Figure 6B, we used CAR-T cells generated from BC#14 that were already in culture for 30 days to address the question of long-term functionality. Despite the extended in vitro culture, the CD45^{ko}/CD45CAR-T cells still mediated very effective killing of up to 60% of the leukemic cells in the short-term (4 h) luciferase assay, confirming the above results obtained with Ramos target cells.

In summary, CD45^{ko}/CD45CAR-T cells were able to survive and effectively kill two different CD45-positive leukemia cell lines. Despite the CD45-KO, their functional activity remained largely preserved even after long-term ex vivo culture for >4 weeks.

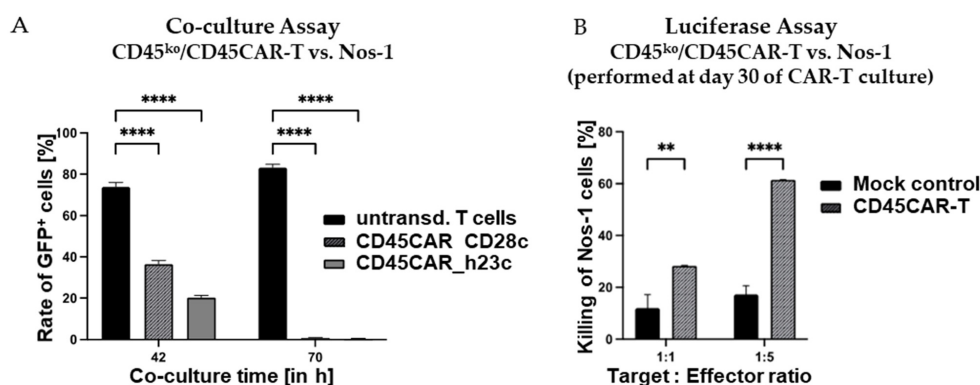


Figure 6. Pronounced oncolytic activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells against Nos-1FD4 AML cells. (A) Co-culture of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells (BC#4) against Nos-1FD4-GFP⁺ AML cells. Effector and target cells were cultivated at a 1:1 ratio and percentages of Nos-1FD4-GFP⁺ cells were monitored by flow cytometry based on GFP expression. As evident (left bars), Nos-1FD4 cells had a growth advantage over non-transduced T cells. In contrast, in the presence of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells, Nos-1FD4 cells essentially completely disappeared after 70 h of co-culture ($p < 0.0001$ for both CAR constructs and both time points, $n = 3$). (B) Standard 4 h luciferase-based killing assays using growth-factor independent Nos-1FD4-ITD^{Luc} cells as targets. CD45^{ko}/CD45CAR-T cells (BC#14) had been cultivated for 30 days before their use in the killing assays ($n = 2$ for CAR-T and $n = 3$ for mock). Levels of significance are indicated as follows: ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

3.6. No Negative Impact of CD45-KO on Growth and Effector Functions of CAR-T Cells In Vitro

So far, we have shown that CD45^{ko}/CD45CAR-T cells can efficiently be generated, expanded, and used in killing assays. However, by using the CD45CAR, we could not completely exclude the previously suggested negative effects of CD45-KO on CAR-T cell growth and function, since any presence of CD45 on the T cells did result in fratricide, i.e., a selective advantage of the CD45^{ko} cells.

To overcome this limitation, we used a standard CD19-CAR for the following experiments. CD19CAR-T cells were produced using the T cells of three different healthy donors (BC#21–#23). CD19-CAR transduction and CD45-KO followed protocol P1. To obtain pure populations, CD45^{ko} and CD45^{pos} cells were separated by MACS.

Addressing both the proliferation and the effector functions of CD45^{ko}/CD19CAR-T as compared to CD45^{pos}/CD19CAR-T cells, we in parallel co-cultured both effector cell types with CD19-positive Ramos-GFP⁺ cells starting at an E:T ratio of 1:5 and monitored CAR-T cell numbers for 1 week (Figure 7A). Remarkably, even though we observed very diverse proliferation rates between CD19CAR-T cells derived from the three different BCs, there were essentially no differences between CD45^{ko}/CD19CAR-T and CD45^{pos}/CD19CAR-T cells for a given donor (Figure 7A). To assess the oncolytic potential of the different CAR-T cells, we quantified the numbers of Ramos-GFP⁺ cells over time in the co-culture. In Figure 7B, the numbers of Ramos-GFP⁺ cells were normalized in the individual cultures to allow the comparison of killing kinetics with effectors from the three different donors. Despite the low initial E:T ratio of 1:5, we saw the efficient elimination of tumor cells after 7 days (Figure 7B), again without significant differences between CD45^{ko} and CD45^{pos} CAR-T cells. This finding was confirmed in a direct short-term (4 h) luciferase-based killing assay on day 30 (Figure 7C).

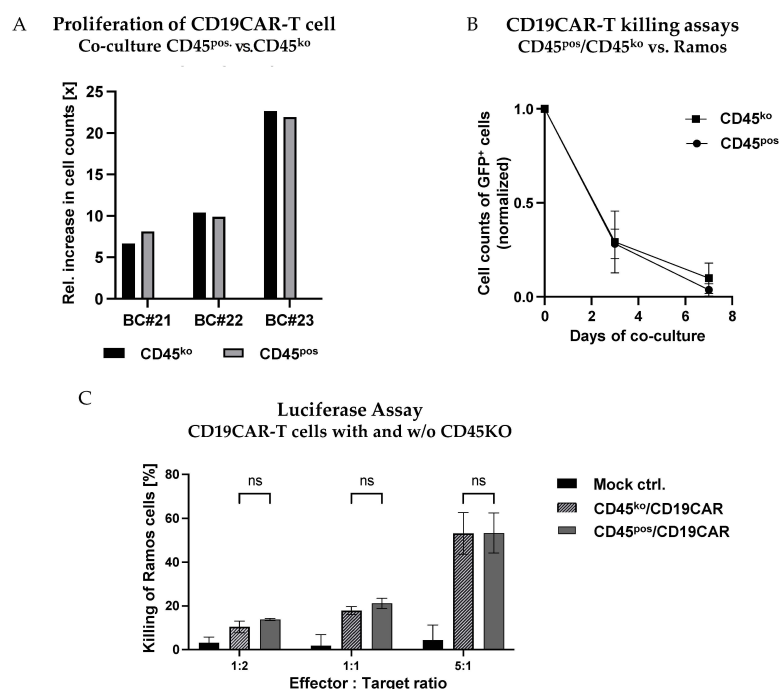


Figure 7. No negative impact of CD45-KO on CD19CAR-T cell proliferation and functional activity. (A,B) CD45^{ko} and CD45^{pos}/CD19CAR-T cells were co-cultured with Ramos-GFP⁺ cells at an E:T ratio of 1:5. (A) No major differences in numbers of cell doublings for CD45^{ko} and CD45^{pos}/CD19CAR-T cells derived from three different BCs (BC#21-BC#23) after 1 week of co-culture. (B) Both CD45^{ko} and CD45^{pos}/CD19CAR-T cells mediate efficient elimination of Ramos-GFP⁺ cells in co-culture. Relative Ramos cell numbers were quantified by flow cytometry based on GFP expression, absolute numbers were counted at days 3 and 7 of the co-culture (three different BCs). (C) Luciferase-based killing assays with Ramos-Luc-GFP⁺ cells as targets cells and an incubation time of 4 h ($n = 3$ different BCs, except CD45^{pos}/CD19CAR-T cells at E:T ratio of 1:1 [$n = 2$]).

In conclusion, the direct comparison of CD45^{ko} and CD45^{pos} CAR-T cells indicates that the absence of CD45 has no negative impact on the growth behavior and functional activity of CAR-T cells *in vitro*.

3.7. CD45^{ko}-CD19-CAR-T Cells Mediate Multiple Killing Rounds *In Vitro*

In a final experiment, we addressed the perseverance of CD45^{ko} CAR-T cells *in vitro*, and particularly their capability to be repetitively activated and exert cytotoxic activity. To do so, after transduction and knockout, we sorted CD19CAR T cells into CD45^{pos} and CD45^{ko} cells. Both populations were re-stimulated with either TransAct (following the manufacturer's protocol) or CD19^{pos}/GFP-transgenic Ramos cells (Figure 8A). For the first re-stimulation, we used Ramos cells at an E:T ratio of 5:1. However, at this ratio, the Ramos cells were rapidly eliminated as detected by FC after 48 h. Therefore, we used an excess of Ramos cells for the second re-stimulation (E:T ratio of 1:5). This re-stimulation provided a strong proliferation signal to both CD45^{pos} and CD45^{ko} CD19CAR-T cells, which grew faster than TransAct re-stimulated cells (Figure 8B). Moreover, re-stimulation with Ramos cells, but not with TransAct, resulted in a substantial increase in CD19CAR^{pos} T cells, independent of CD45 expression (Figure 8C). Despite the low starting E:T ratio,

GFP-positive Ramos cells (Figure 8D, insert) were essentially completely eliminated within 72 h of co-culture as demonstrated by FC (Figure 8D). At the end of the co-culture, we used re-stimulated CD45^{pos} and CD45^{ko} CD19CAR-T cells in our standard luciferase-based 4 h killing assay. As shown in Figure 8E, repeatedly stimulated CD19CAR-T cells showed strongly increased cytotoxic activity with approx. 90% killing rates within just 4 h of incubation (for comparison see Figure 7C). FC analysis indicated no difference in the expression of exhaustion markers PD-1 and TIM3 between CD45^{ko} and CD45^{pos} cells at the end of culture (Figure 8F). Together, these data prove that CD45^{ko} CAR-T cells can perform multiple rounds of killing and show no exhaustion phenotype in vitro.

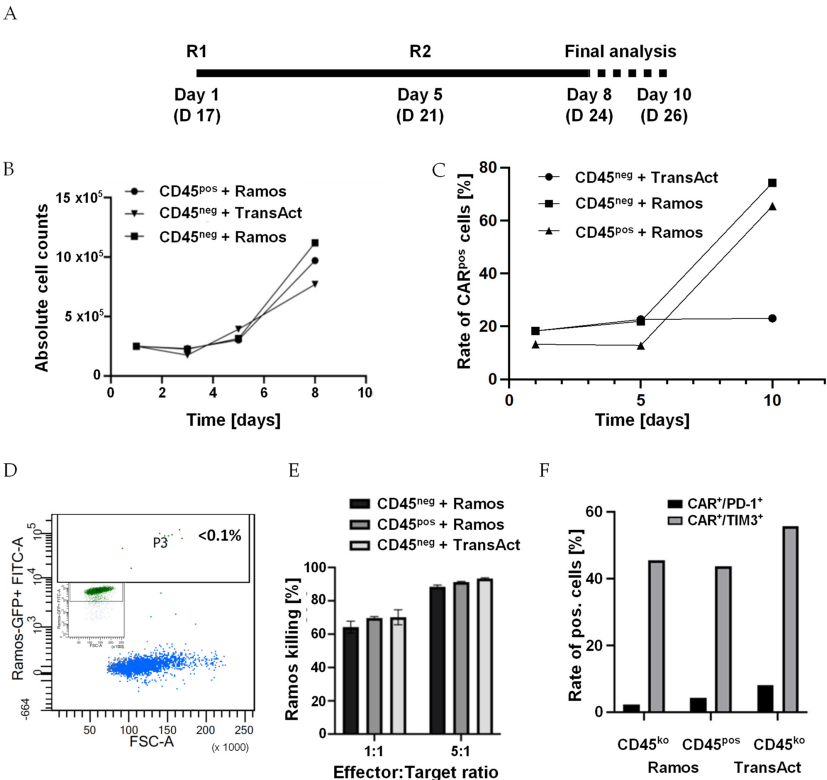


Figure 8. CD45^{ko} CAR-T cells are repeatedly re-stimulated by CD45^{pos} malignant cells. (A) Sorted CD45^{ko} and CD45^{pos} CD19 CAR-T cells were re-stimulated [R] on days 17 (new day 1) and 21 (5) of culture. Final analyses were performed by counting and FC on days 8 and 10. (B) Direct comparison of growth kinetics of CD45^{ko} and CD45^{pos} CD19 CAR-T cells after re-stimulation with CD19^{pos} Ramos cells on days 1 and 5. First re-stimulation with Ramos cells was performed at an E:T ratio of 5:1, second re-stimulation at an E:T ratio of 1:5. For control, CD45^{ko}/CD19CAR-T cells were also re-stimulated with TransAct. (C) Increased CAR expression after re-stimulation of both CD45^{pos} and CD45^{ko} CD19-CAR T cells with Ramos cells, but not with TransAct. (D) FC analysis of GFP^{pos} Ramos cells before (inset) and after 3 days co-culture with CD45^{ko}/CD19CAR-T cells (E:T ratio 1:5). (E) Re-stimulated CD45^{ko}/CD19CAR-T and CD45^{pos}/CD19CAR-T cells mediate efficient killing in the 4 h killing assay (3 technical replicates, E:T ratios normalized based on CAR expression). (F) Expression of exhaustion markers PD-1 and TIM3 on CAR-T cells in the different groups at final analysis.

4. Discussion

Data on the functionality of CD45^{ko} immune effector cells are scarce. Early work with the RNK-16 cell line (rat) revealed that wild-type cells, but not CD45-negative mutants were cytotoxically active [25]. In contrast, it was later shown in the mouse model that CD45-negative primary NK cells exhibited defects in activation, signal transduction and cytokine production, whereas cytotoxic activity was preserved in vitro, albeit to a reduced extent [26,27]. However, the observed residual functionality of CD45-negative primary NK cells in the mouse might not be predictive for human cells, since activation and signal transduction in murine and human NK cells are in part different. For example, murine and human NKG2D differ significantly in structure and the signaling pathways used [28]. Moreover, binding and “crosslinking” with anti-CD45 antibodies have been found to inhibit the cytotoxic effect of primary human NK cells, but not primary human T cells, although the exact mechanism remains to be elucidated. The antibodies could stimulate a cytotoxic-responsive function of CD45 or trigger an inhibitory effect [29–31].

Insights into the functionality of CD45-negative T cells are even more lacking, mainly because CD45^{−/−} mice develop only very few or no T cells [23]. Indeed, the role and relevance of CD45 does not only differ considerably between species, but also between T and NK cells [32]. Recent data point to a “gatekeeper” function of CD45 in T cells, which enables graded signaling outputs while filtering weak or spurious signaling events [33]. CAR-mediated T-cell activation was reported to be dependent on the size difference between the CAR-antigen pair and CD45 [34]. It is, therefore, unknown how CD45 knockout would affect T-cell effector function in terms of activation, proliferation, and cytotoxicity and even more so, when signaling occurs through a CAR.

In this study, we generated CD45^{ko}/CD45CAR-T and CD45^{ko}/CD19CAR-T cells and studied their functionality in vitro. The protocol established by us allows for efficient knockout of CD45 in primary T cells, enabling the production of CD45^{ko}CAR-T cells against different antigens, most relevantly CD45^{ko}/CD45CAR-T cells.

In the co-culture of CD45^{pos} and CD45^{ko} T cells, the relative proportion of the CD45-negative fraction was maintained over the total culture period of approx. three weeks. These data indicate that in vitro proliferation and survival of T lymphocytes were not affected by the CD45 knockout. Upon CD45-CAR transduction, residual CD45-positive cells were rapidly eliminated by fratricide, demonstrating the potent cytotoxicity of the CD45^{ko}/CD45CAR-T cells in vitro. Using various in vitro assays, we further observed high cytotoxic activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells against malignant cell lines Ramos and Nos-1FD4. The pronounced cytotoxicity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells was preserved even after four weeks of in vitro culture; a time frame substantially exceeding that for current large-scale production of commercially available CAR-T products.

Even though we observed pronounced functional activity of CD45^{ko}/CD45CAR-T cells, we could not fully exclude a potential negative impact of the knockout on their performance. Direct comparison with CD45-positive CD45CAR-T cells would not be meaningful, since in those cells the CAR-triggered effector function is compromised by fratricide. Therefore, we used an established CAR against CD19, to compare the CAR-triggered effector function of CD45^{pos} and CD45^{ko}/CD19CAR-T cells. We found a very similar effector functionality of CD45^{ko}/CD19CAR-T cells compared to CD45^{pos}/CD19CAR-T cells in terms of proliferation and cytotoxicity. Using an in vitro re-challenge model with CD19-positive Ramos cells we also observed that CD45^{ko}/CD19CAR-T cells had the same capability for serial re-stimulation and killing activity as CD45^{pos}/CD19CAR-T cells.

A recent study published very shortly before our first submission reported similar findings including efficient short-term cytotoxicity in vitro but impaired long-term cytotoxicity in an in vivo mouse model [35]. In our study, we provide data for the first time on the functionality of CD45^{ko} CAR-T cells after extended in vitro culture. Two different CAR readout systems (CD19 and CD45) indicated essentially identical activation, proliferation, and cytotoxic activities of CD45^{ko} and CD45^{pos} CD45CAR-T cells against Ramos cells over relatively long periods of in vitro culture, including the ability to perform multiple killings.

In addition, CD45^{ko}/CD45CAR-T cells mediated the efficient killing of AML cells even after four weeks of in vitro culture.

In order to further translate the proposed principle, it will obviously be essential to confirm the observed pronounced in vitro activity in suitable in vivo models. In their study, Wellhausen et al. [35] reported the inability of CD45^{ko} T cells equipped with a second-generation CD19-CAR to maintain long-term antitumor efficacy in NOD-SCID-IL2 γ ^{−/−} (NSG) mice, which was in striking contrast to CD45-epitope edited CAR-T cells. Unfortunately, they did not provide data on the activity of their CD45^{ko} CAR T cells after extended in vitro culture [35]. In this context, it could be relevant that contrary to their work we used a third-generation CAR construct. Third-generation CARs were previously shown to facilitate improved in vivo persistence/functionality [36–38], which might have contributed to the pronounced long-term activity observed in our in vitro models. To address this hypothesis, detailed analyses of signaling pathways will be required in subsequent studies.

Since CD45 is present on all nucleated hematopoietic cells, the clinical application of CD45-directed CAR-T cells is expected to be associated with broad on-target-off-tumor toxicity. Consequently, its use would require the rescue of the hematopoietic system by an autologous or allogeneic stem cell transplantation, which is a common procedure in high risk or refractory/relapsed blood cancers. In this context, the activity of the CD45^{ko}/CD45CAR-T cells will need to be terminated prior to stem cell infusion and thus limited potent short-term activity may not necessarily be a disadvantage. Alternatively, the termination or suppression of CAR-T activity could be achieved by transient expression of the CAR, introduction of one of several safety switches under investigation [39] or immunosuppressive conditioning agents like T-cell targeting antibodies. Finally, CD45 epitope editing [35] in the stem cell graft to protect the new hematopoiesis from the CD45-directed CAR-T cells might also be an opportunity.

5. Conclusions

We have reported the efficient generation of CD45^{ko}/CD45CAR-T and CD45^{ko}/CD19CAR-T cells with high functional activity in vitro. While our data provide important proof-of-concept for the suitability of CD45 as a CAR-T target and the functionality of CD45^{ko} CAR-T cells, it obviously will need confirmation in suitable animal models before potential translation into clinical testing. Importantly, in a parallel work Wellhausen et al. [35] has already provided strong in vivo evidence for the applicability of CD45-directed CARs for universal blood cancer immunotherapy using CD45 epitope base editing.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers16020334/s1>. Figure S1: Timeline of the experiment with BC#13-#15, CD45^{ko}/CD45CAR-T cells produced following protocol P1; Figure S2: Homogenous CD45 expression in (A) Ramos-GFP+ and (B) NOS-1-GFP+ cells. Cells were stained with VioBlue-labelled CD45 antibodies and analyzed by FC; Table S1: Comparison of cell outcomes at day 12 of protocols 1 & 2 for BC#6 (small-scale).

Author Contributions: M.H. performed experiments, analyzed and interpreted results, wrote the first version of manuscript, revised and approved the final manuscript; T.S. helped design and perform experiments, analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; D.G. helped design experiments, analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; M.J. helped design experiments, analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; A.U. performed experiments, revised and approved the final manuscript; N.K. analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; S.H. helped design experiments, analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; K.R. helped design experiments, analyzed and interpreted results, revised and approved the final manuscript; B.F. supervised the project, designed experiments, analyzed and interpreted results, wrote the first version of manuscript, revised and approved the final manuscript; F.A.A. conceived and supervised the project, designed experiments, analyzed and interpreted results, wrote the first

version of manuscript, revised and approved the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.H. was funded by the iPRIME Else-Kröner-Promotionskollegium.

Institutional Review Board Statement: On 11 July 2023 the Ethical committee of the Hamburg Chamber of Physicians sent a letter confirming that there is no need of formal approval for research with anonymized buffy coats with informed consent (Ref-No.: 2023-300348-WF).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all blood donors whose cells were used in the study.

Data Availability Statement: All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials. All raw data are available upon request.

Acknowledgments: We thank our colleagues from the Institute of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, for providing buffy coats. We are grateful to Melanie Lachmann, Julia Spötter, Susanne Roscher, Isabelle Sobor, and Regine Thiele from the UKE Cytometry and Cell Sorting Core Facility for expert support.

Conflicts of Interest: M.H., T.S., D.G., B.F. and F.A. are co-authors of patent applications related to the production and use of CD45CAR effector cells. All other authors declare no conflicts of interest associated with this work.

References

- Berdeja, J.G.; Madduri, D.; Usmani, S.Z.; Jakubowiak, A.; Agha, M.; Cohen, A.D.; Stewart, A.K.; Hari, P.; Htut, M.; Lesokhin, A.; et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): A phase 1b/2 open-label study. *Lancet* **2021**, *398*, 314–324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Munshi, N.C.; Anderson, L.D., Jr.; Shah, N.; Madduri, D.; Berdeja, J.; Lonial, S.; Raje, N.; Lin, Y.; Siegel, D.; Oriol, A.; et al. Idecabtagene vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 705–716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Abramson, J.S.; Palomba, M.L.; Gordon, L.L.; Lunning, M.A.; Wang, M.; Arnason, J.; Mehta, A.; Purev, E.; Maloney, D.G.; Andreadis, C.; et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): A multicentre seamless design study. *Lancet* **2020**, *396*, 839–852. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Schuster, S.J.; Bishop, M.R.; Tam, C.S.; Waller, E.K.; Borchmann, P.; McGuirk, J.P.; Jäger, U.; Jaglowski, S.; Andreadis, C.; Westin, J.R.; et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 45–56. [\[CrossRef\]](#)
- Maude, S.L.; Laetsch, T.W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M.R.; Stefanski, H.E.; Myers, G.D.; et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 439–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Neelapu, S.S.; Locke, F.L.; Bartlett, N.L.; Lekakis, L.J.; Miklos, D.B.; Jacobson, C.A.; Braunschweig, I.; Oluwole, O.O.; Siddiqi, T.; Lin, Y.; et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2531–2544. [\[CrossRef\]](#)
- Godwin, C.D.; McDonald, G.B.; Walter, R.B. Sinusoidal obstruction syndrome following CD33-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* **2017**, *129*, 2330–2332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sun, Y.; Wang, S.; Zhao, L.; Zhang, B.; Chen, H. IFN- γ and TNF- α aggravate endothelial damage caused by CD123-targeted CAR T cell. *OncoTargets Ther.* **2019**, *12*, 4907–4925. [\[CrossRef\]](#)
- Alexander, D.R. The CD45 tyrosine phosphatase: A positive and negative regulator of immune cell function. *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 349–359. [\[CrossRef\]](#)
- Omary, M.B.; Trowbridge, I.S.; Battifora, H.A. Human homologue of murine T200 glycoprotein. *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 842–852. [\[CrossRef\]](#)
- Andres, T.L.; Kadin, M.E. Immunologic markers in the differential diagnosis of small round cell tumors from lymphocytic lymphoma and leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **1983**, *79*, 546–552. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gundry, M.C.; Brunetti, L.; Lin, A.; Mayle, A.E.; Kitano, A.; Wagner, D.; Hsu, J.I.; Hoegenauer, K.A.; Rooney, C.M.; Goodell, M.A.; et al. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 1453–1461. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rautela, J.; Surgenor, E.; Huntington, N.D. Efficient genome editing of human natural killer cells by CRISPR RNP. *bioRxiv* **2018**. [\[CrossRef\]](#)
- Holmes, N. CD45: All is not yet crystal clear. *Immunology* **2006**, *117*, 145–155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lusso, P.; Cocchi, F.; Balotta, C.; Markham, P.D.; Louie, A.; Farci, P.; Pal, R.; Gallo, R.C.; Reitz, M.S., Jr. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): Failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* **1995**, *69*, 3712–3720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Weber, K.; Bartsch, U.; Stocking, C.; Fehse, B. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 698–706. [\[CrossRef\]](#)
17. Hambach, J.; Riecken, K.; Cichutek, S.; Schütze, K.; Albrecht, B.; Petry, K.; Röckendorf, J.L.; Baum, N.; Kröger, N.; Hansen, T.; et al. Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs). *Cells* **2020**, *9*, 321. [\[CrossRef\]](#)
18. Lin, Y.; Pagel, J.M.; Axworthy, D.; Pantelias, A.; Hedin, N.; Press, O.W. A genetically engineered anti-CD45 single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted radioimmunotherapy of hematologic malignancies. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3884–3892. [\[CrossRef\]](#)
19. Hildinger, M.; Abel, K.L.; Ostertag, W.; Baum, C. Design of 5′ untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4083–4089. [\[CrossRef\]](#)
20. Schambach, A.; Mueller, D.; Galla, M.; Verstegen, M.M.; Wagemaker, G.; Loew, R.; Baum, C.; Bohne, J. Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1524–1533. [\[CrossRef\]](#)
21. Mirow, M.; Schwarze, L.I.; Fehse, B.; Riecken, K. Efficient Pseudotyping of Different Retroviral Vectors Using a Novel, Codon-Optimized Gene for Chimeric GALV Envelope. *Viruses* **2021**, *13*, 1471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Fehse, B.; Schade, U.M.; Li, Z.; Uhde, A.; Koch, S.; Goller, B.; Rüger, R.; Fehse, N.; Stockschröder, M.; Zander, A.R. Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br. J. Haematol.* **1998**, *102*, 566–574. [\[CrossRef\]](#)
23. Ogilvy, S.; Louis-Dit-Sully, C.; Cooper, J.; Cassady, R.L.; Alexander, D.R.; Holmes, N. Either of the CD45RB and CD45RO isoforms are effective in restoring T cell, but not B cell, development and function in CD45-null mice. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 1792–1800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Jonnalagadda, M.; Mardiros, A.; Urak, R.; Wang, X.; Hoffman, L.J.; Bernanke, A.; Chang, W.C.; Bretzlaff, W.; Starr, R.; Priceman, S.; et al. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 757–768. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Bell, G.M.; Dethloff, G.M.; Imboden, J.B. CD45-negative mutants of a rat natural killer cell line fail to lyse tumor target cells. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3646–3653. [\[CrossRef\]](#)
26. Hesslein, D.G.; Takaki, R.; Hermiston, M.L.; Weiss, A.; Lanier, L.L. Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7012–7017. [\[CrossRef\]](#)
27. Huntington, N.D.; Xu, Y.; Nutt, S.L.; Tarlinton, D.M. A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1421–1433. [\[CrossRef\]](#)
28. Rosen, D.B.; Araki, M.; Hamerman, J.A.; Chen, T.; Yamamura, T.; Lanier, L.L. A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 2470–2478. [\[CrossRef\]](#)
29. Sparrow, R.L.; McKenzie, I.F. A function for human T200 in natural killer cytotoxicity. *Transplantation* **1983**, *36*, 166–171. [\[CrossRef\]](#)
30. Starling, G.C.; Hart, D.N. CD45 molecule cross-linking inhibits natural killer cell-mediated lysis independently of lytic triggering. *Immunology* **1990**, *71*, 190–195.
31. Starling, G.C.; Davidson, S.E.; McKenzie, J.L.; Hart, D.N. Inhibition of natural killer-cell mediated cytotoxicity with monoclonal antibodies to restricted and non-restricted epitopes of the leucocyte common antigen. *Immunology* **1987**, *61*, 351–356. [\[PubMed\]](#)
32. Martin, S.M.; Mehta, I.K.; Yokoyama, W.M.; Thomas, M.L.; Lorenz, R.G. Development of intestinal intraepithelial lymphocytes, NK cells, and NK 1.1+ T cells in CD45-deficient mice. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 6066–6073. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Courtney, A.H.; Shvets, A.A.; Lu, W.; Griffante, G.; Mollenauer, M.; Horkova, V.; Lo, W.L.; Yu, S.; Stepanek, O.; Chakraborty, A.K.; et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Sci. Signal.* **2019**, *12*, eaaw8151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Xiao, Q.; Zhang, X.; Tu, L.; Cao, J.; Hinrichs, C.S.; Su, X. Size-dependent activation of CAR-T cells. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eabl3995. [\[CrossRef\]](#)
35. Wellhausen, N.; O’Connell, R.P.; Lesch, S.; Engel, N.W.; Rennels, A.K.; Gonzales, D.; Herbst, F.; Young, R.M.; Garcia, K.C.; Weiner, D.; et al. Epitope base editing CD45 in hematopoietic cells enables universal blood cancer immune therapy. *Sci. Transl. Med.* **2023**, *15*, eadi1145. [\[CrossRef\]](#)
36. Pulè, M.A.; Straathof, K.C.; Dotti, G.; Heslop, H.E.; Rooney, C.M.; Brenner, M.K. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 933–941. [\[CrossRef\]](#)
37. Zhong, X.S.; Matsushita, M.; Plotkin, J.; Riviere, I.; Sadelain, M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 413–420. [\[CrossRef\]](#)
38. Zhao, Z.; Condomines, M.; van der Stegen, S.J.C.; Perna, F.; Kloss, C.C.; Gunset, G.; Plotkin, J.; Sadelain, M. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 415–428. [\[CrossRef\]](#)
39. Sahilliglu, A.C.; Schumacher, T.N. Safety switches for adoptive cell therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2022**, *74*, 190–198. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4 Zusammenfassung

4.1 Englisch

Until today, allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) is the only curative therapy for relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML). Despite major progress made in the last decades a significant risk of therapy-related complications and mortality as well as relapse of AML remains. A targeted conditioning may enable potent anti-malignancy effects while lowering the toxicity. CD45 is expressed on most normal and malignant hematopoietic cells and thus represents an ideal target for this approach.

In this work different therapeutic approaches targeting the CD45 protein were tested in vitro. Knockout of CD45 was established to avoid fratricide of effector cells. Both CD45^{ko}CD45-CAR-T and CD45^{ko}CD45CAR-KHYG-1 NK cells showed efficient and specific cytotoxic activity in luciferase- and flow-cytometry based co-culture assays, even after prolonged in vitro culture of the CAR-T cells. In addition, killing assays with bispecific antibodies directed against CD45 showed effective elimination of CD45^{pos} target cells using NK and T cells as effector cells. Both the CD45^{ko}CD45CAR-KHYG-1 and the bispecific antibodies would be available off-the-shelf.

4.2 Deutsch

Die allogene SZT ist aktuell die einzige Heilungsmöglichkeit für Patienten mit einer refraktären oder rezidierten AML und ist trotz der Fortschritte der letzten Jahrzehnte mit einem erheblichen Risiko für therapiebedingte Komplikationen und Sterblichkeit sowie Rezidive der AML verbunden. Eine gezieltere Konditionierungstherapie könnte die Toxizität dieser Therapie senken. CD45 ist auf den meisten gesunden und malignen hämatopoetischen Zellen exprimiert und bietet somit ein ideales Target.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche gegen das CD45-Protein gerichtete Therapieansätze in vitro getestet. Ein CD45-KO wurde etabliert, um Fratrizid der Effektorzellen zu vermeiden. Sowohl CD45^{ko}CD45-CAR-T als auch CD45^{ko}CD45CAR-KHYG-1-NK-Zellen zeigten eine effektive und spezifische zytotoxische Aktivität in Luciferase- und Durchflusszytometrie-basierten Ko-Kulturassays. Darüber hinaus konnte auch mit CD45-gerichteten bispezifischen Antikörpern CD45^{pos} Zielzellen in Killing Assays sowohl mit NK- als auch mit T-Zellen als Effektorzellen effektiv eliminiert werden. Sowohl die CD45CAR-KHYG-1 als auch die bispezifischen Antikörper würden unmittelbar verfügbare „*off-the-shelf*“ Therapien ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

- Abramson, J. S., Palomba, M. L., Gordon, L. I., Lunning, M. A., Wang, M., Arnason, J., Mehta, A., Purev, E., Maloney, D. G., Andreadis, C., Sehgal, A., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Garcia, J., Kostic, A., Mallaney, M., Ogasawara, K., Newhall, K., Kim, Y., Li, D. & Siddiqi, T. 2020. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 396, 839-852.
- Alcantara, M., Tesio, M., June, C. H. & Houot, R. 2018. CAR T-cells for T-cell malignancies: challenges in distinguishing between therapeutic, normal, and neoplastic T-cells. *Leukemia*, 32, 2307-2315.
- Amatya, C., Pegues, M. A., Lam, N., Vanasse, D., Geldres, C., Choi, S., Hewitt, S. M., Feldman, S. A. & Kochenderfer, J. N. 2021. Development of CAR T Cells Expressing a Suicide Gene Plus a Chimeric Antigen Receptor Targeting Signaling Lymphocytic-Activation Molecule F7. *Mol Ther*, 29, 702-717.
- Andres, T. L. & Kadin, M. E. 1983. Immunologic markers in the differential diagnosis of small round cell tumors from lymphocytic lymphoma and leukemia. *Am J Clin Pathol*, 79, 546-52.
- Arvindam, U. S., Van Hauten, P. M. M., Schirm, D., Schaap, N., Hobo, W., Blazar, B. R., Vallera, D. A., Dolstra, H., Felices, M. & Miller, J. S. 2021. A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killing of AML cells. *Leukemia*, 35, 1586-1596.
- Ayuk F, Fehse B, Harfmann M, Glow D & T, S. 2024a. *Modified NK cell expressing a chimeric antigen receptor (patent application, unpublished)*.
- Ayuk F, Harfmann M, Fehse B, Riecken K, Möller C, Hambach J & F, K.-N. 2024b. *Antibody for use in a therapy involving effector cell engagement. EP22211271.6 (pending)*. EP22211271.6.
- Ayuk, F., Li, Z., Kühlcke, K., Lindemann, C., Schade, U., Eckert, H. G., Zander, A. & Fehse, B. 1999. Establishment of an optimised gene transfer protocol for human primary T lymphocytes according to clinical requirements. *Gene Ther*, 6, 1788-92.
- Baker, D. J., Arany, Z., Baur, J. A., Epstein, J. A. & June, C. H. 2023. CAR T therapy beyond cancer: the evolution of a living drug. *Nature*, 619, 707-715.
- 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., Riethmüller, 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, 974-7.
- Berdeja, J. G., Madduri, D., Usmani, S. Z., Jakubowiak, A., Agha, M., Cohen, A. D., Stewart, A. K., Hari, P., Htut, M., Lesokhin, A., Deol, A., Munshi, N. C., O'donnell, E., Avigan, D., Singh, I., Zudaire, E., Yeh, T.-M., Allred, A. J., Olyslager, Y., Banerjee, A., Jackson, C. C., Goldberg, J. D., Schechter, J. M., Deraedt, W., Zhuang, S. H., Infante, J., Geng, D., Wu, X., Carrasco-Alfonso, M. J., Akram, M., Hossain, F., Rizvi, S., Fan, F., Lin, Y., Martin, T. & Jagannath, S. 2021. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *The Lancet*, 398, 314-324.

- Billingsley, M. M., Hamilton, A. G., Mai, D., Patel, S. K., Swingle, K. L., Sheppard, N. C., June, C. H. & Mitchell, M. J. 2022. Orthogonal Design of Experiments for Optimization of Lipid Nanoparticles for mRNA Engineering of CAR T Cells. *Nano Letters*, 22, 533-542.
- Billingsley, M. M., Singh, N., Ravikumar, P., Zhang, R., June, C. H. & Mitchell, M. J. 2020. Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. *Nano Lett*, 20, 1578-1589.
- Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C. & Bordignon, C. 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 276, 1719-24.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. & Long, E. O. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107, 159-66.
- Cornelissen, J. J., Breems, D., Van Putten, W. L. J., Gratwohl, A. A., Passweg, J. R., Pabst, T., Maertens, J., Beverloo, H. B., Van Marwijk Kooy, M., Wijermans, P. W., Biemond, B. J., Vellenga, E., Verdonck, L. F., Ossenkoppele, G. J. & Löwenberg, B. 2012. Comparative Analysis of the Value of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With Monosomal Karyotype Versus Other Cytogenetic Risk Categories. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 2140-2146.
- Di Stasi, A., Tey, S. K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M. & Brenner, M. K. 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 365, 1673-83.
- Fehse, B., Ayuk, F. A., Kröger, N., Fang, L., Kühlcke, K., Heinzelmann, M., Zabelina, T., Fauser, A. A. & Zander, A. R. 2004. Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide gene-modified T lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells. *Blood*, 104, 3408-9.
- Godwin, C. D., McDonald, G. B. & Walter, R. B. 2017. Sinusoidal obstruction syndrome following CD33-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*, 129, 2330-2332.
- Gundry, M. C., Brunetti, L., Lin, A., Mayle, A. E., Kitano, A., Wagner, D., Hsu, J. I., Hoegenauer, K. A., Rooney, C. M., Goodell, M. A. & Nakada, D. 2016. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep*, 17, 1453-1461.
- Gysel, E., Larijani, L., Kallos, M. S. & Krawetz, R. J. 2023. Suicide gene-enabled cell therapy: A novel approach to scalable human pluripotent stem cell quality control. *Bioessays*, 45, e2300037.
- Gyurkocza, B., Nath, R., Seropian, S., Choe, H., Litzow, M. R., Koshy, N. V., Stiff, P., Abboud, C., Tomlinson, B., Abhyankar, S., Hari, P., Al-Kadhim, Z. S., Chen, G. L., Sabloff, M., Orozco, J. J., Foran, J. M., Kebriaei, P., Jamieson, K. J., Magalhaes-Silverman, M. M., Van Besien, K., Schuster, M. W., Law, A., Levy, M., Lazarus, H. M., Giralt, S. A., Berger, M. S., Spross, J. A., Desai, A. G., Reddy, V. & Pagel, J. M. 2021. Clinical Experience in the Randomized Phase 3 Sierra Trial: Anti-CD45 Iodine (131I) Apamistamab [lomab-B] Conditioning Enables Hematopoietic Cell Transplantation with Successful Engraftment and Acceptable Safety in Patients with Active, Relapsed/Refractory AML Not Responding to Targeted Therapies. *Blood*, 138, 1791.

- Gyurkocza, B., Storb, R., Storer, B. E., Chauncey, T. R., Lange, T., Shizuru, J. A., Langston, A. A., Pulsipher, M. A., Bredeson, C. N., Maziarz, R. T., Bruno, B., Petersen, F. B., Maris, M. B., Agura, E., Yeager, A., Bethge, W., Sahebi, F., Appelbaum, F. R., Maloney, D. G. & Sandmaier, B. M. 2010. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 28, 2859-67.
- Hambach, J., Riecken, K., Cichutek, S., Schütze, K., Albrecht, B., Petry, K., Röckendorf, J. L., Baum, N., Kröger, N., Hansen, T., Schuch, G., Haag, F., Adam, G., Fehse, B., Bannas, P. & Koch-Nolte, F. 2020. Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs). *Cells*, 9.
- Harfmann, M., Schröder, T., Glów, D., Jung, M., Uhde, A., Kröger, N., Horn, S., Riecken, K., Fehse, B. & Ayuk, F. A. 2024. CD45-Directed CAR-T Cells with CD45 Knockout Efficiently Kill Myeloid Leukemia and Lymphoma Cells In Vitro Even after Extended Culture. *Cancers*, 16, 334.
- Holmes, N. 2006. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, 117, 145-55.
- Horowitz, M., Schreiber, H., Elder, A., Heidenreich, O., Vormoor, J., Toffalori, C., Vago, L. & Kröger, N. 2018. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 53, 1379-1389.
- Jentsch, M., Bischof, L., Backhaus, D., Brauer, D., Schulz, J., Franke, G. N., Vucinic, V., Niederwieser, D., Platzbecker, U. & Schwind, S. 2022. Impact of MRD status in patients with AML undergoing allogeneic stem cell transplantation in the first vs the second remission. *Blood Adv*, 6, 4570-4580.
- Klein, C., Brinkmann, U., Reichert, J. M. & Kontermann, R. E. 2024. The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*.
- Klingemann, H. 2023. The NK-92 cell line-30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer. *Cytotherapy*, 25, 451-457.
- Lin, Y., Pagel, J. M., Axworthy, D., Pantelias, A., Hedin, N. & Press, O. W. 2006. A genetically engineered anti-CD45 single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted radioimmunotherapy of hematologic malignancies. *Cancer Res*, 66, 3884-92.
- Liu, J., Zhang, Y., Guo, R., Zhao, Y., Sun, R., Guo, S., Lu, W. & Zhao, M. 2023. Targeted CD7 CAR T-cells for treatment of T-Lymphocyte leukemia and lymphoma and acute myeloid leukemia: recent advances. *Front Immunol*, 14, 1170968.
- Lusso, P., Cocchi, F., Balotta, C., Markham, P. D., Louie, A., Farci, P., Pal, R., Gallo, R. C. & Reitz, M. S., Jr. 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol*, 69, 3712-20.
- Mamonkin, M., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Sharma, S., Gomes-Silva, D., Mo, F., Krenciute, G., Orange, J. S. & Brenner, M. K. 2018. Reversible Transgene Expression Reduces Fratricide and Permits 4-1BB Costimulation of CAR T Cells Directed to T-cell Malignancies. *Cancer Immunol Res*, 6, 47-58.
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L. & Grupp, S. A. 2014. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371, 1507-17.
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose,

- B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., Baruchel, A., Boissel, N., Mechinaud, F., Balduzzi, A., Krueger, J., June, C. H., Levine, B. L., Wood, P., Taran, T., Leung, M., Mueller, K. T., Zhang, Y., Sen, K., Lebwohl, D., Pulsipher, M. A. & Grupp, S. A. 2018. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 378, 439-448.
- Mirow, M., Schwarze, L. I., Fehse, B. & Riecken, K. 2021. Efficient Pseudotyping of Different Retroviral Vectors Using a Novel, Codon-Optimized Gene for Chimeric GALV Envelope. *Viruses*, 13.
- Munshi, N. C., Anderson, L. D., Jr., Shah, N., Madduri, D., Berdeja, J., Lonial, S., Raje, N., Lin, Y., Siegel, D., Oriol, A., Moreau, P., Yakoub-Agha, I., Delforge, M., Cavo, M., Einsele, H., Goldschmidt, H., Weisel, K., Rambaldi, A., Reece, D., Petrocca, F., Massaro, M., Connarn, J. N., Kaiser, S., Patel, P., Huang, L., Campbell, T. B., Hege, K. & San-Miguel, J. 2021. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 384, 705-716.
- Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., McSweeney, P., Munoz, J., Avivi, I., Castro, J. E., Westin, J. R., Chavez, J. C., Ghobadi, A., Komanduri, K. V., Levy, R., Jacobsen, E. D., Witzig, T. E., Reagan, P., Bot, A., Rossi, J., Navale, L., Jiang, Y., Aycock, J., Elias, M., Chang, D., Wiecek, J. & Go, W. Y. 2017. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 377, 2531-2544.
- Omary, M. B., Trowbridge, I. S. & Battifora, H. A. 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. *J Exp Med*, 152, 842-52.
- Pagel, J. M., Appelbaum, F. R., Eary, J. F., Rajendran, J., Fisher, D. R., Gooley, T., Ruffner, K., Nemecek, E., Sickle, E., Durack, L., Carreras, J., Horowitz, M. M., Press, O. W., Gopal, A. K., Martin, P. J., Bernstein, I. D. & Matthews, D. C. 2006. 131I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission. *Blood*, 107, 2184-91.
- Pagel, J. M., Gooley, T. A., Rajendran, J., Fisher, D. R., Wilson, W. A., Sandmaier, B. M., Matthews, D. C., Deeg, H. J., Gopal, A. K., Martin, P. J., Storb, R. F., Press, O. W. & Appelbaum, F. R. 2009. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, 114, 5444-53.
- Palchaudhuri, R., Saez, B., Hoggatt, J., Schajnovitz, A., Sykes, D. B., Tate, T. A., Czechowicz, A., Kfoury, Y., Ruchika, F., Rossi, D. J., Verdine, G. L., Mansour, M. K. & Scadden, D. T. 2016. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin. *Nat Biotechnol*, 34, 738-45.
- Portell, C. A., Wenzell, C. M. & Advani, A. S. 2013. Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol*, 5, 5-11.
- Porter, D. L., Hwang, W. T., Frey, N. V., Lacey, S. F., Shaw, P. A., Loren, A. W., Bagg, A., Marcucci, K. T., Shen, A., Gonzalez, V., Ambrose, D., Grupp, S. A., Chew, A., Zheng, Z., Milone, M. C., Levine, B. L., Melenhorst, J. J. & June, C. H. 2015. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 7, 303ra139.

- Prazeres, P., Ferreira, H., Costa, P. a. C., Da Silva, W., Alves, M. T., Padilla, M., Thatte, A., Santos, A. K., Lobo, A. O., Sabino, A., Del Puerto, H. L., Mitchell, M. J. & Guimaraes, P. P. G. 2023. Delivery of Plasmid DNA by Ionizable Lipid Nanoparticles to Induce CAR Expression in T Cells. *Int J Nanomedicine*, 18, 5891-5904.
- Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., Ghorashian, S., Pinner, D., Ahsan, G., Gilmour, K., Lucchini, G., Inglott, S., Mifsud, W., Chiesa, R., Peggs, K. S., Chan, L., Farzeneh, F., Thrasher, A. J., Vora, A., Pule, M. & Veys, P. 2017. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*, 9.
- Rautela, J., Surgenor, E. & Huntington, N. D. 2020. Drug target validation in primary human natural killer cells using CRISPR RNP. *J Leukoc Biol*, 108, 1397-1408.
- Röllig, C., Ayuk, F. A., Braess, J., Heuser, M., Manz, M. G., Passweg, J., Reinhardt, D., Schlenk, R. F. & Zebisch, A. 2023. *Onkopedia Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML)* [Online]. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Available: https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@_guideline/html/index.html#ID0EWYAG [Accessed 16.09.2024].
- Saha, A., Hyzy, S., Lamothe, T., Hammond, K., Clark, N., Lanieri, L., Bhattarai, P., Palchaudhuri, R., Gillard, G. O., Proctor, J., Riddle, M. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Macmillan, M. L., Wagner, J. E., Kiem, H. P., Olson, L. M. & Blazar, B. R. 2022. A CD45-targeted antibody-drug conjugate successfully conditions for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice. *Blood*, 139, 1743-1759.
- Schuster, S. J., Bishop, M. R., Tam, C. S., Waller, E. K., Borchmann, P., McGuirk, J. P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J. R., Fleury, I., Bachanova, V., Foley, S. R., Ho, P. J., Mielke, S., Magenau, J. M., Holte, H., Pantano, S., Pacaud, L. B., Awasthi, R., Chu, J., Anak, Ö., Salles, G. & Maziarsz, R. T. 2018. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 380, 45-56.
- Shimoni, A., Radici, V. & Nagler, A. 2024. Conditioning. In: SUREDA, A., CORBACIOGLU, S., GRECO, R., KRÖGER, N. & CARRERAS, E. (eds.) *The EBMT Handbook: Hematopoietic Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing.
- Spyridonidis, A., Labopin, M., Savani, B. N., Niittyvuopio, R., Blaise, D., Craddock, C., Socié, G., Platzbecker, U., Beelen, D., Milpied, N., Cornelissen, J. J., Ganser, A., Huynh, A., Giskevicius, L., Giebel, S., Aljurf, M., Brissot, E., Malard, F., Esteve, J., Peric, Z., Baron, F., Ruggeri, A., Schmid, C., Gilleece, M., Gorin, N. C., Lanza, F., Shouval, R., Versluis, J., Bug, G., Fløisand, Y., Ciceri, F., Sanz, J., Bazarbachi, A., Nagler, A. & Mohty, M. 2020. Redefining and measuring transplant conditioning intensity in current era: a study in acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*, 55, 1114-1125.
- Srikanthan, M. A., Humbert, O., Haworth, K. G., Ironside, C., Rajawat, Y. S., Blazar, B. R., Palchaudhuri, R., Boitano, A. E., Cooke, M. P., Scadden, D. T. & Kiem, H. P. 2020. Effective Multi-lineage Engraftment in a Mouse Model of Fanconi Anemia Using Non-genotoxic Antibody-Based Conditioning. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 17, 455-464.
- Stikvoort, A., Van Der Schans, J., Sarkar, S., Poels, R., Ruiter, R., Naik, J., Yuan, H., De Bruijn, J. D., Van De Donk, N. W. C. J., Zweegman, S., Themeli, M., Groen,

- R., O'dwyer, M. & Mutis, T. 2021. CD38-specific Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer KHYG-1 Cells: A Proof of Concept for an "Off the Shelf" Therapy for Multiple Myeloma. *HemaSphere*, 5.
- Sun, Y., Wang, S., Zhao, L., Zhang, B. & Chen, H. 2019. IFN- γ and TNF- α aggravate endothelial damage caused by CD123-targeted CAR T cell. *Onco Targets Ther*, 12, 4907-4925.
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A. P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D. & Yu, J. 2018. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*, 8, 1083-1089.
- Tsirigotis, P., Byrne, M., Schmid, C., Baron, F., Ciceri, F., Esteve, J., Gorin, N. C., Giebel, S., Mohty, M., Savani, B. N. & Nagler, A. 2016. Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation*, 51, 1431-1438.
- Tuazon, S. A., Sandmaier, B. M., Gooley, T. A., Fisher, D. R., Holmberg, L. A., Becker, P. S., Lundberg, S. J., Orozco, J. J., Gopal, A. K., Till, B. G., Coffey, D. G., Nartea, M. E., Matesan, M. C., Pagel, J. M., Rajendran, J. G., Press, O. W., Bensinger, W. I. & Green, D. J. 2021. (90)Y-labeled anti-CD45 antibody allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 56, 202-209.
- Vallera, D. A., Felices, M., Mcelmurry, R., Mccullar, V., Zhou, X., Schmohl, J. U., Zhang, B., Lenvik, A. J., Panoskaltis-Mortari, A., Verneris, M. R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D. J., Blazar, B. R. & Miller, J. S. 2016. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res*, 22, 3440-50.
- Vo, P., Gooley, T. A., Rajendran, J. G., Fisher, D. R., Orozco, J. J., Green, D. J., Gopal, A. K., Haaf, R., Nartea, M., Storb, R., Appelbaum, F. R., Press, O. W., Pagel, J. M. & Sandmaier, B. M. 2020. Yttrium-90-labeled anti-CD45 antibody followed by a reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with relapsed/refractory leukemia or myelodysplasia. *Haematologica*, 105, 1731-1737.
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. & Fehse, B. 2008. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther*, 16, 698-706.
- Wellhausen, N., O'connell, R. P., Lesch, S., Engel, N. W., Rennels, A. K., Gonzales, D., Herbst, F., Young, R. M., Garcia, K. C., Weiner, D., June, C. H. & Gill, S. I. 2023. Epitope base editing CD45 in hematopoietic cells enables universal blood cancer immune therapy. *Sci Transl Med*, 15, eadi1145.
- Yagita, M., Huang, C. L., Umehara, H., Matsuo, Y., Tabata, R., Miyake, M., Konaka, Y. & Takatsuki, K. 2000. A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. *Leukemia*, 14, 922-30.
- Zhang, M., Lam, K. P. & Xu, S. 2023. Natural Killer Cell Engagers (NKCEs): a new frontier in cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 14, 1207276.
- Zhao, Z., Condomines, M., Van Der Stegen, S. J. C., Perna, F., Kloss, C. C., Gunset, G., Plotkin, J. & Sadelain, M. 2015. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*, 28, 415-428.

Zhong, X. S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. & Sadelain, M. 2010. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*, 18, 413-20.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englischer Begriff	Deutscher Begriff
ADC	Antibody-Drug Conjugate	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate
AK	Antibody	Antikörper
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Acute Myeloid Leukemia	Akute Myeloische Leukämie
BC	Buffy Coat	-
BCMA	B Cell Maturation Antigen	B-Zell Reifungsantigen
BFP	Blue Fluorescent Protein	Blau-Fluoreszierendes Protein
BiTE	Bispecific T Cell Engager	Bispezifischer T-Zell-Engager
CAR	Chimeric Antigen Receptor	Chimärer Antigen-Rezeptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	-
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation	-
ELN	European Leukemia Network	-
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
DFZ	Flow Cytometry	Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration	-
GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus	-
GFP	Green Fluorescent Protein	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	-
GVHD	Graft-versus-Host Disease	Spender-gegen-Wirt-Reaktion
HLA	Human Leukocyte Antigens	Humane Leukozytenantigene
HSV-TK	Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase	-
IL-2	Interleukin 2	-
IRES	Internal Ribosome Entry Site	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
KO	Knockout	-
LNP	Lipid Nanoparticles	Lipid-Nanopartikel

MAC	Myeloablative Conditioning	Myeloablative Konditionierung
MACS	Magnetic Cell Sorting	Magnetische Zellsortierung
MDS	Myelodysplastic Syndrome	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	Multiplicity of Infection	Multiplizität der Infektion
MRD	Measurable Residual Disease	Minimale Resterkrankung
NEAA	Non-Essential Amino Acid	Nicht-Essenzielle Aminosäure
NK Zellen	Natural Killer Cells	Natürliche Killer-Zellen
OS	Overall Survival	Gesamtüberleben
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Mononukleäre Zellen des Peripheren Blutes
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEBL	Protein Expression Blocker	-
RIC	Reduced Intensity Conditioning	Konditionierung mit reduzierter Intensität
RN	RetroNectin	-
RNP	Ribonucleoprotein Complex	Ribonuklein-Proteinkomplex
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medium)	-
RT	Room Temperature	Raumtemperatur
scFv	Single-chain Variable Fragment	-
sgRNA	Single Guide Ribonucleic Acid	Single Guide Ribonukleinsäure
SOS	Sinusoidal Obstruction Syndrome	-
SZT	Stem Cell Transplantation	Stammzelltransplantation
TA	T Cell TransAct	-
TBI	Total Body Irradiation	Ganzkörperbestrahlung
TCI	Transplant Conditioning Intensity	Intensität der Konditionierung vor Transplantation
TCR	T Cell Receptor	T-Zell-Rezeptor
TM	Transmembrane	Transmembran
TRM	Transplant-related Mortality	Transplantations-assoziierte Mortalität
UKE		Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Y90	Yttrium-90	Yttrium-90

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 aus (Ayuk F et al., 2024b) Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von primären T-Zellen (BC#12) als Effektorzellen im Verhältnis 5:1. Read-out nach 22 h Inkubation. _____ 22

Abbildung 2 aus (Ayuk F et al., 2024b) Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von KHYG-1-Zellen als Effektorzellen im Verhältnis 1:1. Read-out nach 4 h Inkubation. _____ 23

Abbildung 3 Unveröffentlichte Daten aus (Ayuk F et al., 2024a). Luciferase-Killing Assay mit Ramos-Luc2 als Target-Zellen. Zugabe von KHYG-1-Zellen als Effektorzellen im Verhältnis 1:1 und 5:1. Read-out nach 4 h Inkubation. _____ 24

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kulturbedingungen und Referenz der verwendeten Zelllinien _____ 6

Tabelle 2 Elektroporationsbedingungen _____ 9

Tabelle 3 Zeitlicher Ablauf der Protokolle P1 und P2 _____ 11

9 Erklärung des Eigenanteils

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Stammzelltransplantation in der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie der Klinik für Stammzelltransplantation unter der Betreuung von Prof. Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse durchgeführt. Mein Anteil an der Publikation ist im Folgenden aufgeführt.

Die Forschungsfrage und somit Grundlage des Projekts wurde von Prof. Dr. F. Ayuk entwickelt. An der Planung der Experimente war ich maßgeblich beteiligt. Die Etablierung der Methoden erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. B. Fehse, T. Schröder, Dr. D. Glow, Dr. K. Riecken und Dr. S. Horn.

Sämtliche Zellkulturversuche und genetische Modifikationen habe ich eigenständig durchgeführt, auch die Durchflusszytometrie inklusive der grafischen und statistischen Analysen und in der Publikation veröffentlichten Abbildungen habe ich selbstständig durchgeführt und interpretiert.

Zusammen mit Prof. Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse habe ich die erste Version des Manuskripts verfasst, welches von den Koautoren überarbeitet wurde.

Die Planung und Ergebnisse der Experimente wurden regelmäßig mit meinen Betreuern Prof. Dr. F. Ayuk und Prof. Dr. B. Fehse besprochen und wissenschaftlich supervidiert.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ayuk für die Möglichkeit, an diesem spannenden Promotionsthema arbeiten zu dürfen, und die durchgehend zuverlässige Betreuung während der gesamten Arbeit. Seine hohe Motivation und stets vorhandener Rückhalt haben mir die nötige Sicherheit gegeben, auch schwierige Phasen zu meistern. Durch den regelmäßigen Austausch und die dadurch entstandenen Impulse und Ideen konnte sich das Projekt optimal entwickeln und sein Vertrauen in meine Arbeit gab mir den nötigen Freiraum zur wissenschaftlichen Entfaltung.

Prof. Dr. Fehse danke ich für die hervorragende Betreuung im Labor und die stets zeitnahe Beantwortung aller meiner Fragen. Mit seiner Expertise auf dem Gebiet der Zell- und Gentherapie konnten viele Herausforderungen gemeistert und der Fokus auf das Wesentliche gerichtet werden.

Die exzellente wissenschaftliche Betreuung durch Prof Dr. Ayuk und Prof Dr. Fehse in diesem spannenden und dynamischen Forschungsgebiet hat mich nachhaltig für die wissenschaftliche Arbeit im Allgemeinen und speziell in der Zelltherapie begeistern können und meinen weiteren Lebensweg maßgeblich mitgeprägt.

Tanja Schröder und Almut Uhde danke ich für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen Labormethoden. Beide haben mich durch alle Phasen dieser Arbeit begleitet, mir jederzeit zur Seite gestanden und die Zeit im Labor auch persönlich zu einer wertvollen Erfahrung gemacht.

Bei allen Mitarbeitern der AG Fehse möchte ich mich für die stets motivierende und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt Kristoffer Rieken und Sophia Cichutek sowie Max Jung für ihre Unterstützung beim CAR-Design und der Bereitstellung der Vektoren. Darüber hinaus danke ich Stefan Horn für die Bereitstellung der von ihm im Labor etablierten AML-Zelllinie NOS-1 sowie seine Hilfe bei den entsprechenden Experimenten. Dawid Glów danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz ganz speziell bei der Etablierung des CD45-Knockouts. Sein Durchhaltevermögen und seine innovativen Ideen haben wesentlich zum Erfolg des Projekts beigetragen – *Thank you so much for your amazing support!*

Des Weiteren möchte ich dem iPRIME Else-Kröner-Promotionskollegium für die finanzielle und auch wissenschaftliche Unterstützung meiner Promotion danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin danke ich für die Bereitstellung der *Buffy Coats* und besonders den Blutspendern für ihren Beitrag zur Forschung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht, sondern mich auch in dieser intensiven Lebensphase emotional unterstützt und alle meine Entscheidungen mitgetragen haben.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und besonders meinem Partner für ihre Unterstützung und Kaffeeversorgung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit danken.