

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Prof. Dr. med. Konrad Reinshagen

## ***In vitro*-Analyse bispezifischer GD2-Antikörper-Konstrukte und Dinutuximab beta zur Behandlung des Neuroblastoms**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Johanna Horn  
aus Hamburg

Hamburg 2022

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

14.09.2022

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

Prof. Dr. Stefan Rutkowski

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

Prof. Dr. Konrad Reinshagen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Hintergrund .....	6
1.2 Neuroblastom.....	6
1.2.1 Epidemiologie.....	6
1.2.2 Ätiologie.....	7
1.2.3 Lokalisation und klinische Symptome.....	7
1.2.4 Diagnostik.....	8
1.2.5 Einteilung in Krankheitsstadien und Risikogruppen.....	9
1.2.6 Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms.....	12
1.2.7 Prognose und Limitationen bisheriger Therapie- möglichkeiten .....	13
1.3 Immuntherapie .....	13
1.3.1 Rolle der T-Lymphozyten .....	14
1.3.1.1 Subpopulationen der T-Lymphozyten.....	14
1.3.1.2 CD-Oberflächenproteine .....	15
1.3.1.2.1 CD3 .....	15
1.3.1.2.2 CD28 .....	15
1.3.1.3 Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten.....	16
1.3.1.4 Effektorfunktionen der T-Lymphozyten.....	16
1.3.2 GD2.....	17
1.3.3 Antikörpertherapien .....	18
1.3.3.1 Dinutuximab beta .....	20
1.3.3.2 Limitationen von Antikörpertherapien für das Neuro- blastom.....	21
1.3.3.3 Bispezifische Antikörper .....	23
1.3.3.3.1 GD2-CD3 .....	24
1.3.3.3.2 GD2-CD28 .....	24
1.3.3.3.3 Kombinationsbehandlung.....	25
1.3.3.3.4 Blinatumomab .....	25
1.4 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	26
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1 Geräte und Softwareprodukte .....	27
2.2 Chemikalien/Reagenzien/Puffer.....	27
2.3 Therapeutische Antikörper .....	28
2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	29
2.5 Kultivierung der Neuroblastom-Zelllinien.....	30
2.5.1 Zellkultivierung .....	30

2.5.2	Anlegen einer Subkultur .....	30
2.5.3	Bestimmung der Zellzahl .....	31
2.5.4	Kryokonservierung und Auftauprozess.....	31
2.5.5	Quantifizierung von GD2 auf der Zelloberfläche.....	32
2.6	Isolation der peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut.....	32
2.7	Lyse-Assays.....	33
2.8	Zelluläre Proliferations- und Aktivierungsassays.....	34
2.8.1	Stimulation der Effektorzellen mit Phytohämagglutinin .....	36
2.8.2	Färbung der Effektorzellen mit Celltrace Violet .....	36
2.8.3	Zellaufreinigung .....	37
2.9	Durchflusszytometrie.....	37
2.9.1	Färbung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie.....	38
2.9.2	Fluorescence-Minus-One-Kontrollen .....	38
2.9.3	Einstellungen am FACS LSRFortessa.....	39
2.10	Auswertung.....	39
2.10.1	Auswertung der Lyse-Assays .....	39
2.10.2	Auswertung der zellulären Proliferationsassays .....	40
2.10.2.1	Auswertung von Ergebnissen der Durchflusszytometrie.....	40
2.10.3	Statistik.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	GD2-Expression und GD2-Antikörperbindung auf den Neuroblastom-Zelllinien .....	43
3.2	Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen .....	45
3.2.1	Aktivierungsassays.....	45
3.2.1.1	CD69+ Aktivierung .....	45
3.2.1.2	CD25+ Aktivierung .....	49
3.2.1.3	CD25+/CD69+ Aktivierung .....	54
3.2.2	Proliferationsassays .....	60
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivierungs- und Proliferationsassays .....	65
3.3	Lyse der Neuroblastom-Zelllinien.....	65
3.4	Etablierung der Konditionen für die Zellkultur-Versuche .....	69
3.4.1	Antikörperkonzentrationen.....	69
3.4.2	Effektorzellen-Zielzellen-Ratio .....	72
3.4.3	Zeitpunkt.....	75
3.4.3.1	Aktivierungsassays.....	76
3.4.3.2	Proliferationsassays .....	77

3.4.3.3 Lyse-Assays .....	78
3.4.4 Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der Effektorzellen .....	81
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1 Dinutuximab beta .....	83
4.2 Bispezifische Antikörper .....	84
4.2.1 GD2-CD28 .....	86
4.2.2 GD2-CD3 .....	86
4.2.3 Kombinationsbehandlung .....	87
4.3 GD2-Spezifität der gegen GD2 gerichteten Antikörper .....	88
4.4 Subpopulationen der T-Lymphozyten .....	89
4.5 Effektorzellen-Zielzellen-Ratios .....	90
4.6 Antikörperkonzentrationen .....	90
4.7 Zeitverlauf .....	91
4.8 Kontrollen .....	92
4.8.1 Effektorzellen mit Neuroblastom-Zellen ohne Antikörper .....	92
4.8.2 Blinatumomab .....	92
4.9 Stärken, Limitationen und Ausblick .....	93
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>118</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>119</b>
<b>10 Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>120</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Das Neuroblastom ist der häufigste solide, extrakranielle maligne Tumor im Kindesalter und die dritthäufigste Tumorentität nach Hirntumoren und Leukämien bei Kindern (Amoroso *et al.*, 2017). In Deutschland ist etwa eines von 100.000 Kindern unter 15 Jahren betroffen. Der Tumor weist eine hohe biologische Heterogenität auf und kann sowohl spontan in Remission gehen als auch therapieresistent metastasieren. Insbesondere das Hochrisiko-Neuroblastom weist eine sehr schlechte Prognose auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt circa 30 %. Etwa 20 % dieser Patient:innen erleiden ein Rezidiv (Horcher und Ladenstein, 2009). Die aktuell effektivste Therapie, eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie, geht mit starken Nebenwirkungen einher und kann das Langzeitüberleben nach aktuellem Stand nicht verbessern. Eine weitere Dosisescalation ist aufgrund der hohen Toxizität nicht möglich (Yalçın, Kremer und van Dalen, 2015). Im Fokus der Forschung steht daher die Suche nach effektiveren und weniger toxischen Therapieansätzen.

## 1.2 Neuroblastom

### 1.2.1 Epidemiologie

Nach Erhebungen des Deutschen Kinderkrebsregisters (2019) erkrankt in Deutschland jährlich eines von 6000 Kindern unter 18 Jahren an einem Neuroblastom. Aufgrund der zunehmenden Verbesserung von Ultraschalltechniken und erhöhter Aufmerksamkeit auf die Erkrankung kam es in den letzten Jahren zu einem Anstieg der Inzidenzen. Das Neuroblastom macht insgesamt etwa 7 % aller onkologischen Erkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren aus. Es sind circa (ca.) 40 % mehr Jungen als Mädchen betroffen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt 14 Monate. Die Diagnosestellung erfolgt in ca. 40 % der Fälle vor dem ersten Lebensjahr. Etwa 90 % der Diagnosen werden bis zum sechsten Lebensjahr gestellt. Neuerkrankungen nach dem 15. Lebensjahr sind selten. Das Gesamtüberleben innerhalb von 15 Jahren liegt bei ca. 77 % und nimmt mit zunehmendem Alter bei Diagnosestellung ab (Horcher und Ladenstein, 2009; Erdmann

*et al.*, 2020). Bei etwa 35 % der Patient:innen liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Hochrisiko-Neuroblastom vor. Für dieses liegt die Überlebensrate, auch nach intensiver multimodaler Therapie, bei ca. 50 % (Simon *et al.*, 2019; Haghiri *et al.*, 2021). Etwa 15 % aller onkologisch bedingten Tode bei Kindern sind auf das Neuroblastom zurückzuführen (Amoroso *et al.*, 2017). Die Hälfte der Tumoren sind bei Diagnosestellung metastasiert, ca. 15 % der Tumoren vor und ca. 60 % nach dem ersten Lebensjahr (Horcher und Ladenstein, 2009; Simon *et al.*, 2019). Da Neuroblastome oft spontan remittieren, hat ein Screeningprogramm zu einer erhöhten Inzidenz, jedoch nicht zu einer Senkung der Mortalität geführt und wurde eingestellt (Erdmann *et al.*, 2020).

### 1.2.2 Ätiologie

Die Zellen des Neuroblastoms entstehen im Rahmen der Embryonalentwicklung aus der sympathoadrenalen Linie der Neuralleiste. Etwa 65 % der Neuroblastome haben ihren Ursprung in den sympathischen Zellen des Nebennierenmarks oder den lumbalen sympathischen Ganglien. Die Neuroblastome anderer Lokalisation entsprechen in ihrer Häufigkeit der Distribution sympathischer Ganglien in diesen Regionen (Cheung und Dyer, 2013). Das Neuroblastom tritt in der Regel sporadisch und in ca. 1 % der Fälle familiär gehäuft auf (Simon *et al.*, 2019). Prädisponierende Mutationen für diese familiären Neuroblastome finden sich in den PHOX2B- und ALK-Genen, welche vermutlich eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation der sympathoadrenalen Linie der Neuralleiste spielen. Bei sporadischen Neuroblastomen werden in ca. 6 - 10 % der Fälle ALK-Mutationen nachgewiesen. Die MYCN-Amplifikation ist mit ca. 22 % am häufigsten. MYCN reguliert Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen während der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) (Cheung, 2013; Speleman, Park und Henderson, 2016). Der Nachweis einer MYCN-Amplifikation in einem Stadium M und in einem Alter von über 18 Monaten definieren das Hochrisiko-Neuroblastom (Simon *et al.*, 2019).

### 1.2.3 Lokalisation und klinische Symptome

Das Neuroblastom zeigt abhängig vom Stadium, dem Alter der Patient:innen und der Tumorlokalisierung vielfältige klinische Manifestationen. Am häufigsten ist es im Abdomen (ca. 79 %; davon etwa 51 % in der Nebenniere und 28 % extraadrenal) und entlang des

thorakalen (ca. 14,7 %) und zervikalen (ca. 2,6 %) Grenzstrangs lokalisiert. Bei etwa 2 % der Patient:innen wird kein Primärtumor gefunden (Horcher und Ladenstein, 2009). Das Neuroblastom metastasiert mit Abstand am häufigsten in das Knochenmark (ca. 86 %), die Knochen (ca. 62 %), die Lymphknoten (ca. 19 %) und die Leber (ca. 17 %) (Simon *et al.*, 2019). Weitere Metastasierungsorte sind lokoregionäre Lymphknoten, die Leber und die Haut. Bei Rezidiven kann es zu intrakraniellen Metastasen und Lungenmetastasen kommen.

Die Symptome können, je nach Lokalisation des Tumors, variieren. Bei etwa 20 % der Patient:innen ist die Diagnose ein asymptomatischer Zufallsbefund. Die Tumoren befinden sich dann mehrheitlich in Stadium I oder II. In späteren Stadien führen das Wachstum des Tumors oder die Metastasierung zu Symptomen. Typische unspezifische Symptome sind Schmerzen, Inappetenz, Gewichtsstillstand, oder eine Hepatomegalie. Selten, aber charakteristisch, sind therapieresistente Diarrhöen durch eine erhöhte Sekretion des vasointestinalen Peptids. Außerdem Hypertonien, die durch pressorisch wirkende Katecholaminmetabolite entstehen. Abdominelle Tumoren können durch Harnabflussstörungen bis hin zur Hydronephrose auffallen. Thorakale Tumoren können zu diffusen neurologischen Symptomen oder einer Querschnittsymptomatik durch eine Okklusion der Foramina intervertebralia führen. Weitere Symptome sind Husten, Dyspnoe und die Entwicklung von Pneumonien. Der typische Symptomkomplex bei zervikalen Tumoren mit Beeinträchtigung des Ganglion stellatum ist in 15 – 20 % der Fälle ein Horner-Syndrom. Patient:innen mit metastasierten Neuroblastomen werden zu einem großen Anteil mit einem reduzierten Allgemeinzustand, Fieber, Blässe und Schmerzen vorstellig. Charakteristisch ist ein ein- oder beidseitiges Brillenhämatom in Folge retrobulbärer Infiltrate. Selten werden Patient:innen initial durch eine Hirndrucksymptomatik oder Krampfanfälle in Folge von Metastasen des ZNS auffällig. Knochen- und Knochenmarksmetastasen führen zu Knochenschmerzen sowie, bei ausgeprägter Infiltration des Knochenmarks, zur Anämie und Thrombozytopenie (Horcher und Ladenstein, 2009; Irwin und Park, 2015).

#### **1.2.4 Diagnostik**

Bei Verdacht auf ein Neuroblastom auf Grundlage der Anamnese und der körperlichen Untersuchung werden weiterführende diagnostische Maßnahmen durchgeführt. In der



Labordiagnostik dienen Katecholaminmetabolite in Serum und Urin und die neuronspezifische Enolase (NSE) als Marker für die Erstdiagnose und den weiteren Verlauf. Sie sind bei etwa 80 % der Patient:innen erhöht. Unspezifische Hinweise auf einen Tumor können außerdem eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) oder Ferritin sein. Sie weisen auf eine erhöhte Tumorlast sowie -aktivität hin und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Neben der Sonographie, gilt die Magnetresonanztomographie (MRT) als Mittel der Wahl in der bildgebenden Diagnostik. Die Strahlenbelastung ist geringer und die Detaildarstellung ist besser als bei der Computertomographie (CT). Eine Röntgenthorax-Aufnahme sollte zusätzlich durchgeführt werden. Für die Darstellung von Metastasen ist eine Szintigraphie mit Metajodbenzylguanidin (mIBG) unerlässlich. Bei mIBG-negativen Tumoren muss die Suche nach Metastasen mit weiteren szintigraphischen Verfahren fortgeführt werden. Um Knochenmarksmetastasen zu identifizieren, sind Knochenmarksbiopsien an verschiedenen Stellen notwendig. Ist weniger als 60 % des Knochenmarks befallen, muss vor Behandlungsbeginn eine Tumorbiopsie durchgeführt werden. Die definitive Diagnosestellung kann nur histologisch mittels Tumorbiopsie oder zytologisch mittels Knochenmarksbiopsie erfolgen. In diesem Rahmen sollte auch eine molekulargenetische Diagnostik auf MCYN und ALK erfolgen. Laut der aktuellen Leitlinie sind eine Echokardiographie, ein Audiogramm, eine Untersuchung der Nierenfunktion und die Sonographie der Nieren bei Einsatz kardio-, oto- und nephrotoxischer Zytostatika durchzuführen (Horcher und Ladenstein, 2009; Simon *et al.*, 2019).

### **1.2.5 Einteilung in Krankheitsstadien und Risikogruppen**

Die Stadieneinteilung erfolgt nach klinischen, radiologischen, histologischen und chirurgischen Kriterien. Die aktuell gebräuchlichen International Neuroblastoma Staging System-Kriterien (INSS-Kriterien) richten sich unter anderem nach dem Vorhandensein von Metastasen, dem Befall regionaler Lymphknoten und dem Ausmaß der Resektion nach Einschätzung der Chirurg:innen. Sie dienen außerdem der Beurteilung des Therapieansprechens. Das International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) dient der prätherapeutischen Risikoeinschätzung und Stadieneinteilung. Hier wird der Schwerpunkt auf die Bildgebung anhand von Image Defined Risk Factors (IDRF) gelegt. Die Einteilungen sind damit besser reproduzierbar und weniger abhängig von der subjektiven Einschätzung der Chirurg:innen. Das INRGSS kann als Ergänzung zum INSS

gesehen werden. Die INSS-Stadien 4 und 4S entsprechen in etwa den INRGSS-Stadien M und MS (siehe (s.) Tabelle 1) (Horcher und Ladenstein, 2009; Simon *et al.*, 2019).

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung beim Neuroblastom nach Kriterien des INSS (Brodeur *et al.*, 1993) und INRGSS (Monclair *et al.*, 2009).

INSS		INRGSS	
1	Lokalisierter Tumor nach kompletter Resektion mit oder ohne mikroskopische Reste, repräsentative ipsilaterale und kontralaterale Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor, dem Tumor anhängende Lymphknoten können infiltriert sein. Makroskopisch entfernte Mittellinientumoren ohne Lymphknoteninfiltration werden als Stadium 1 klassifiziert.	L1	Lokalisierter Tumor ohne Nachweis von IDRF und begrenzt auf eine Körperhöhle.
2A	Lokalisierter Tumor nach unkompletter Entfernung, repräsentative nichtadhärente Lymphknoten mikroskopisch frei von Tumor.		
2B	Lokalisierter Tumor nach kompletter oder unkompletter Resektion, Nachweis einer Infiltration von ipsilateralen, nichtadhärenten Lymphknoten, kontralaterale nichtadhärente Lymphknoten frei von Tumor.	L2	Lokalisierter Tumor mit Nachweis von einem oder mehreren IDRF.
3	Nicht resektabler unilateraler Tumor mit Ausdehnung über die Mittellinie mit oder ohne Infiltration der regionalen Lymphknoten; oder lokalisierter Tumor mit Infiltration der kontralateralen nicht adhärenen Lymphknoten; oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknoteninfiltration. (Die Mittellinie ist definiert als die kontra- laterale Begrenzung der Wirbelsäule.)		
4	Metastasierung in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe, die nicht der Definition des Stadium 4S entspricht.	M	Nachweis von Fernmetastasen (außer Stadium MS).
4S	Lokalisierter Tumor Stadium 1, 2A oder 2B mit Metastasierung in Leber, Haut oder Knochenmark (maximal 10 %, nicht detektierbar in der MIBG-Szintigraphie) bei Säuglingen < 1 Jahr bei Diagnosestellung.	MS	Metastatische Erkrankung bei Kindern im Alter < 18 Monaten mit Metastasen begrenzt auf Haut, Leber und Knochenmark.

Multifokale Tumoren werden entsprechend der Ausdehnung des größten Tumors klassifiziert. Das Stadium wird als M gekennzeichnet, beispielsweise 3M.	Multifokale Tumoren werden entsprechend der Ausdehnung des größten Tumors klassifiziert.
--	--

Die Einteilung der Children's Oncology Group (COG) nach Risikogruppen erfolgt unter Einbeziehung weiterer Faktoren (s. Tabelle 2). Neben dem Tumorstadium (nach Kriterien des INSS) und dem Patient:innenalter, fließen die histopathologische Klassifikation (nach Kriterien des International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC)) und molekulargenetische Veränderungen (MYCN-Status, DNA-Ploidie) in die prognostische Beurteilung mit ein (Children's Oncology Working Group (COG), 2011).

**Tabelle 2:** Einteilung des Neuroblastoms in Risikogruppen nach COG (Children's Oncology Working Group (COG), 2011).

Risikogruppe	Stadium	Charakteristika
Niedrig	1	Jedes Alter und komplette Resektion.
	2	Keine MYCN-Amplifikation, Tumor zu > 50 % reseziert.
	4 - 4S	Keine MYCN-Amplifikation, DNA-Index > 1, günstiger Verlauf.
Mittel	2	Keine MYCN-Amplifikation, Tumor zu < 50 % reseziert.
	3	Alter < 18 Monate, keine MYCN-Amplifikation.
		Alter > 18 Monate, keine MYCN-Amplifikation, günstiger Verlauf.
	4	Alter < 12 Monate, keine MYCN-Amplifikation.
		Alter 12 - 18 Monate, keine MYCN-Amplifikation, DNA-Index > 1, günstiger Verlauf.
4S	Keine MYCN-Amplifikation und ungünstige Histologie oder DNA-Index = 1.	
Hoch	2, 3, 4, 4S	Mit MYCN-Amplifikation.
	3	Alter > 18 Monate und ungünstiger Verlauf.
	4	Alter 12 - 18 Monate, keine MYCN-Amplifikation, ungünstiger Verlauf oder DNA-Index = 1.
		Alter > 18 Monate.

### 1.2.6 Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms

Die therapeutischen Optionen richten sich beim Neuroblastom nach dem Stadium des Tumors. Im Stadium I oder 4S kann, unter bildgebender Kontrolle, abwartend beobachtet werden. Hochrisiko-Neuroblastom-Patient:innen werden einer Maximaltherapie zugeführt. Vorab ist eine Tumorbiopsie zur Risikostratifizierung durchzuführen. Die Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms kann in drei Phasen eingeteilt werden: 1. Induktion, 2. Konsolidierung und 3. Erhaltung der Remission (Simon *et al.*, 2019).

Die Induktionstherapie hat eine möglichst vollständige Remission zum Ziel. Neben der Resektion des Primärtumors beinhaltet die Induktionsphase eine Chemotherapie nach Vorgabe der NB2004 HR-Studie (Simon *et al.*, 2019). Das Ansprechen auf die Induktionstherapie ist ein wichtiger Prognosefaktor für das Überleben (Yanik *et al.*, 2013). Bei ca. 20 % der Patient:innen kommt es zu einem mangelnden Ansprechen auf die Induktionstherapie oder zu einem Progress der Erkrankung (Irwin und Park, 2015).

Die Konsolidierungstherapie besteht aus einer Hochdosis-Chemotherapie und einer anschließenden autologen Stammzelltransplantation (Simon *et al.*, 2019). Bei Vorliegen mIBG-positiven residualen Tumorgewebes in der <sup>131</sup>Iod-meta-Iodobenzylguanidine (<sup>131</sup>I-mIBG)-Szintigraphie sollte vor Beginn der Hochdosis-Chemotherapie eine Therapie mit <sup>131</sup>I-mIBG erfolgen. Die Therapie ist wirksam, auch wenn der Nachweis eines Überlebensvorteils aussteht (Schmidt *et al.*, 2006; Schmidt, Hero und Simon, 2016).

Auch bei lokaler Vollremission wird im Anschluss an die Hochdosis-Chemotherapie eine Radiotherapie der Primärtumorregion mit ca. 20 Gray empfohlen, um die lokale Kontrollrate zu verbessern (Arumugam *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2019). Dabei muss berücksichtigt werden, dass das sich noch entwickelnde Gewebe von Kindern besonders vulnerabel ist und die lange Latenzzeit zu Spätfolgen, wie Sekundärtumoren, führen kann (Rombi *et al.*, 2013).

Der gegen das Oberflächenmolekül GD2 gerichtete monospezifische Antikörper ch14.18/CHO (Dinutuximab beta) wird in der aktuellen Leitlinie als Post-Konsolidierungstherapie empfohlen und in Abschnitt 1.3.2.1 ausführlich besprochen

(Simon *et al.*, 2019). Die über lange Zeit etablierte Therapie mit 13-Cis-Retinsäure, wird aufgrund der mangelnden Wirksamkeit nicht mehr empfohlen (Kohler *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2010).

### **1.2.7 Prognose und Limitationen bisheriger Therapiemöglichkeiten**

Die Prognose für das Hochrisiko-Neuroblastom ist mit einem Langzeitüberleben von unter 50 % schlecht (Simon *et al.*, 2019). Die Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation hat zu einer Verbesserung des Gesamt- und ereignisfreien Überlebens geführt. Sie geht aber, ebenso wie die Radiotherapie, mit kurz- und langfristigen schweren Nebenwirkungen einher (Pinto *et al.*, 2015). Eine neue Übersichtsarbeit hat den Verlauf von 145 Hochrisiko-Neuroblastom-Patient:innen nach Hochdosis-Chemotherapie und Stammzelltransplantation über einen Zeitraum von 15 Jahren verfolgt (Haghiri *et al.*, 2021). 93 % der Patient:innen berichteten von gesundheitlichen Spätfolgen und 75 % von mindestens einem schwerwiegenden sekundären gesundheitlichen Ereignis, beispielsweise gonadalen Schäden. Das Risiko für ein Zweitmalignom war 25-fach erhöht. Außerdem können Zytostatikaresistenzen auftreten, die durch hohe Dosierungen und kurze Intervalle zwischen den Zyklen umgangen werden sollen (Horcher und Ladenstein, 2009).

Um das Überleben zu verbessern und Nebenwirkungen beziehungsweise Langzeitfolgen zu reduzieren, wird weiterhin intensiv an neuen Therapiemöglichkeiten geforscht. Dazu gehört auch die Immuntherapie auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

## **1.3 Immuntherapie**

Tumorzellen entstehen durch genetische und epigenetische Veränderungen, welche die Entstehung neuer Proteinstrukturen zur Folge haben. Diese können durch das menschliche Immunsystem erkannt und die betroffenen Zellen eliminiert werden (Thomas, 1982; Sharma *et al.*, 2011; Farkona, Diamandis und Blasutig, 2016). Dieser Mechanismus wird für Immuntherapien genutzt. Ziel ist die dauerhafte Elimination der Tumorzellen bei geringen Auswirkungen auf andere Körperzellen. Der Vorteil gegenüber konventionellen Therapien liegt darin, dass Immuntherapien sehr zielgerichtet wirken. Im Vergleich zu Chemotherapien können Nebenwirkungen reduziert werden. Außerdem

kann durch ein dauerhaft konditioniertes Immunsystem ein nachhaltigerer Effekt erzielt werden (Dimberu und Leonhardt, 2011).

### **1.3.1 Rolle der T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten (T-Zellen) spielen bei der Abwehr von Antigenen eine zentrale Rolle. Mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) können sie verschiedene Antigene erkennen. Die Antigene müssen vorab durch antigenpräsentierende Zellen verarbeitet und über ein Major histocompatibility complex (MHC)–Molekül präsentiert werden. Unter Mitwirkung co-stimulatorischer Signale wie beispielsweise Cluster of differentiation (CD)4, CD8 oder CD28 kommt es zur Aktivierung naiver T-Zellen. Diese schütten Zytokine aus, welche zur Differenzierung zu Effektor-T-Zellen und zur Proliferation führen. So wird eine effektive Immunantwort auf das Antigen gewährleistet. Die Subtypen der Effektor-T-Zellen führen zur direkten Elimination der befallenen Zellen oder zur Aktivierung anderer Immunzellen (Kumar, Connors und Farber, 2018; Waldman, Fritz und Lenardo, 2020). Ein großer Anteil der T-Zellen wird nach kurzer Zeit wieder abgebaut. Einige überleben als T-Gedächtniszellen, die langfristig eine zügige Reaktion des Immunsystems auf das Antigen ermöglichen (Kumar, Connors und Farber, 2018).

#### **1.3.1.1 Subpopulationen der T-Lymphozyten**

Zwei große Subpopulationen von T-Zellen sind die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen (Vignali, Collison und Workman, 2008). Während alle T-Zellen durch das Vorhandensein des Oberflächenproteins CD3 gekennzeichnet sind, lassen sich die Subpopulationen durch die Co-Rezeptoren CD8 (zytotoxische T-Zellen) und CD4 (T-Helferzellen) differenzieren (Van Den Broek, Borghans und Van Wijk, 2018).

Zytotoxische T-Zellen exprimieren den Co-Rezeptor CD8 auf ihrer Zelloberfläche, welcher an MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I) gebundene Antigene erkennt. MHC-I ist darauf spezialisiert Peptide von Infektionserregern zu präsentieren und ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden. Nach Kontakt mit einem Antigen kommt es zur Freisetzung zytotoxischer Enzyme und nachfolgend zur direkten apoptotischen Elimination der Zielzelle. Die T-Helferzellen nehmen eine unterstützende Funktion bei der zellulären und humoralen Immunantwort ein. Sie aktivieren andere Immunzellen durch die Freisetzung von Zytokinen. Der Co-Rezeptor CD4 erkennt an MHC-Klasse-II-

Moleküle (MHC-II) gebundene Antigene, welche insbesondere auf Immunzellen und weniger auf Gewebezellen exprimiert werden (Vignali, Collison und Workman, 2008; Murphy und Weaver, 2017).

### **1.3.1.2 CD-Oberflächenproteine**

Neben den bereits erwähnten CD-Oberflächenproteinen existiert eine Vielzahl weiterer, welche als Co-Rezeptoren unterschiedliche Funktionen erfüllen und unter anderem die Effektorfunktionen beeinflussen (Murphy und Weaver, 2018). Im Folgenden sind die beiden für die in dieser Studie untersuchten Therapieoptionen relevanten Oberflächenproteine CD3 und CD28 beschrieben.

#### **1.3.1.2.1 CD3**

Das Oberflächenprotein CD3 bildet einen Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR-CD3-Komplex) und spielt als transmembraner Co-Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Erkennung des MHC-Antigen-Komplexes und der Signaltransduktion in das Innere der Zelle. Außerdem wirkt CD3 gemeinsam mit anderen Molekülen stabilisierend auf den TCR-CD3-Komplex (Murphy und Weaver, 2017).

#### **1.3.1.2.2 CD28**

CD28 ist ein Co-stimulatorischer Rezeptor, welcher auf ca. 80 % der humanen CD4-positiven (+) und circa 50 % der CD8+ Zellen zu finden ist. Er wirkt synergistisch mit dem TCR-CD3-Komplex zusammen. Außerdem ist er der wichtigste Co-Stimulator zur Initiierung der Aktivierung der T-Zelle und kann auch ohne TCR-CD3-Komplex zu einer Aktivierung führen (Grosse-Hovest *et al.*, 2003; Esensten *et al.*, 2016). CD28 interagiert mit dem Co-Stimulator B7, welcher auf Zellen zu finden ist, die proliferationsfördernd auf naive T-Zellen wirken (Murphy und Weaver, 2017). Es konnte eine unterstützende Rolle von CD28 für Zellwachstum, Überleben und Gedächtnisfunktion der T-Zellen nachgewiesen werden (Chen und Flies, 2013). Des Weiteren ist das co-stimulatorische Signal notwendig, um eine ausreichende Interleukin 2 (IL-2)-Produktion zu gewährleisten. Zytotoxische T-Zellen können IL-2 nur in geringer Menge selbst herstellen und sind auf die Produktion durch T-Helferzellen angewiesen. Die Co-Stimulation durch CD28 führt zu einer gesteigerten Produktion von IL-2 und damit Proliferation der T-Zellen (Schwartz,

1992). Abhängig von Zelltyp und Funktion kann CD28 gleichzeitig eine pro- und anti-inflammatorische Wirkung haben (Lyddane *et al.*, 2006).

### 1.3.1.3 Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten

Nach Kontakt des TCR und der co-stimulatorischen Rezeptoren, wie unter anderem CD3 und CD28, mit einem MHC-Antigen-Komplex beginnt im Inneren der T-Zelle eine Signalkaskade. Diese führt zur Aktivierung verschiedener Gene, zur Transkription, Translation und zum Eintritt in den Zellzyklus (Murphy und Weaver, 2017). Wie oben beschrieben, wirkt CD28 als wichtigstes co-stimulatorisches Signal für die Aktivierung und Proliferation der Zellen. In der Regel erfolgt die Aktivierung nach Präsentation eines prozessierten Antigens durch eine Antigen-präsentierende Zelle über einen MHC-Komplex. Es kann auch eine vom Antigen unabhängige, unspezifische Aktivierung erfolgen (Crawford *et al.*, 2019; Skokos *et al.*, 2020). Die aktivierten T-Zellen können sich mehrere Tage lang teilen und klonal vermehren (Vignali, Collison und Workman, 2008; Murphy und Weaver, 2017).

CD69 und CD25 werden auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert und können als Marker einer erfolgreichen Aktivierung der Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Der früheste nachweisbare Aktivierungsmarker ist CD69 (Caruso *et al.*, 1997). Im Verlauf wird der Aktivierungsmarker CD25 exprimiert, welcher als Teil des IL-2-Rezeptors maßgeblich an der Steigerung von Aktivierung und Proliferation der T-Zellen beteiligt ist (Murphy und Weaver, 2017). Bei effektiver Aktivierung der Effektorzellen kommt es nach vier Stunden (h) zu einer verstärkten Expression von CD69 auf der Zelloberfläche. Innerhalb von 24 h kommen weitere Aktivierungsmarker, wie CD25, hinzu (Motamedi, Xu und Elahi, 2016). Nach 48 h kann, bei effektiver Aktivierung, mit einem hohen Anteil CD25+/CD69+ T-Zellen gerechnet werden. Gleichzeitig verringert sich der Anteil der einfach-positiv aktivierten Effektorzellen.

### 1.3.1.4 Effektorfunktionen der T-Lymphozyten

Im Verlauf der Proliferation der aktivierten T-Zellen kommt es zur Differenzierung der spezifischen Effektorfunktionen und somit zum Übergang der naiven T-Zellen in Effektor-T-Zellen. Diese benötigen keine co-stimulatorischen Signale, um ihre Effektorfunktionen auszuführen, zirkulieren nicht durch die Lymphknoten und bilden Adhäsionsmoleküle für



inflammatorisch veränderte Gefäße aus, die es ihnen ermöglichen an den Gefäßwänden entlang zu rollen und in entzündetes Gewebe überzutreten. So wird eine zügige und effektive Reaktion auf Antigene gewährleistet (Murphy und Weaver, 2017).

Zytotoxische T-Zellen leiten nach Kontakt mit einem MHC-I-Antigen-Komplex die apoptotische Lyse der betroffenen Zelle ein. Zwei zentrale Mechanismen dabei sind die Freisetzung zytotoxischer Moleküle aus Granula in die betroffene Zielzelle und die Sezernierung von Zytokinen. Die zytotoxischen Moleküle induzieren zielgerichtet die Apoptose in der Zielzelle ohne umliegende Zellen zu schädigen. Außerdem werden fortlaufend zytotoxische Granula nachproduziert, sodass eine einzelne zytotoxische T-Zelle multiple Zielzellen eliminieren kann. Darüber hinaus sezernieren die Zellen Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), welche unter anderem an der Aktivierung von Makrophagen und der verstärkten Expression von MHC-I beteiligt sind (Schütt und Bröker, 2011; Murphy und Weaver, 2018).

T-Helferzellen wirken modulierend auf die Immunantwort indem sie über Zytokine die Funktionen anderer Immunzellen beeinflussen. So verstärken oder hemmen sie die Lymphozytenproliferation, aktivieren oder inaktivieren Makrophagen, stimulieren B-Zellen zur Antikörpersynthese, beeinflussen den Immunglobulin (Ig)-Klassenswitch oder verstärken die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dabei differenzieren sie antigenspezifisch zu TH1- oder TH2-Zellen. Fehlen ihnen co-stimulatorische Signale differenzieren sie nicht weiter aus und werden zu regulatorischen T-Zellen, welche über Interleukin 10 (IL-10) und Tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) immunsuppressiv wirken (Schütt und Bröker, 2011).

### **1.3.2 GD2**

Neuroblastom-Zellen (NB-Zellen) exprimieren das Disialogangliosid GD2 auf ihrer Zelloberfläche, welches zur Gruppe der Glycosphingolipide gehört. Glycosphingolipide beeinflussen zelluläre Prozesse wie Apoptose, Proliferation und Adhäsion, die Membranstabilisierung oder die Modulation von Signaltransduktionswegen (Navid, Santana und Barfield, 2010; Zhuo, Li und Guan, 2018).

Über die physiologische Rolle des GD2-Subtyps ist wenig bekannt (Dobrenkov und Cheung, 2014). Ihm wird in der Tumorgenese eine immunsupprimierende und das Tumorzellwachstum stimulierende Rolle zugesprochen (Hung und Yu, 2019). GD2 ist an der Zellproliferation und –migration, der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine sowie Immunescape-Mechanismen beteiligt (Cheresh *et al.*, 1986; Julien *et al.*, 2013; Cavdarli, Groux-Degroote und Delannoy, 2019). Bei hohen Gangliosidwerten konnten verminderte Infiltrationsraten von Immunzellen in Tumorgewebe beobachtet werden (Wondimu *et al.*, 2014). Außerdem trägt GD2 unter anderem durch eine Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen zur Tumorprogression bei (Navid, Santana und Barfield, 2010; Dobrenkov und Cheung, 2014; Yu *et al.*, 2020). Hohe GD2-Werte korrelieren mit einer schnelleren Progredienz der Erkrankung. GD2 könnte deshalb zukünftig als Marker hierfür verwendet werden (Kholodenko *et al.*, 2018).

Auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wie beispielsweise Neuroblastomen, Melanomen und Sarkomen wird GD2 homogen überexprimiert. Auf anderen Körperzellen ist es nur in geringer Zahl zu finden. Dies sind insbesondere Zellen des ZNS, Neuronen des peripheren Nervensystems und Melanozyten der Haut (Navid, Santana und Barfield, 2010). GD2 ist genetisch relativ stabil, geht unter Therapiedruck selten verloren und internalisiert nicht nach Antikörperbindung (Cheng *et al.*, 2015). Eine Untersuchung von 152 Patient:innenproben ergab eine 96-prozentige GD2-Positivität der NB-Zellen, wenngleich der Anteil an GD2 variierte und meist unter 50 % lag. Die GD2-Expression zeigte sich unabhängig von Tumorstadium, MYCN-Amplifikation, Alter oder klinischem Status der Patient:innen. GD2 wurde auf Primärtumoren und Metastasen gleichermaßen und auch nach Chemotherapie exprimiert. Außerdem wird es auf refraktären und rezidivierenden Tumoren weiterhin gefunden (Kramer *et al.*, 1998; Terzic *et al.*, 2017). Diese Eigenschaften machen es zu einem geeigneten Ziel für Antikörpertherapien. Eine Einordnung verschiedener Tumor-Antigene durch das National Cancer Institute der Vereinigten Staaten rankte GD2 auf Platz 12 von 75 als erfolgversprechendes Therapie- und Forschungsziel (Cheever *et al.*, 2009).

### **1.3.3 Antikörpertherapien**

Durch eine Antikörpertherapie kann die Wirkung des Immunsystems gegen Tumorzellen initiiert beziehungsweise verstärkt werden. Ist ein geeignetes Ziel-Antigen auf der Tumorzelloberfläche identifiziert, können gegen dieses Antigen gerichtete monoklonale

Antikörper artifiziell hergestellt und therapeutisch genutzt werden. Die Antikörper binden an das Ziel-Antigen auf der Tumorzelloberfläche und führen über die oben beschriebenen Effektormechanismen zu einer Elimination der Zielzelle (Scott, Wolchok und Old, 2012). Außerdem können unerkannte Metastasen durch die Antikörper erreicht werden (Horta, Goldberg und Sondel, 2016). Voraussetzungen effektiver Antikörpertherapien sind die Differenzierung maligner Tumorzellen von benignen Körperzellen über ein spezifisches Antigen sowie die Erreichbarkeit dieses Antigens, zum Beispiel bei Expression auf der Zelloberfläche. Außerdem muss das Immunsystem der Patient:innen intakt sein und über funktionale Effektorzellen in ausreichender Zahl verfügen (Cheever *et al.*, 2009; Adler und Dimitrov, 2012; Scott, Allison und Wolchok, 2012; Casey und Cheung, 2020)

Antikörper sind Y-förmige Proteine, die von B-Zellen produziert werden, hoch sensibel sind und spezifisch Antigene zur Erkennung durch das Immunsystem markieren. Ein Antigen ist eine durch das Immunsystem erkannte Proteinstruktur, die dem Körper meist fremd ist, zum Beispiel ein Erregerbestandteil oder ein durch Mutationen verändertes Protein. Unveränderte körpereigene Zellen werden in der Regel nicht durch das Immunsystem als Antigen erkannt. Die beiden Arme des Y, Fab-Abschnitt (Fab= *engl. antigen binding fragment*) oder variable Domäne genannt, binden spezifisch an das Antigen. Der Stamm, Fc-Abschnitt (Fc= *engl. crystallising fragment*) oder konstante Domäne genannt, vermittelt die Effektorfunktionen (Schütt und Bröker, 2011). Die Elimination der Tumorzelle kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, wie beispielsweise eine direkte Wirkung des Antikörpers durch Rezeptorblockade, artifizielle Antikörper-Wirkstoffkomplexe oder durch antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (ADCC = *engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Scott, Wolchok und Old, 2012). Bei der Immuntherapie des Neuroblastoms spielte bislang insbesondere die über NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität eine Rolle (Keyel und Reynolds, 2019).

Bereits seit den 1980er Jahren können gegen ein bestimmtes Antigen gerichtete monoklonale Antikörper artifiziell hergestellt werden (Krishnamurthy und Jimeno, 2018). Bei diesen artifiziell hergestellten und therapeutisch genutzten Antikörpern werden monospezifische und bispezifische Antikörper unterschieden. Monospezifisch bedeutet, dass nur der Fab-Abschnitt des Antikörpers ein bestimmtes Antigen spezifisch bindet, der Fc-Abschnitt ist unspezifisch und kann durch verschiedene Effektorzellen, wie NK-Zellen, Makrophagen oder T-Zellen erkannt werden (Scott, Wolchok und Old, 2012).

Ein Nachteil monospezifischer Antikörper ist, dass keine spezifische Antikörper-Effektorzell-Bindung erfolgt. Dies ist insbesondere bei erwünschten T-Zell-Antworten problematisch, da T-Zellen über keinen Fc-Rezeptor verfügen (Horta, Goldberg und Sondel, 2016). Bispezifische Antikörper hingegen binden an einem Arm das Antigen während der andere Arm spezifisch an den Rezeptor bestimmter Effektorzellen binden kann. Bislang sind zwei bispezifische Antikörper zugelassen, Catumaxomab zur Therapie des malignen Aszites und Blinatumomab bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (Ahmed und Cheung, 2014; Krishnamurthy und Jimeno, 2018).

### 1.3.3.1 Dinutuximab beta

Ein Antikörper, der bereits als Standard-Konsolidierungstherapie des Hochrisiko-Neuroblastoms etabliert ist, ist Dinutuximab beta (Simon *et al.*, 2019). Dinutuximab beta ist ein gegen GD2 gerichteter monospezifischer, chimärer Antikörper, der in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen produziert wird. Der Fab-Abschnitt besteht aus der variablen Domäne des murinen IgG3-GD2-Antikörpers 14.18, der Fc-Abschnitt aus der konstanten Domäne des humanen IgG1- $\kappa$ -Antikörpers, welcher durch verschiedene Effektorzellen erkannt werden kann (Yu *et al.*, 1998). Die Elimination der Zielzelle erfolgt durch NK-Zellen über ADCC (Yankelevich *et al.*, 2012). Dinutuximab beta ist das europäische Äquivalent zum in den Vereinigten Staaten zugelassenen Dinutuximab.

Der Einsatz von Dinutuximab zeigt einen signifikanten Vorteil für das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patient:innen (Yu *et al.*, 2010; Ladenstein *et al.*, 2020). Es handelt sich dabei üblicherweise um eine Kombinationstherapie aus Dinutuximab, 13-cis-Retinsäure und den Immunmodulatoren IL-2 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Keyel und Reynolds, 2019). Die Immuntherapie löste die bisherige Konsolidierungstherapie mit der alleinigen Gabe von 13-cis-Retinsäure aufgrund mangelnder Wirksamkeit letzterer ab (Kohler *et al.*, 2000; Matthay *et al.*, 2009). In einer Phase-3-Studie von Ladenstein *et al.* (2018) zeigte eine Kombination von Dinutuximab beta mit IL-2 keinen Vorteil im Überleben bei verstärktem Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Dinutuximab beta (Ladenstein *et al.*, 2018).

Die häufigsten Nebenwirkungen der Therapie sind Grad-3-Reaktionen bei über 90 % der Patient:innen. Bei den nicht-hämatologischen Nebenwirkungen sind dies in

abnehmender Häufigkeit neuropathische Schmerzen, Fieber, Hypotension, allergische Reaktionen und ein Kapillarlecksyndrom (Ozkaynak *et al.*, 2018). Außerdem kommt es zur Lymphopenie, Thrombozytopenie, Hypokaliämie, Anämie, Neutropenie, Infusionsreaktionen, Hyponatriämie und erhöhten Alanin-Aminotransferase-Werten (Hoy, 2016). Einige dieser Nebenwirkungen treten bei langsamerer Infusionsgeschwindigkeit seltener auf (Mueller *et al.*, 2018). Die Kombinationspartner spielen eine Rolle für das Nebenwirkungsprofil der Therapie. Die bekannten Nebenwirkungen treten zum Beispiel in Kombination mit IL-2 häufiger auf (Ladenstein *et al.*, 2018; Ozkaynak *et al.*, 2018). Die neuropathischen Schmerzen in Form von Allodymien entstehen vermutlich durch die GD2-Expression auf Neuronen des peripheren Nervensystems und einer Aktivierung des Komplementsystems (Keyel und Reynolds, 2019). Eine die Komplementaktivierung inhibierende Punktmutation in ch14.18 führte in Tierversuchen zu einer Reduktion der Schmerzen (Sorkin *et al.*, 2010). Die Nebenwirkungen der Therapie sind der häufigste Abbruchgrund (Hoy, 2016).

### **1.3.3.2 Limitationen von Antikörpertherapien für das Neuroblastom**

Pädiatrische Tumoren bringen für Immuntherapien besondere Herausforderungen mit sich, da sie über verschiedene Mechanismen für diese weniger zugänglich sind. So weisen sie beispielweise, aufgrund des jungen Alters der Patient:innen, eine geringere Tumormutationslast auf. Dadurch sind sie für Immunzellen schwerer zu erkennen. Außerdem sind die T-Zell-Infiltrationsraten reduziert und es kommt eher zu monoklonalen T-Zell-Antworten (Wondimu *et al.*, 2014; Casey und Cheung, 2020). Zusätzlich führen das unreife Immunsystem und zytotoxische Induktions-Chemotherapien zu einer verringerten Zahl und Reaktivität der Immunzellen (Casey und Cheung, 2020).

Während das Immunsystem gegen die Tumorzellen reagiert, bilden diese unter Selektionsdruck Merkmale aus, welche ihnen einen Überlebensvorteil verschaffen (Schreiber, Old und Smyth, 2011). Beispiele sind der Verlust von Tumor-Neoantigenen, eine verminderte MHC-I-Expression, eine gesteigerte Produktion immunsuppressiver Zytokine oder eine gesteigerte Aktivierung von immunsuppressiv wirkenden regulatorischen T-Zellen (Wu *et al.*, 2015; Casey und Cheung, 2020). Diese Immunescape-Mechanismen (*engl. escape*= entkommen) werden aktuell als zentrale Herausforderung der Forschung gesehen, um die Effektivität der Therapien zu steigern (Suzuki und Cheung, 2015; Kholodenko *et al.*, 2018).

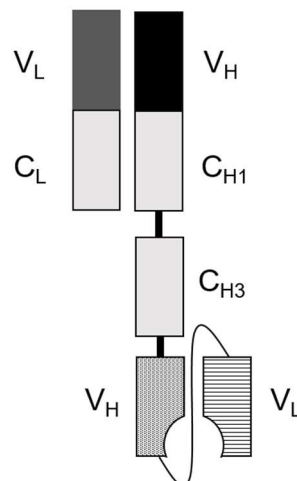
Zusätzlich bringt die Tumormikroumgebung (TME) besondere Herausforderungen für die Immunzellen mit sich. So führt der hohe Umsatz der Tumorzellen zu einer hypoxischen, azidotischen und glucosearmen Umgebung, die auch die Funktionen der T-Zellen stört (Chouaib *et al.*, 2012; Lim, Rathmell und Rathmell, 2020). Außerdem können die Tumorzellen direkt die Proliferation und Infiltration der T-Zellen inhibieren, ihre Effektorfunktionen stören und ihre Apoptose induzieren. Es wird angenommen, dass die Störung der Effektorfunktionen unter anderem über die Ausschüttung von Gangliosiden erfolgt, was einen Vorteil für gegen GD2 gerichtete Therapien bedeuten könnte (Wu *et al.*, 2015).

Das Neuroblastom ist in besonderem Ausmaß von diesen Mechanismen betroffen. Dies zeigt sich an den Limitationen der Therapie mit Dinutuximab beta und den schlechten Prognosen. Zusätzlich wirkt Dinutuximab beta insbesondere über durch NK-Zellen ausgelöste ADCC (Keyel und Reynolds, 2019). Im Rahmen des Immunescape der Tumorzellen kommt es zu verschiedenen, auf die NK-Zellen supprimierend wirkenden, Mechanismen in der TME. Zum Beispiel über die Bildung von TGF- $\beta$ , welches die Aktivierung und Proliferation der NK-Zellen supprimiert (Zenarruzabeitia *et al.*, 2017). Außerdem können die Tumorzellen, NK-Zellen aktivierende Liganden oder Adhäsionsmoleküle herunterregulieren beziehungsweise schützende Moleküle, wie B7-H3, vermehrt exprimieren (Bottino *et al.*, 2014).

Ein weiteres Problem ist die Abhängigkeit der Therapie von der GD2-Expression auf den Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass die Rezidivraten nach der Therapie bei niedrigen Expressionsraten von GD2 deutlich höher waren. Die Lysefähigkeit der NK-Zellen scheint dadurch beeinträchtigt zu sein, auch wenn die Therapie nicht zu einem GD2-Verlust zu führen scheint (Terzic *et al.*, 2018; Van Heek-Romanowski *et al.*, 2001). Außerdem wird der monospezifische Antikörper schlecht von T-Zellen erkannt und ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort bleibt ungenutzt (Suzuki und Cheung, 2015; Horta, Goldberg und Sondel, 2016). Wie bereits beschrieben, exprimieren ruhende T-Zellen zunächst keinen Fc-Rezeptor, was die Erkennung von Antikörpern erschwert (Sundor und Lynch, 1993; Cheng *et al.*, 2015).

### 1.3.3.3 Bispezifische Antikörper

Ein Ansatz die beschriebenen Mechanismen zu umgehen und eine zielgerichtete Therapie mit weniger Nebenwirkungen zu ermöglichen sind bispezifische Antikörper. Sie verfügen über einen Arm, der das Antigen auf der Tumorzelle bindet (Abbildung 1, oben) und binden mit dem anderen Arm spezifische Effektorzell-Rezeptoren (Abbildung 1, unten). So rekrutieren sie Effektorzellen und dirigieren sie gezielt zu den Zielzellen. Viele bispezifische Antikörper verfügen über eine CD3-Domäne mit der sie effektiv an T-Zellen binden und Effektormechanismen auslösen (Suzuki und Cheung, 2015; Horta, Goldberg und Sondel, 2016; Yu und Wang, 2019). Beispiele sind die Freisetzung zytotoxischer Granula oder die Induktion der Proliferation und Differenzierung der T-Zellen (Xu *et al.*, 2015).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines bispezifischen Antikörpers. Abkürzungen: VL, Variables Fragment/leichte Kette; VH, Variables Fragment/schwere Kette; CL, Konstantes Fragment/leichte Kette; CH1, Konstantes Fragment/schwere Kette 1; CH3, Konstantes Fragment/schwere Kette 3.

Zusätzlich führen sie zu einer polyklonalen T-Zell-Antwort, die unabhängig von co-stimulatorischen Signalen und CD4 und CD8 ist. Außerdem findet die Aktivierung MHC-unabhängig statt (Yankelevich *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2015). Das ist für gegen GD2 gerichtete Antikörper relevant, da GD2 nur schwach immunogen ist und die Präsentation über MHC nur nach Bindung an Peptide stattfinden kann. Ferner können NB-Zellen im Rahmen eines Immunescape die MHC-Expression herunterregulieren (Sait und Modak, 2017). Neben der Rekrutierung der T-Zellen ist eine starke Aktivierung und Proliferation für eine effektive Immunantwort erforderlich. Als wichtigster Co-Stimulator neben CD3 bietet sich hierfür CD28 an (Murphy und Weaver, 2017).

#### 1.3.3.3.1 GD2-CD3

GD2-CD3 ist ein bispezifischer Antikörper, der mit einem Arm gegen CD3 auf den T-Zellen und mit dem anderen gegen GD2 auf NB-Zellen gerichtet ist. Mehrere Studien konnten die Spezifität der Therapie für GD2 und eine höhere Lyseaktivität mit steigenden Anteilen GD2-positiver Tumorzellen belegen. Die Aktivierung der T-Zellen über CD3 ist an den Kontakt mit GD2 gebunden und kann nicht unabhängig davon stattfinden. Bereits in geringen Dosierungen konnten effektive Immunantworten erzielt werden. Inzwischen läuft die erste Phase I/II Studie (NCT02173093) zur Evaluation von *ex vivo* mit dem Antikörper „bewaffneten“ und reinfundierten aktivierten T-Zellen in Kombination mit GM-CSF und IL-2. Außerdem wird aktuell eine Phase I/II Studie zu einem bivalenten Vakzin mit GD2- und CD3-Antigenen durchgeführt (NCT00911560) (Bernhard *et al.*, 1993; Manzke *et al.*, 2001; Yankelevich *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2015).

#### 1.3.3.3.2 GD2-CD28

Waite *et al.* (2020) konnten mit einem gegen Epidermal Growth Factor (EGFR) und Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) gerichteten bispezifischen CD28-Antikörper die Wirkung von Programmed Cell Death Protein 1 (PD1)-Inhibitoren deutlich verbessern und auch ohne PD1-Inhibitoren eine sehr gute Wirksamkeit von bispezifischen CD28-Antikörpern demonstrieren. Es konnten hohe intra-tumorale T-Zell-Aktivierungsraten bei geringer Toxizität bei Mäusen nachgewiesen werden (Waite *et al.*, 2020). Die Nebenwirkungen sind dabei dringend zu beobachten. Ein CD28-Antikörper hat in der Vergangenheit hohe Aktivierungsraten und eine starke lytische Aktivität gegen Melanomzellen ausgelöst und in Tierversuchen keine Nebenwirkungen verursacht (Grosse-Hovest *et al.*, 2003). Aufgrund einer unspezifischen, antigen-unabhängigen Reaktion kam es in einer Phase-I-Studie (TGN1412) jedoch zu lebensgefährlichen Überreaktionen mit Zytokinsturm bei allen Probanden, die nicht antizipiert worden waren (Suntharalingam *et al.*, 2006).

GD2 und CD28 wurden bereits im Rahmen der Erforschung von Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T-Zellen kombiniert und weisen beispielsweise gegen Melanomzellen eine hohe Effektivität auf (Yvon *et al.*, 2009).



### 1.3.3.3 Kombinationsbehandlung

Die Kombination von bispezifischen CD3-Antikörpern als Initiatoren und bispezifischen CD28-Antikörpern als Verstärker der T-Zell-Aktivierung erscheint sinnvoll, um effektivere T-Zellantworten zu generieren. Die Bildung des CD3-TCR-Komplexes ist notwendig, um das Antigen zu erkennen und die Bindung der T-Zelle an die Tumorzelle herbeizuführen. Der Co-Stimulator CD28 verstärkt die Aktivierung und Proliferation durch vielfältige Mechanismen, wie eine vermehrte IL-2-Produktion oder eine Remodellierung des Zytoskeletts (Esensten *et al.*, 2016). Da die Bindungsaffinität an das Antigen-präsentierende MHC-Molekül zunächst schwach ist, führt die Bildung von Clustern von TCR auf der Tumorzelloberfläche zu einer Steigerung der Affinität und Aktivierung (Siokis *et al.*, 2018). Die Stärke dieser Signale steht in direktem Zusammenhang mit der Expansion und den Effektorfunktionen der Immunzellen. Im Gegensatz zur Reaktion auf fremde Mikroorganismen sind die Signale gegen Tumor-Antigene oft schwächer und entsprechend auch die Immunantwort. Dies ist bei wenig responsiven Immunsystemen onkologischer Patient:innen besonders relevant (Haas *et al.*, 2006).

Die Kombination der beiden Stimuli, um eine effektive Immunantwort zu generieren wurde bereits früh erforscht. Es konnte festgestellt werden, dass gegen CD3 und CD28 gerichtete monoklonale Antikörper zu einer starken und dauerhaften Proliferation antigenspezifischer T-Zellen führte (Riddell und Greenberg, 1990). Skokos *et al.* (2020) kombinierten gegen Antigene von Ovarial- und Prostatatumorzellen gerichtete bispezifische CD3- und CD28-Antikörper und konnten damit *in vitro* und *in vivo* sehr gute Ergebnisse erzielen. Zum einen wiesen die CD28-Antikörper alleine nur geringe Aktivitäten und Toxizitäten auf. Zum anderen zeigte sich ein deutlicher synergistischer Effekt auf die T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Lysefähigkeit in xenogenen und syngenem Tumormodellen, wenn man den Antikörper mit einem CD3-Antikörper kombinierte. Auch gegen die ALL erwies sich die Kombination mit einem bispezifischen CD28-Antikörper als effektiver als die alleinige Gabe eines bispezifischen CD3-Antikörpers (Reusch *et al.*, 2004; Laszlo *et al.*, 2015; Skokos *et al.*, 2020).

### 1.3.3.4 Blinatumomab

Blinatumomab ist ein bispezifischer Antikörper, der mit dem Fab-Abschnitt an ein Oberflächenprotein auf B-Zellen, CD19, bindet und mit dem Fc-Abschnitt an CD3 auf T-

Zellen. Da CD19 auch auf malignen Lymphoblasten zu finden ist, wird Blinatumomab zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen, die von B-Zellen ausgehen verwendet (Sanford, 2015). In Deutschland ist er für Erwachsene mit Philadelphia-Chromosom-negativer, rezidivierender oder refraktärer B-Vorläufer-ALL (B-ALL) zugelassen. Verschiedene Studien konnten die Effektivität der Therapie nachweisen (Przepiorka *et al.*, 2015; Kantarjian *et al.*, 2017). Im Rahmen dieser Studie wird Blinatumomab als unspezifischer T-Zell-Aktivator als Kontrolle verwendet.

#### **1.4 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Das Neuroblastom ist ein aus dem sympathischen Nervensystem hervorgehender Tumor, der auf der Oberfläche seiner Zellen das Disialogangliosid GD2 trägt. GD2 wirkt als Antigen und kann von Antikörpern gebunden werden (Navid, Santana und Barfield, 2010). Die NB-Zellen werden so für die Effektorzellen des Immunsystems markiert und über ADCC eliminiert (Yankelevich *et al.*, 2012). Dieser Mechanismus kann therapeutisch genutzt werden, indem artifiziell hergestellte, gegen GD2 gerichtete, Antikörper eingesetzt werden. Der monospezifische GD2-Antikörper Dinutuximab beta rekrutiert über diesen Mechanismus insbesondere NK-Zellen und ist in der Therapie des Hochrisiko-Neuroblastoms bereits etabliert. So konnten Fortschritte gemacht werden, die Behandlungserfolge sind jedoch weiterhin nicht zufriedenstellend und die Prognose der Patient:innen ist schlecht (Simon *et al.*, 2019).

In dieser Studie wird der Einsatz bispezifischer Antikörper, welche an GD2 sowie an Antigene auf T-Zellen binden, untersucht. Die Hypothese ist, dass die Bindung an die T-Zellen über eine Verstärkung der Aktivierung und Proliferation dieser zu einer effektiven Elimination der Neuroblastomzellen führt. Des Weiteren wird angenommen, dass die bispezifischen Antikörper eine bessere Wirkung als der monospezifische Antikörper Dinutuximab beta zeigen.

Ziel dieser Studie ist der *in vitro*-Vergleich von Dinutuximab beta mit den beiden bispezifischen Antikörpern GD2-CD3 und GD2-CD28 sowie einer Kombination dieser. Dazu werden die Effekte der Therapien auf die Lyse von drei Neuroblastom-Zelllinien (NB-Zelllinien) und die Auswirkungen auf die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen von vier Blutspender:innen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Softwareprodukte

<b>Brutschrank</b>	BB 16, CO <sub>2</sub> Inkubator (Heraeus Instruments; Osterode, Deutschland)
<b>Durchflusszytometer</b>	LSRFortessa und FACS Diva Software (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland), FlowJo 7 (FlowJo LLC; Ashland, USA)
<b>Luminometer</b>	FlexStationR 3, Multi-Mode Microplate Reader und SoftMax Pro 5.4.6. Software (Molecular Devices; Kalifornien, USA)

Alle weiteren verwendeten Geräte entsprachen den üblichen Laborstandards.

### 2.2 Chemikalien/Reagenzien/Puffer

#### Zellkultur

<b>Cryo-safe-I</b>	Lagerung des Mediums dunkel bei 4 °C. (c.c.pro GmbH; Neustadt, Deutschland): #9208
<b>Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)</b>	Lagerung dunkel bei 4 °C. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #14190169
<b>Fetal bovine serum (FBS)</b>	Hitze-inaktiviertes Serum, Lagerung bei - 20 °C. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #10500-064
<b>Penicillin-Streptomycin (P/ S)</b>	100 µg/ml, 10.000 U Penicillin, 10.000 U Streptomycin Lagerung der Stocklösung bei -20°C und der Gebrauchslösungen dunkel bei 4 °C. (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #15140122
<b>Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</b>	500 ml RPMI 1640 Medium Lagerung der Stocklösung bei 4°C und der Gebrauchslösungen dunkel bei 4 °C. (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #21875091
<b>RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot</b>	500 ml RPMI 1640 Medium Lagerung der Stocklösung bei 4 °C und der Gebrauchslösungen dunkel bei 4 °C. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #23912

<b>RPMI 1640 Komplettmedium</b>	RPMI 1640 Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #21875091, 10 % FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #10500-064, 1 % Penicillin (10000 Units/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml) (Gibco, Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #15140122 Lagerung der Gebrauchslösung dunkel bei 4 °C.
<b>Trypanblau</b>	Lagerung bei Raumtemperatur. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #15250061
<b>Trypsin (1:250)/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,25 %/ 0,02 %)</b>	Lagerung der Lösung bei -20 °C. (Biochrom AG; Berlin, Deutschland): #L2163
<b>Lyse-Assay</b>	
<b>D-Luciferin</b>	0,4 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) Lagerung der Stocklösung in 55 µl Aliquots bei -20 °C. (Sigma-Aldrich; St.Louis, USA): #L9504
<b>Ficoll Paque Plus</b>	Lagerung der Gebrauchslösungen dunkel bei 4 °C. (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA): #GE17-1440-02
<b>Durchflusszytometrie</b>	
<b>CellTrace™ Violet</b>	Lagerung der Stocklösung dunkel bei < -20 °C. (Invitrogen; Karlsbad, USA): #C34571
<b>DPBS</b>	Lagerung dunkel bei 4 °C. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #14190169
<b>Phytohämagglutinin (PHA)</b>	Herstellung der Stocklösung aus 5 mg PHA und 1 ml DPBS (5 µg/µl). Herstellung der Gebrauchslösung (2,5 µg/ml) aus Stocklösung und RPMI-Komplettmedium. Lagerung der Stocklösung und der Gebrauchslösung dunkel bei 4 °C. (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA): #00-4977-03

### 2.3 Therapeutische Antikörper

Die therapeutischen Antikörper wurden als Stocklösung in DPBS bei 4 °C gelagert. Vor jedem Versuch wurde eine Gebrauchslösung in RPMI-Medium (+ 10 % FCS, 1 % P/S) mit einer Konzentration von 200 ng/ml (GD2-CD3, GD2-CD28), 4 µg/µl (Dinutuximab beta) beziehungsweise 20 ng/µl (Blinatumomab) angesetzt, um den

Verdünnungsfaktor von 1:4 je Well mit einzurechnen. Die Gebrauchslösung wurde über den Zeitraum des Versuchs auf Eis gelagert. Die Antikörperkonzentrationen sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

**Tabelle 3:** Endkonzentrationen der therapeutischen Antikörper in den Lyse-Assays und bei der Etablierung der Konditionen.

Antikörper	hohe Konzentration	niedrige Konzentration
GD2-CD3	50 ng/ml	5 ng/ml
GD2-CD28	50 ng/ml	5 ng/ml
GD2-CD3 + GD2-CD28	50 ng/ml + 50 ng/ml	5 ng/ml + 5 ng/ml
Dinutuximab beta	1 µg/ml	

**Tabelle 4:** Konzentrationen der therapeutischen Antikörper in den Aktivierungs- und Proliferationsassays.

Antikörper	Stocklösung	Endkonzentration
GD2-CD3	0,8 µg/µl in DPBS	5 ng/ml
GD2-CD28	0,46 µg/µl in DPBS	5 ng/ml
GD2-CD3 + GD2-CD28	0,8 µg/µl in DPBS + 0,46 µg/µl in DPBS	5 ng/ml + 5 ng/ml
Dinutuximab beta	4,5 µg/µl in DPBS	1 µg/ml
Blinatumomab	10 µg/ ml in DPBS	5 ng/ml

## 2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bei den für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpern handelt es sich um gegen Oberflächenantigene auf menschlichen Zellen gerichtete, primäre Antikörper. Die einzige Ausnahme davon bildet der Fixable Viability Stain 780 (FVS 780) - zur Unterscheidung lebender von toten Zellen, färbt dieser Marker, bei erhöhter Permeabilität der Zellwand, intrazelluläre Proteine (Johnson, Nguyen und Coder, 2013). Die optimale Konzentration für die Färbung wurde mittels Titration bestimmt und ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Färbung erfolgte unmittelbar vor der Messung.

**Tabelle 5:** Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Fluorochrom	Spektrum (Ex Max (nm))	Hersteller	Konzentration	Ziel
Anti-CD3	FITC	494	BD Biosciences	10 µl/1*10 <sup>6</sup> Zellen	T-Zellen
Anti-CD4	BV711	407	BD Biosciences	5 µl/1*10 <sup>6</sup> Zellen	T-Helferzellen
Anti-CD8	PerCP Cy 5.5	482	BD Biosciences	5 µl/1*10 <sup>6</sup> Zellen	Zytotoxische T-Zellen
Anti-CD25	TexasRed	615	BD Biosciences	5 µl/1*10 <sup>6</sup> Zellen	Aktivierung
Anti-CD69	PE Cy7	496, 564	BD Biosciences	5 µl/1*10 <sup>6</sup> Zellen	Aktivierung
Intrazellulär	FVS 780	759	BD Biosciences	3 µl/ 1*10 <sup>6</sup> Zellen	Tote Zellen

## **2.5 Kultivierung der Neuroblastom-Zelllinien**

Die Durchführung der Versuche erfolgte anhand von drei humanen NB-Zelllinien: LS, LAN-1 und SHSY5Y. Die Zelllinien LS und LAN-1 verfügten über eine hohe Dichte des Oberflächenproteins GD2, während die Zelllinie SHSY5Y dieses nur in geringem Maß aufwies. Alle Zelllinien wurden vorab mit einem Luciferase-Reporter-Gen versetzt und wuchsen adhärent.

### **2.5.1 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden bei 37 °C, > 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in adhäsionsfähigen Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S verwendet. Die Zellkulturflaschen wurden nur unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Reinraumwerkbank geöffnet. Das Medium wurde regelmäßig optisch auf Gelbumschlag untersucht, welcher durch den PH-Indikator Phenolrot zustande kommt, sobald sich das Medium in einen sauren PH-Bereich verändert. War dies der Fall, wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch frisches, vorgewärmtes (Wasserbad, 37 °C) RPMI-Komplettmedium ersetzt.

### **2.5.2 Anlegen einer Subkultur**

Ergab die regelmäßige mikroskopische Begutachtung der 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen, dass der Boden vollständig mit NB-Zellen bewachsen war, wurde die Zellzahl reduziert, indem Subkulturen in neuen Zellkulturflaschen angelegt oder ein Teil der Zellen verworfen wurde. Dafür wurde das alte Medium zunächst mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5 ml PBS gewaschen. Das Waschen war notwendig, damit das im Medium enthaltene FBS die Aktivität des Trypsins nicht beeinträchtigte. Nachdem das PBS abgesaugt war, wurde der Boden der Zellkulturflaschen mit 5 ml Trypsin benetzt und die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft und die Zellen gegebenenfalls noch länger inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml Komplettmedium gestoppt und die entstandene Suspension gründlich durch auf- und abpipettieren

gemischt. Die Zellen wurden, je nach Wachstumsverhalten, im Verhältnis 1:2 bis 1:30 gesplittet. Ein Anteil wurde in eine neue 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt oder verworfen. Die Flaschen wurden abschließend mit ca. 40 ml frischem, vorgewärmtem Komplettmedium aufgefüllt und zur weiteren Kultivierung im Brutschrank aufbewahrt.

### 2.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der für die Experimente benötigten Zellzahl an NB-Zellen oder peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), erfolgte mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einer Neubauer-Zählkammer. Die Färbung mit Trypanblau dient der Bestimmung der Anzahl an vitalen Zellen. Da der Farbstoff eine intakte Zellwand nicht durchdringen kann, werden lebende Zellen unter dem Mikroskop heller dargestellt als tote (Strober, 1997). Die durchschnittliche Zellzahl der Quadranten führt über folgende Formel zu einer Einschätzung der Gesamtzellzahl in der Zellsuspension:

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

Für die Zählung wurde die Zellsuspension in Medium zunächst durch auf- und abpipettieren gut durchmischt. Aufgrund der hohen Zellzahlen erfolgte die Färbung meist im Verhältnis 10:1. Dafür wurden 10 µl der Suspension entnommen und in einem 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen mit 90 µl Trypanblau vermischt. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Suspension in eine Zählkammer gegeben.

Um das Volumen der Ausgangslösung zu ermitteln, das für die Herstellung der für einen Versuch gewünschten Konzentration in einem bestimmten Volumen notwendig war, wurde folgende Formel angewendet:

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

### 2.5.4 Kryokonservierung und Auftauprozess

Um bei Bedarf auf junge Zellen mit niedrigen Passagezahlen zugreifen zu können, wurden regelmäßig NB-Zellen eingefroren, also kryokonserviert. Hierfür wurden die

Zellen zunächst durch Zugabe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, dann mit PBS gewaschen und anschließend ausgezählt. Eine Zellzahl von  $2-4 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen wurde auf Eis mit je 1 ml Einfriermedium (Cryo-safe I) versetzt. Danach wurden die Zellen sequentiell runtergekühlt – zunächst 40 Minuten auf  $-20^{\circ}\text{C}$ , dann über Nacht auf  $-80^{\circ}$  und abschließend zur weiteren Verwahrung in einem Stickstofftank auf  $-196^{\circ}\text{C}$ . Zur Rekultivierung wurden die Zellen zügig im Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) aufgetaut, mit 10 ml frischem, erwärmtem RPMI-Komplettmedium versetzt und in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen überführt. Am Folgetag wurde das RPMI-Komplettmedium ausgetauscht, um schädliche Reste vom Einfriermedium endgültig zu entfernen. Waren die Zellkulturflaschen stark bewachsen, wurden die Zellen in größere Zellkulturflaschen überführt.

### **2.5.5 Quantifizierung von GD2 auf der Zelloberfläche**

Die Bestimmung des Anteils an GD2-Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche der NB-Zelllinien erfolgte durchflusszytometrisch. Dazu wurden für jede Zelllinie Triplikate von je  $1 \times 10^6$  Tumorzellen bestehend aus folgenden Ansätzen hergestellt: 1. ungefärbte NB-Zellen 2. mit einer Isotyp-Kontrolle gefärbte NB-Zellen, 3. mit einem GD2-Antikörper gefärbte NB-Zellen. Es wurden je  $5 \mu\text{l}$  des GD2-Antikörpers beziehungsweise  $20 \mu\text{l}$  der Isotyp-Kontrolle je Well hinzugegeben. Neben der deskriptiven Auswertung wurde durch die Division des Medians der Antikörperfärbung durch den Median der Isotyp-Kontrolle die Median Fluorescence Intensity-Ratio (MFI-R) bestimmt. Anhand dieser erfolgt der Nachweis der spezifischen GD2-Antikörperbindung.

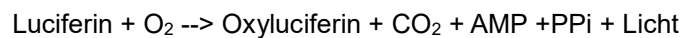
### **2.6 Isolation der peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut**

Die Isolation von PBMCs aus dem Vollblut der vier Spender:innen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die venöse Blutentnahme in EDTA-Monovetten fand unmittelbar vor dem Versuch statt. Danach wurde das Vollblut zunächst 1:1 mit RPMI-Medium verdünnt und die Suspension vorsichtig auf Ficoll aufgetragen. Nach der Zentrifugation in einer freischwingenden Zentrifuge, konnte der „Lymphozytentepich“ abgenommen und mit DPBS gewaschen werden. Abschließend wurden die Zellen in frischem RPMI-Medium resuspendiert und ausgezählt.



## 2.7 Lyse-Assays

Um die Wirkung verschiedener Behandlungsansätze auf die Entwicklung der NB-Zellzahl zu untersuchen, wurden Lyse-Assays in Form von Luciferase-Assays durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode ist die direkte Ermittlung der Zellzahl über die Messung von Lumineszenz. Da die Tumorzellen mit einem Luciferase-Gen transfiziert wurden, setzen sie das Substrat Luciferin um, welches nach folgender Reaktionsgleichung zu Biolumineszenz führt (Gould und Subramani, 1988):



Die Lumineszenz kann im Mikroplatten-Luminometer gemessen werden. Sie steht in direktem proportionalen Verhältnis zur Anzahl lebender Tumorzellen. Die optimale Zellzahl für die Versuche wurde durch eine Titration vorab empirisch ermittelt und ergab eine Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen/Well. Bei einem Pipettiervolumen von 50  $\mu\text{l}$  pro Well wurde nach dem Auszählen eine Zellsuspension in RPMI-Komplettmedium mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte verschiedenen Bedingungen ausgesetzt. Ein exemplarisches Pipettierschema ist in Tabelle 6 dargestellt. Pro Bedingung wurden Triplikate angelegt. Die Bedingungen bestanden aus den Antikörper-Therapien in unterschiedlichen Konzentrationen sowie zwei verschiedenen Effektorzellen-Zielzellen-Ratios (E/T-Ratios). Als Negativkontrollen dienten Tumorzellen mit oder ohne PBMCs, welche keinem der Behandlungsansätze unterzogen wurden (ohne Antikörper (w/o AK)). Um die Entwicklung der Zellzahl ohne Behandlung nachvollziehen zu können, wurde zudem eine Verdünnungsreihe der Tumorzellen angelegt. Als Hintergrundkontrolle wurde ein Triplikat angelegt, welches ausschließlich das RPMI-Komplettmedium enthielt in welchem auch die Zellen suspendiert waren. Wie in Tabelle 7 dargestellt wurden 50  $\mu\text{l}$  des Substrats Luciferin (Endkonzentration im Well: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugegeben. Das Gesamtvolumen im Well betrug für die Dauer des Versuchs jeweils 200  $\mu\text{l}$ . Das Aussäen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

**Tabelle 6:** Exemplarisches Pipettierschema für ein Lyse-Assay für einen Zeitpunkt, eine/einen Spender:in und eine NB-Zelllinie. Es wurden jeweils E/T-Ratios von 2:1 und 1:1 sowie die angegebenen Antikörperkonzentrationen angesetzt. Abkürzungen: Dinutux. beta, Dinutuximab beta; E/T, Effektorzellen-Zielzellen-Ratio; NB-Zellen, Neuroblastomzellen; w/o AK, ohne Antikörper.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	nur NB-Zellen	E/T 2:1 w/o AK	E/T 2:1 w/o AK	E/T 2:1 w/o AK	nur NB-Zellen	E/T 2:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	E/T 2:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	E/T 2:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	0,5*10 <sup>5</sup>	0,5*10 <sup>5</sup>	0,5*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
B	nur NB-Zellen	E/T 1:1 w/o AK	E/T 1:1 w/o AK	E/T 1:1 w/o AK	nur NB-Zellen	E/T 1:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	E/T 1:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	E/T 1:1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	0,4*10 <sup>5</sup>	0,4*10 <sup>5</sup>	0,4*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
C	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	0,3*10 <sup>5</sup>	0,3*10 <sup>5</sup>	0,3*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
D	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 (50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	0,2*10 <sup>5</sup>	0,2*10 <sup>5</sup>	0,2*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
E	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	0,1*10 <sup>5</sup>	0,1*10 <sup>5</sup>	0,1*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
F	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD28 (50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	0,05*10 <sup>5</sup>	0,05*10 <sup>5</sup>	0,05*10 <sup>5</sup>	nur NB-Zellen
G	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)	E/T 2:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)	RPMI-Medium	RPMI-Medium	RPMI-Medium	nur NB-Zellen
H	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 50 ng/ml)	nur NB-Zellen	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)	E/T 1:1 GD2-CD3 + GD2-CD28 (je 5 ng/ml)				nur NB-Zellen

**Tabelle 7:** Pipettierolumina der Lyse-Assays. Abkürzungen: NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, Periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

w/o AK:	50 µl NB-Zellen + 50 µl PBMCs + 50 µl Medium + 50 µl Luciferin
mit Antikörpern:	50 µl NB-Zellen + 50 µl PBMCs + 50 µl Antikörper + 50µl Luciferin
nur NB-Zellen:	50 µl NB-Zellen + 100 µl Medium + 50 µl Luciferin
RPMI-Medium:	150 µl RPMI-Medium + 50 µl Luciferin

Nach dem Aussäen wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Lumineszenz wurde nach 12, 24, 36 und 48 h (h) bei 37°C im Luminometer gemessen. Die Experimente wurden pro Blutspender:in mindestens dreimal wiederholt.

## 2.8 Zelluläre Proliferations- und Aktivierungsassays

Zur Untersuchung der Aktivierung und Proliferation der PBMCs wurden Aktivierungs- und Proliferationsassays durchgeführt. Wie in Tabelle 8 dargestellt, wurden dafür verschiedene Ansätze aus Tumorzellen, PBMCs und therapeutischen Antikörpern in 48-Well Mikrotiterplatten ausgesät und nach 48 und 96 h mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Versuchsansatz wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung bis zur Messung erfolgte bei

37 °C, > 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank. Je Messzeitpunkt und Spender:in wurden Triplikate nach dem Versuchsschema in Tabelle 8 angelegt.

**Tabelle 8:** Exemplarisches Pipettierschema für ein Proliferations-/Aktivierungsassay für einen Zeitpunkt und eine/einen Spender:in für alle NB-Zelllinien und die Kontrolle ohne NB-Zellen. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Abkürzungen: Dinutux. beta, Dinutuximab beta; PHA, Phytohämagglutinin; PBMCs, Periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	nur PBMCs Dinutux. beta (1 µg/ml)	nur PBMCs Dinutux. beta (1 µg/ml)	nur PBMCs Dinutux. beta (1 µg/ml)	PHA	LS (gefärbt)	LS Dinutux. beta (1 µg/ml)	LS Dinutux. beta (1 µg/ml)	LS Dinutux. beta (1 µg/ml)
B	nur PBMCs Blinatumomab (5 ng/ml)	nur PBMCs Blinatumomab (5 ng/ml)	nur PBMCs Blinatumomab (5 ng/ml)	PHA	LS (gefärbt)	LS Blinatumomab (5 ng/ml)	LS Blinatumomab (5 ng/ml)	LS Blinatumomab (5 ng/ml)
C	nur PBMCs GD2-CD3 (5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD3 (5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD3 (5 ng/ml)	PHA	LS (gefärbt)	LS GD2-CD3 (5 ng/ml)	LS GD2-CD3 (5 ng/ml)	LS GD2-CD3 (5 ng/ml)
D	nur PBMCs GD2-CD28 (5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD28 (5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD28 (5 ng/ml)	PBMCs ungefärbt		LS GD2-CD28 (5 ng/ml)	LS GD2-CD28 (5 ng/ml)	LS GD2-CD28 (5 ng/ml)
E	nur PBMCs GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	nur PBMCs GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)			LS GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	LS GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	LS GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)
F	nur PBMCs w/o AK	nur PBMCs w/o AK	nur PBMCs w/o AK			LS + PBMCs w/o AK	LS + PBMCs w/o AK	LS + PBMCs w/o AK

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	LAN-1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	LAN-1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	LAN-1 Dinutux. beta (1 µg/ml)	LAN-1 (gefärbt)	SHSY5Y (gefärbt)	SHSY5Y Dinutux. beta (1 µg/ml)	SHSY5Y Dinutux. beta (1 µg/ml)	SHSY5Y Dinutux. beta (1 µg/ml)
B	LAN-1 Blinatumomab (5 ng/ml)	LAN-1 Blinatumomab (5 ng/ml)	LAN-1 Blinatumomab (5 ng/ml)	LAN-1 (gefärbt)	SHSY5Y (gefärbt)	SHSY5Y Blinatumomab (5 ng/ml)	SHSY5Y Blinatumomab (5 ng/ml)	SHSY5Y Blinatumomab (5 ng/ml)
C	LAN-1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD3 (5 ng/ml)	LAN-1 (gefärbt)	SHSY5Y (gefärbt)	SHSY5Y GD2-CD3 (5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD3 (5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD3 (5 ng/ml)
D	LAN-1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD28 (5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD28 (5 ng/ml)			SHSY5Y GD2-CD28 (5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD28 (5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD28 (5 ng/ml)
E	LAN-1 GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	LAN-1 GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)			SHSY5Y GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)	SHSY5Y GD2-CD3 + GD2- CD28 (je 5 ng/ml)
F	LAN-1 + PBMCs w/o AK	LAN-1 + PBMCs w/o AK	LAN-1 + PBMCs w/o AK			SHSY5Y + PBMCs w/o AK	SHSY5Y + PBMCs w/o AK	SHSY5Y + PBMCs w/o AK

NB-Zellen, PBMCs und Antikörper wurden je Well in 400 µl RPMI-Komplettmedium angesetzt. Die Antikörper-Stocks wurden gevortext und auf Eis mit Medium auf eine Konzentration von je 20 ng/ml (GD2-CD3, GD2-CD28), 4 µg/ml (Dinutuximab beta)

beziehungsweise 20 ng/ml (Blinatumomab) verdünnt. Da jeweils 100 µl dieser Antikörper-Lösung je Well dazupipettiert wurden, entsprach die Endkonzentration im Well somit jeweils 5 ng/ml (GD2-CD3, GD2-CD28), 1 µg/ml (Dinutuximab beta) beziehungsweise 5 ng/ml (Blinatumomab). Die NB-Zellen und PBMCs wurden nach der letzten Zentrifugation in warmem Medium (37°C) resuspendiert und auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro 100 µl gebracht. NB-Zellen und PBMCs wurden im Verhältnis 1:1 in die Wells pipettiert und die therapeutischen Antikörper in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben. Zum Schluss wurden die Wells auf 400 µl mit Medium aufgefüllt.

Als Negativkontrolle diente ein Triplikat, das nur aus PBMCs bestand und als Positivkontrolle eines aus PBMCs, die mit PHA stimuliert worden waren (jeweils mit einer Zellzahl von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro 100 µl). Außerdem wurde je Spender:in ein Well mit ungefärbten PBMCs und je NB-Zelllinie ein Triplikat mit gefärbten NB-Zellen angelegt. Diese Ansätze dienen der Hintergrundkontrolle, da in geringem Ausmaß eine Autofluoreszenz der Zellen festgestellt werden konnte.

### **2.8.1 Stimulation der Effektorzellen mit Phytohämagglutinin**

Zum Nachweis der Proliferations- und Aktivierungsfähigkeit der Effektorzellen wurden je Spender:in Positivkontrollen mit PHA durchgeführt. Dazu wurden 0,15 µl der Stocklösung (5 mg PHA/1 ml DPBS (5 µg/µl)) durch die Zugabe von 300 µl Medium auf eine Gebrauchslösung von 2,5 µg/ml verdünnt. Je Spender:in und Versuch wurden Triplikate mit 100 µl PBMCs + 200 µl RPMI-Medium + 100 µl der PHA-Gebrauchslösung angesetzt.

### **2.8.2 Färbung der Effektorzellen mit Celltrace Violet**

Celltrace Violet wurde genutzt, um die Proliferation der PBMCs unter unterschiedlichen Behandlungsbedingungen zu untersuchen. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der die Proliferationsanalyse möglich macht. Der Farbstoff bindet gleichmäßig an intrazelluläre Amine und wird mit jeder Zellteilung verdünnt. Eine abnehmende Signalstärke lässt somit auf spätere Generationen in der Zellteilung schließen (Lyons, Blake und Doherty, 2013). Celltrace Violet entspricht in seiner

Fluoreszenz dem Fluorochrom BV405 und wird bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt.

Die Herstellung des Stocks erfolgte unmittelbar vor dem Versuch durch Zugabe von 20 µl DMSO zu einem Röhrchen mit Celltrace-Puder. Je  $1 \times 10^6$ /1 ml DPBS suspendierten Zellen, wurde 1 µl Stock hinzugegeben. Danach wurden die Zellen unter Bewegung 20 Minuten inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff abzuwaschen, wurde die Suspension danach mit der fünffachen Menge RPMI-Medium verdünnt und weitere 5 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem RPMI-Medium resuspendiert.

### **2.8.3 Zellaufreinigung**

Um die Aktivierung und Proliferation 48 und 96 h nach Behandlungsbeginn zu untersuchen, wurden die gleichen Bedingungen auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten für die zwei Zeitpunkte angesetzt. Je Messzeitpunkt wurden die PBMCs der entsprechenden Mikrotiterplatte fluoreszenzmarkiert und im Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Zunächst wurde der Überstand aus den Wells mit einer 1000 µl-Pipette in FACS-Röhrchen überführt und die Wells nochmals mit 400 µl vorgewärmtem PBS ausgewaschen, welches ebenfalls in die Röhrchen überführt wurde. In den Wells mit gefärbten NB-Zellen wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl vorgewärmtem Trypsin und fünfminütige Inkubation vom Boden des Wells gelöst. Danach wurden die Zellen in weiteren 1000 µl PBS gewaschen. Nach der Zentrifugierung wurden die Röhrchen ausgeklopft und überschüssige Flüssigkeit in einem Papiertuch aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit den FACS-Antikörpern gefärbt.

### **2.9 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden Oberflächenproteine von Zellen mit Antikörpern gefärbt, also fluoreszenzmarkiert. Das FACS durchlaufen diese Zellen einzeln, wodurch die Messung sehr sensibel ist. Über die gemessenen unterschiedlichen Fluoreszenzen können Zellpopulationen differenziert und verschiedene Charakteristika der Zellen identifiziert werden (Jahan-Tigh *et al.*, 2012).

### 2.9.1 Färbung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie

Die Färbung mit den FACS-Antikörpern erfolgte auf Eis und unmittelbar nach der ersten Zentrifugierung nach Entnahme aus der 48-Well Mikrotiterplatte. Hierfür wurde ein Mastermix der Antikörper mit DPBS angefertigt und dunkel, auf einer Temperatur von 4°C gehalten. Das Gesamtvolumen des Mastermixes entsprach einem Volumen von 100 µl je Röhrchen. Je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden die in Tabelle 9 angegebenen Mengen Antikörper zu DPBS hinzugegeben.

**Tabelle 9:** Antikörpermenge pro  $1 \times 10^6$  Zellen für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Pipettiervolumen pro $1 \times 10^6$ Zellen
Anti-CD3	10 µl
Anti-CD4	5 µl
Anti-CD8	5 µl
Anti-CD25	5 µl
Anti-CD69	5 µl
FVS 780	1 µl

Zur Färbung wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gelagert und je Röhrchen 100 µl des zuvor gevortexten Mastermixes mit einer Multipipette hinzugegeben. Danach wurden die Röhrchen mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit je 1000 µl DPBS gewaschen und die Röhrchen nach der Zentrifugierung auf einem Papiertuch ausgeklopft. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl CB-Puffer je Röhrchen mit einer Multipipette.

### 2.9.2 Fluorescence-Minus-One-Kontrollen

Um das Gating bei der Auswertung mit FlowJo zu optimieren wurden Fluorescence-Minus-One-Kontrollen (FMO-Kontrollen) eingesetzt. Hierbei wurden PBMCs jeweils einmal mit nur einem FACS-Antikörper gefärbt und einmal mit allen Antikörpern außer diesem (FMO-Kontrolle). Der Vergleich der ungefärbten PBMCs mit der Einfachfärbung und der FMO-Kontrolle in FlowJo erlaubt ein genaues Gating und die Minimierung der Streuung eines Farbstoffs in andere Kanäle.

### 2.9.3 Einstellungen am FACS LSRFortessa

Die Durchflusszytometrie erfolgte am BD LSRFortessa. Dieses verfügt über vier Laser und kann bis zu 18 Farben gleichzeitig detektieren. Die Einstellungen für die Messungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Fluoreszenzfarbstoffe je Antikörper und Einstellungen am BD LSRFortessa.

Laser	PMT	LP Filter	BP Filter	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörper
405 nm	B	680	710/50	BV711	Anti-CD4
	G	leer	450/50	Pacific Blue	Celltrace Violet
488 nm	A	685	695/40	PerCP Cy 5.5	Anti-CD8
	B	505	530/30	FITC	Anti-CD3
561 nm	A	750	780/60	PE Cy7	Anti-CD69
	D	600	610/20	PE-TexasRed	Anti-CD25
640 nm	A	750	780/60	FVS780	tote Zellen

## 2.10 Auswertung

### 2.10.1 Auswertung der Lyse-Assays

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank geholt und die Lumineszenz unter dem Luminometer gemessen. Die Ab beziehungsweise Zunahme der Lumineszenz berechnete sich aus der Differenz der Ansätze zu den Kontrollen, die nur aus Tumorzellen bestanden. Die Angaben erfolgten in Prozent, wobei  $> 100\%$  einer Zunahme und  $< 100\%$  einer Abnahme der Lumineszenz entsprachen. Es wurden jeweils die Mittelwerte der Triplikate berechnet und für die weitere Auswertung verwendet. Das Luminometer misst die Wells immer in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit, wobei es aufgrund von Umwelteinflüssen zu einer Ab- oder Zunahme der gemessenen Lumineszenz kommen kann. Um diese Ab- oder Zunahme für alle Ansätze zu korrigieren, wurde anhand der Kontrollen eine vom Messzeitpunkt (von Well A1 bis Well H12) abhängige Korrekturformel berechnet und angewendet. Hierdurch wurden Wertveränderungen in der Messung ausgeglichen, die vor allem durch Veränderungen in der Umgebung bedingt werden. Dies sind allen voran der pH und die Temperatur. Beide werden in einem Inkubator durch Begasung mit  $5\%$   $\text{CO}_2$  und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  konstant gehalten.

Außerhalb des Inkubators kommt es zu einem sukzessiven Anstieg des pH und einem Abfall der Temperatur, was sich auf die Luciferaseaktivität und damit die Biolumineszenzwerte auswirkt. Diese Korrektur ist in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt.

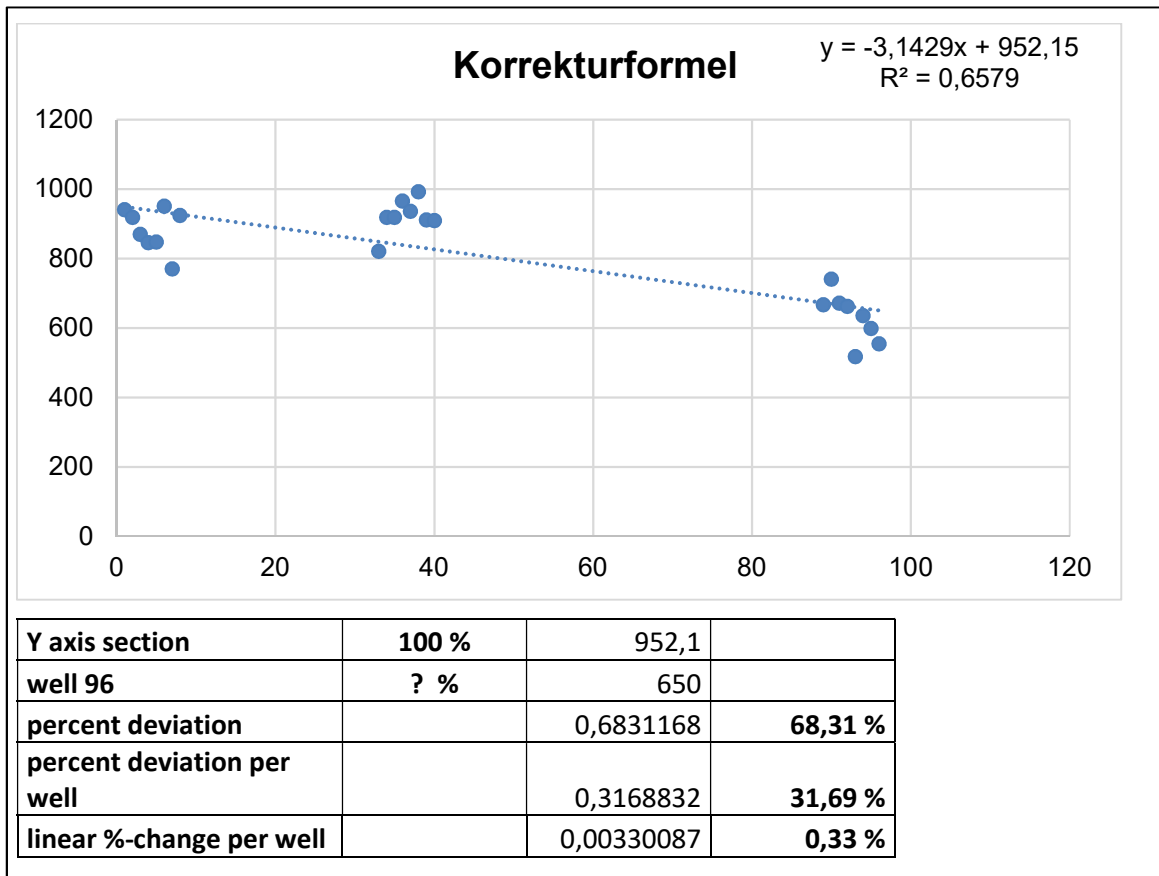


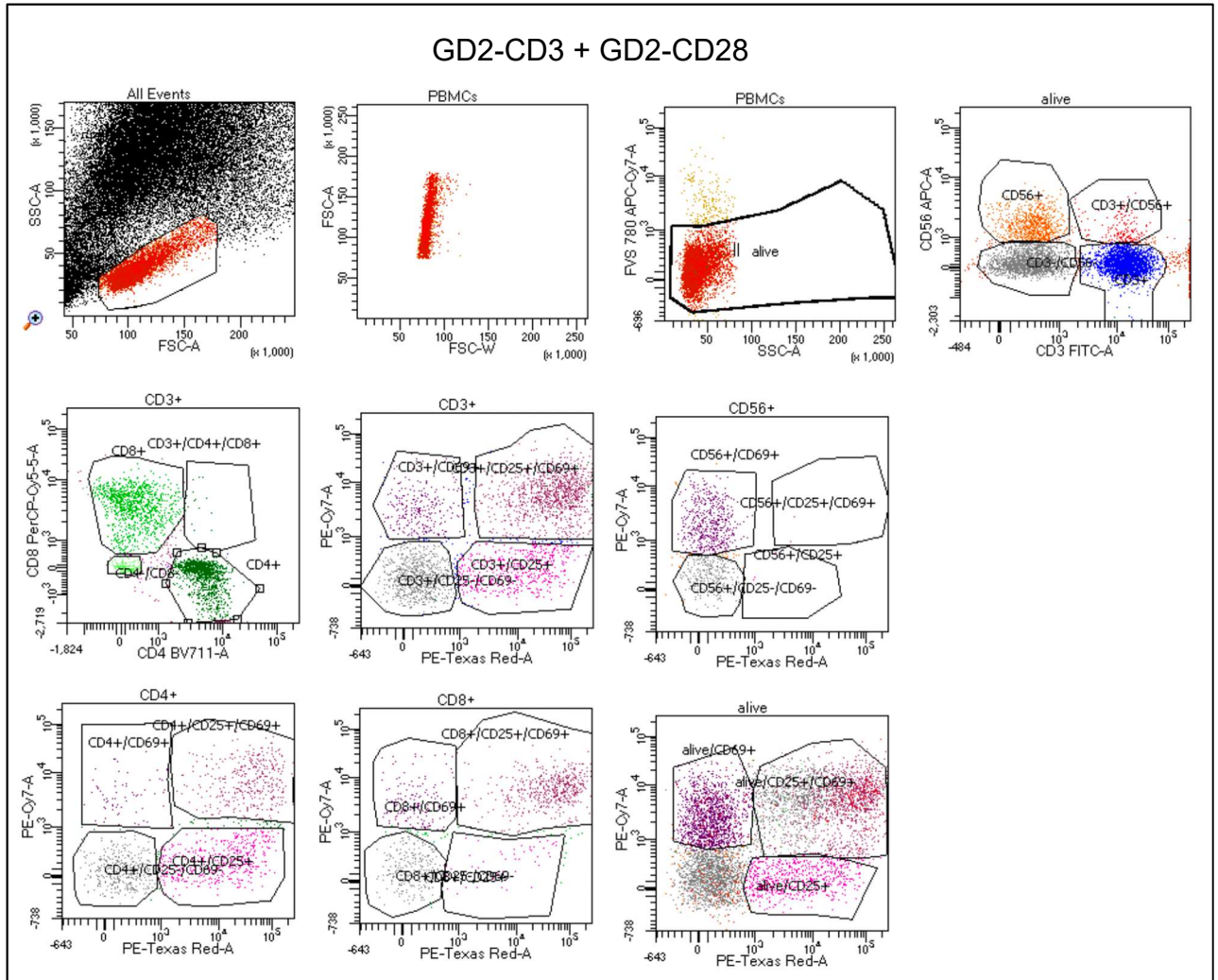
Abbildung 2: Beispielhafte Korrekturformel für die Auswertung der luminometrischen Messungen in den Lyse-Assays.

## 2.10.2 Auswertung der zellulären Proliferationsassays

### 2.10.2.1 Auswertung von Ergebnissen der Durchflusszytometrie

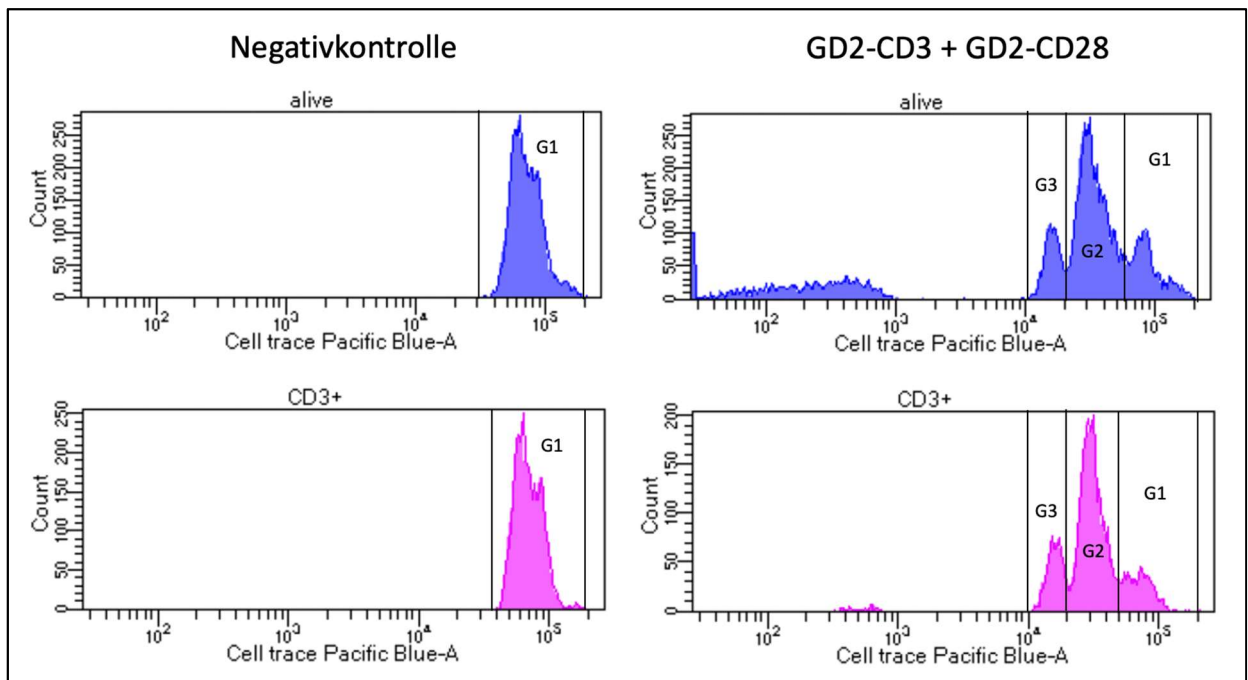
Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden zunächst am LSRFortessa über die FACS Diva Software ausgegeben. Anschließend wurden sie mit dem Programm FlowJo 7 ausgewertet. Zunächst erfolgte das Gating auf PBMCs nach Zellgröße (FSC-A, FSC-W), dann nach lebenden Zellen (FVS780) sowie anschließend nach den Lymphozyten- und Aktivierungsmarkern. Das Gating-Schema ist in der Abbildung 3 beispielhaft dargestellt.





**Abbildung 3:** Exemplarische Darstellung des Gating-Schemas in FlowJo 7 für eine/einen Spender:in und eine Zelllinie unter der Kombinationsbehandlung (GD2-CD3 + GD2-CD28) nach 48 h. Abkürzungen: h, Stunden; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.

Die verschiedenen Generationen an geteilten Zellen (G1, G2, G3) konnten durch die Verdünnung des Celltrace-Farbstoffs voneinander abgegrenzt werden und wurden mit der Negativkontrolle als Referenz gated, wie in Abbildung 4 beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 4:** Proliferation der Negativkontrolle (nur PBMCs) versus Kombinationsbehandlung (GD2-CD3 + GD2-CD28) nach 72 h bei einer/einem Spender:in. G1 markiert die ungeteilten Zellen und G2 und G3 die folgenden Zellgenerationen. Abkürzungen: G, Generation; h, Stunden; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.

### 2.10.3 Statistik

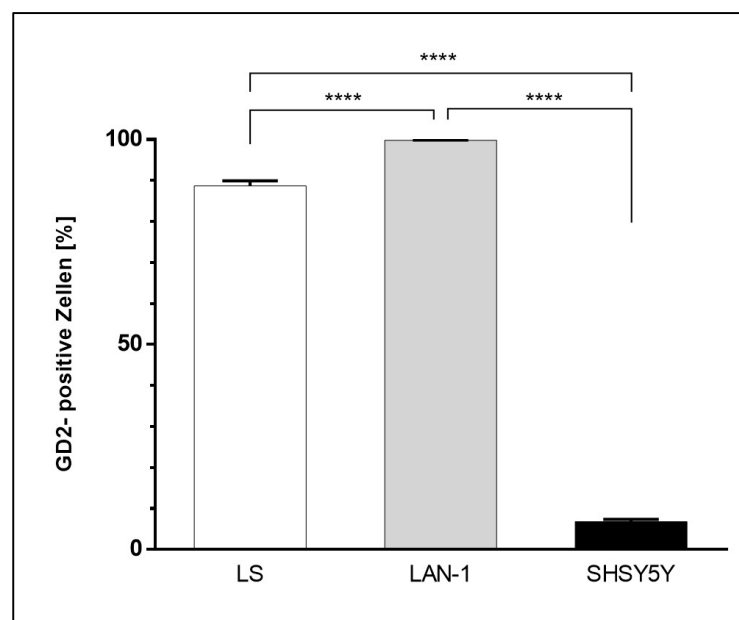
Die statistischen Analysen, Tests und Darstellungen wurden mit der Graphpad Prism 7.0 oder 9.0 Software und Microsoft Excel durchgeführt. Deskriptiv werden die Mittelwerte der Triplikate und Experimente dargestellt und die entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die Lyse-Assays wurden drei- bis neunmal durchgeführt. Bei den Aktivierungs- und Proliferationsassays reichte die Durchführung eines Experiments je Spender:in aufgrund der hohen Genauigkeit der Durchflusszytometrie. In jedem Experiment wurden je Bedingung Triplikate angelegt. Für die Bestimmung von statistisch signifikanten Gruppenunterschieden zwischen den Behandlungsansätzen wurden jeweils einfaktorielle Varianzanalysen mit Tukey post-hoc Test berechnet. Das Signifikanzniveau betrug  $p = 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Lyse-, Aktivierungs- und Proliferationsassays beschrieben. Vorab wird außerdem die GD2-Expression und GD2-Antikörperbindung auf den NB-Zelllinien dargestellt. Des Weiteren werden die Ergebnisse der Etablierung der Konditionen für die Zellkultur-Versuche beschrieben. Wie im vorherigen Abschnitt (Abschnitt 2) erläutert, dienen als experimentelles Modell drei NB-Zelllinien sowie die PBMCs von vier Vollblutspender:innen. Der Fokus lag auf dem Vergleich der etablierten Therapie mit Dinutuximab beta mit den neuartigen bispezifischen Antikörpern GD2-CD3, GD2-CD28 und der Kombinationsbehandlung aus beiden. Als Kontrollen dienten unbehandelte PBMCs mit und ohne NB-Zellen sowie der Antikörper Blinatumomab.

#### 3.1 GD2-Expression und GD2-Antikörperbindung auf den Neuroblastom-Zelllinien

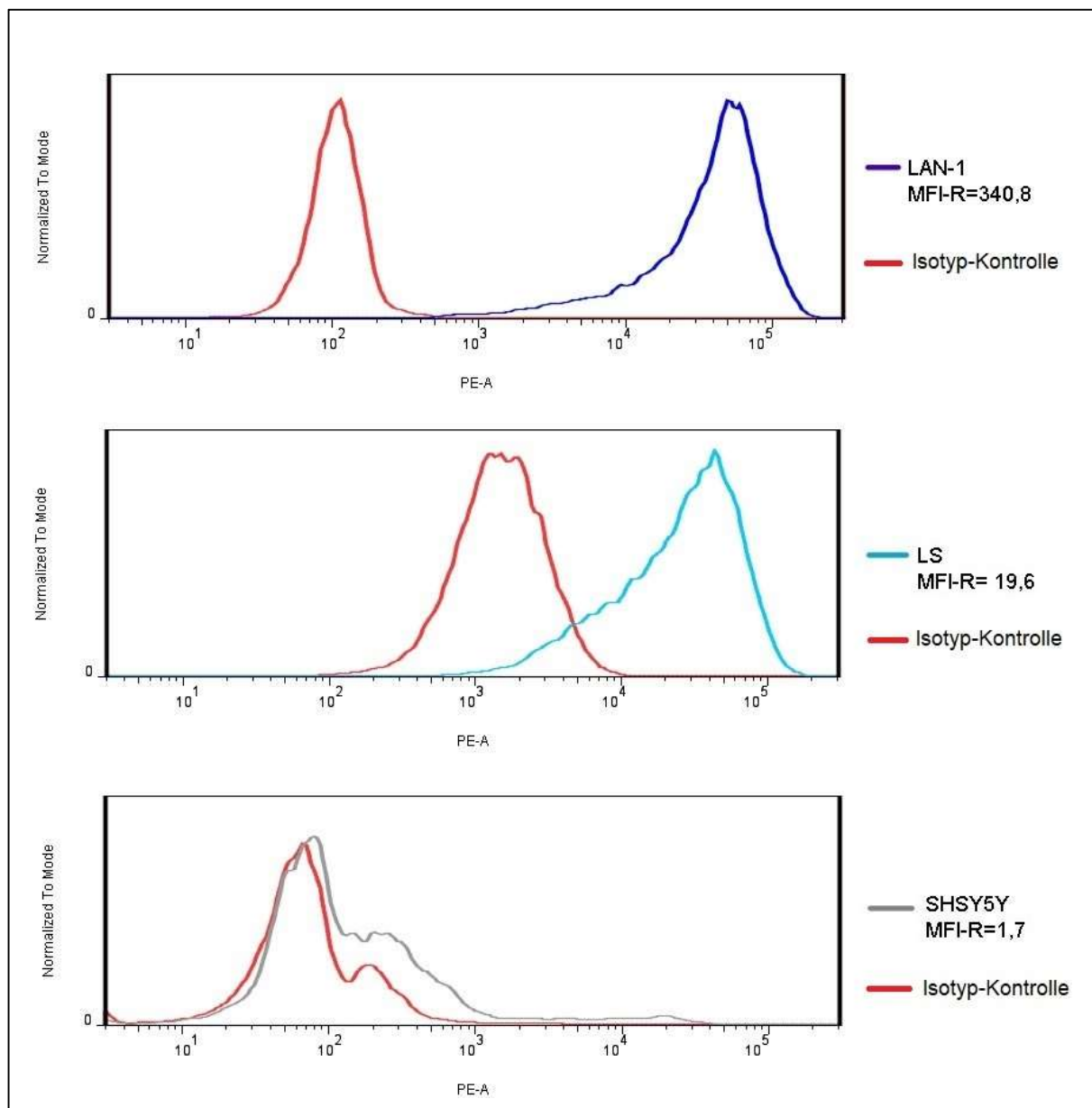
Zunächst wurde die GD2-Expression auf der Oberfläche der drei NB-Zelllinien LAN-1, LS und SHSY5Y durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abbildung 5:** Prozentuale Verteilung der GD2-Expression auf den NB-Zelllinien. Die NB-Zellen wurden mit einer Isotyp-Kontrolle sowie mit einem GD2-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen jeweils eines Triplikats von einem Experiment ( $N = 1$ ) sowie die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests. \*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ . Abkürzung: NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; NB-Zelllinien, Neuroblastom-Zelllinien.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, konnten signifikant unterschiedliche GD2-Expressionsraten zwischen den Zelllinien festgestellt werden ( $p \leq 0,0001$ ). Der Anteil GD2-positiver NB-Zellen war bei der Zelllinie LAN-1 mit einem Anteil von 99,9 % am höchsten, darauf folgte die Zelllinie LS mit einem Anteil von 88,7 %. Die Zelllinie SHSY5Y wies einen Anteil von 6,8 % an GD2-positiven NB-Zellen auf.

Zusätzlich wurde die MFI-R für die drei NB-Zelllinien untersucht.



**Abbildung 6:** Overlay-Darstellung des Bindungsvermögens von GD2-Antikörpern bei den NB-Zelllinien im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle. Abkürzungen: MFI-R, Median Fluorescence Intensity-Ratio; NB-Zelllinien, Neuroblastom-Zelllinien.

Hier konnten Werte von 340,8 bei der Zelllinie LAN-1, 19,6 bei der Zelllinie LS und 1,7 bei der der Zelllinie SHSY5Y festgestellt werden (s. Abbildung 6).

## **3.2 Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen**

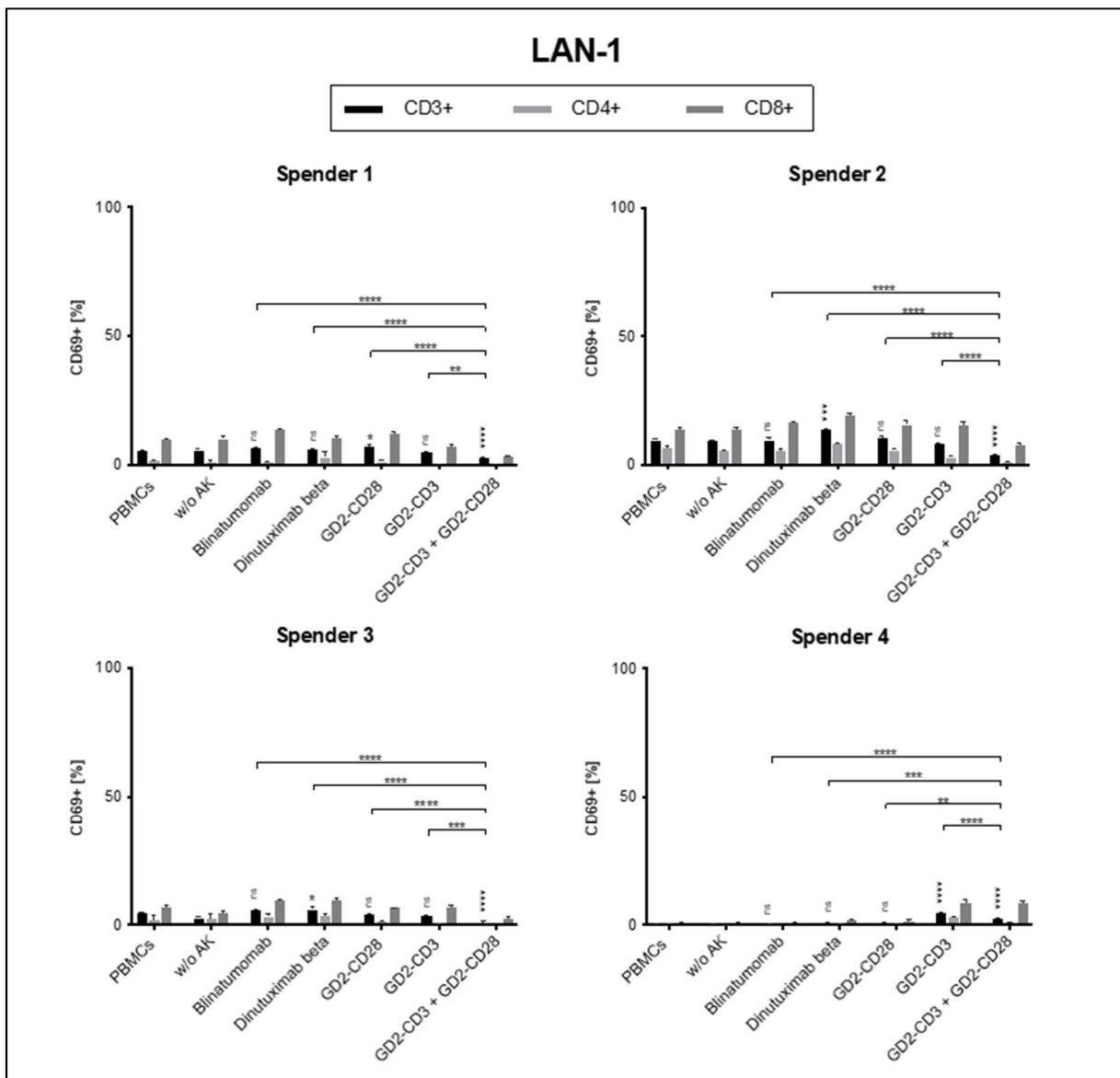
Nach Kontakt der Effektorzellen mit einem Antigen kommt es zunächst zur Aktivierung und anschließend zur Proliferation der Effektorzellen, um eine optimale Immunantwort zu gewährleisten. Diese Schritte sollten in den Aktivierungs- und Proliferationsassays nachvollzogen werden und die unterschiedliche Wirkung der Behandlungsbedingungen vergleichend gegenübergestellt werden. In den Versuchen wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 (s. Abschnitt 2.3) aufgeführten Konzentrationen der therapeutischen Antikörper verwendet.

### **3.2.1 Aktivierungsassays**

Die Aktivierungsraten wurden nach 48 h über die durchflusszytometrische Messung des Anteils der Aktivierungsmarker-positiven Effektorzellen (CD25+, CD69+, CD25+/CD69+) bestimmt. Die CD25+/CD69+ Zellen stellen dabei die vollständig aktivierten Zellen dar. Der optimale Zeitpunkt für die Messungen wurde in Vorversuchen (s. Abschnitt 3.4.3.1) ermittelt. Als Positivkontrolle diente der T-Zell-Aktivator PHA, welcher die Aktivierungsfähigkeit der Effektorzellen belegen konnte; die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.4.4 zu finden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalysen mit Tukey post-hoc Tests (\*,  $p \leq 0,05$ ).

#### **3.2.1.1 CD69+ Aktivierung**

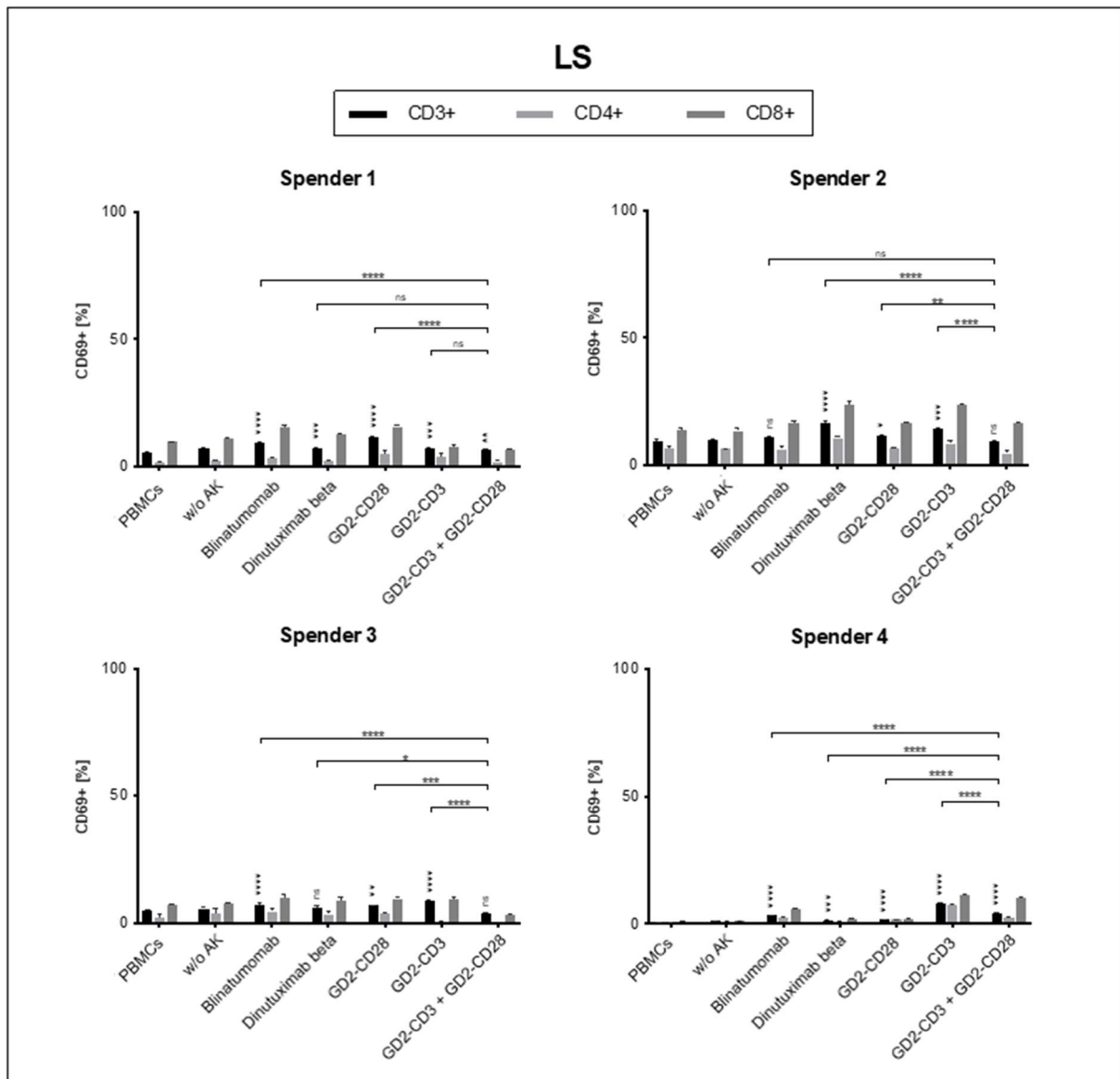
Bei der NB-Zelllinie LAN-1 ließen sich für CD3+/CD69+ Zellen die niedrigsten Aktivierungsraten unter der Kombinationsbehandlung feststellen. Wie in Abbildung 7 festgestellt werden kann, waren diese meist signifikant niedriger als unter den anderen Behandlungsbedingungen ( $p \leq 0,05$ ). Für GD2-CD3 und GD2-CD28 sowie die Kontrollen waren hingegen meist keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle feststellbar ( $p \leq 0,05$ ). Unter Dinutuximab beta konnten bei zwei Spender:innen erhöhte Aktivierungsraten beobachtet werden. Bei Spender:in 4 konnten die beschriebenen Effekte nicht nachgewiesen werden, hier kam es unter GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung zu einer verstärkten Aktivierung. Die CD8+ Zellen wiesen unter allen Bedingungen höhere Aktivierungsraten auf als die CD4+ Zellen.



**Abbildung 7:** CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Die beschriebenen Effekte ließen sich für die Zelllinie LS nicht replizieren und die Ergebnisse stellten sich weniger einheitlich dar (s. Abbildung 8). Unter der Kombinationsbehandlung konnten im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte oder nicht signifikant unterschiedliche CD3+/CD69+ Aktivierungsraten festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ). Verglichen mit GD2-CD3 und den anderen Behandlungsbedingungen waren diese meist erniedrigt. Unter den anderen Behandlungsbedingungen ließen sich zur

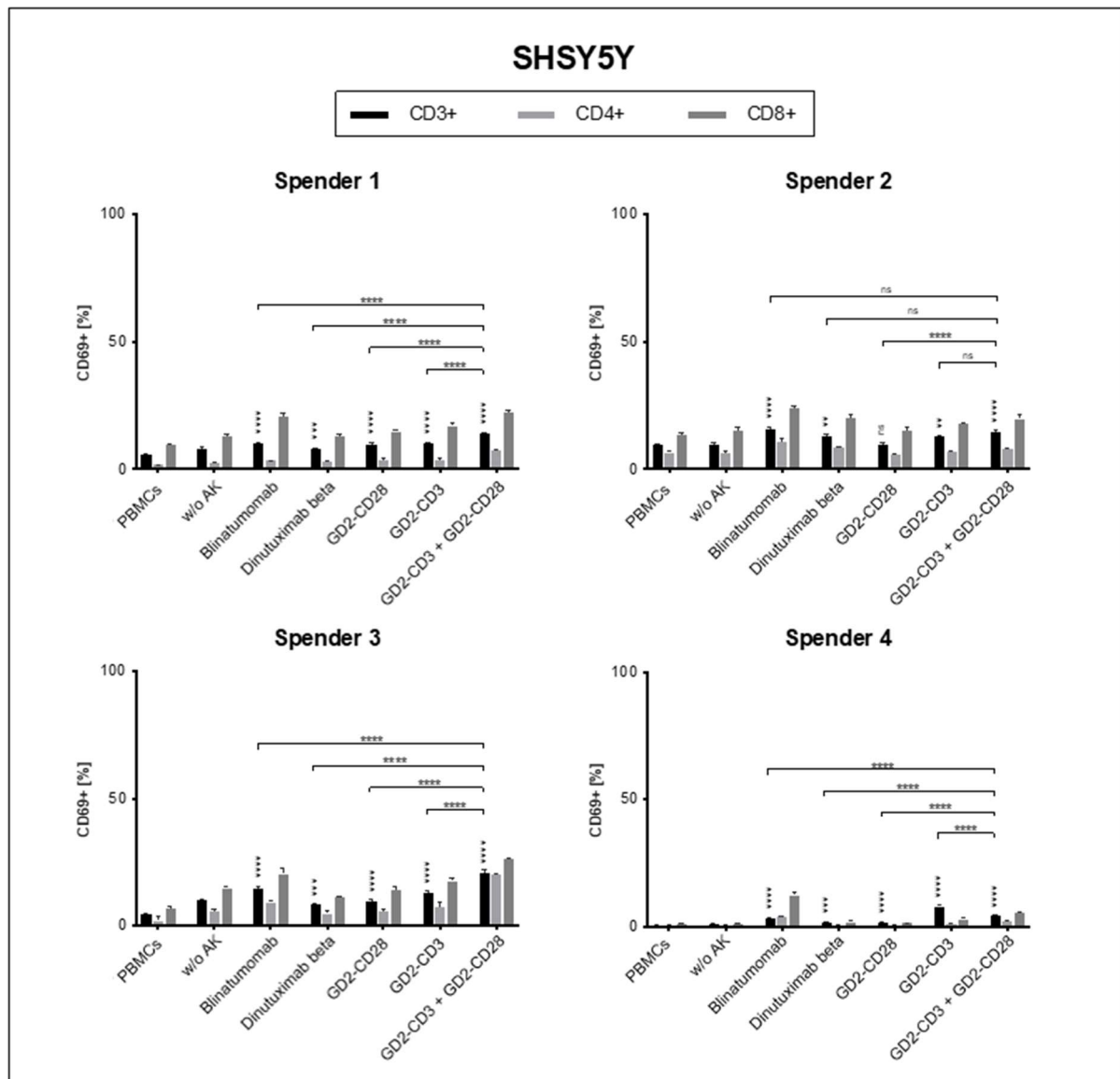
Negativkontrolle signifikant erhöhte Aktivierungsraten beobachten ( $p \leq 0,05$ ). Bei Spender:in 4 konnten erhöhte Aktivierungsraten unter GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung festgestellt werden. Die CD8+ Zellen wiesen unter allen Bedingungen höhere Aktivierungsraten als die CD4+ Zellen auf.



**Abbildung 8:** CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Bei der Zelllinie SHSY5Y zeigten sich unter fast allen Behandlungsbedingungen signifikant erhöhte CD3+/CD69+ Aktivierungsraten (s. Abbildung 9) ( $p \leq 0,05$ ). Unter

der Kombinationsbehandlung waren diese meist signifikant höher als unter den anderen Bedingungen ( $p \leq 0,05$ ). Dieser Effekt stellte sich bei Spender:in 4 am deutlichsten dar, während die Unterschiede bei Spender:in 2 meist nicht signifikant waren ( $p \leq 0,05$ ).

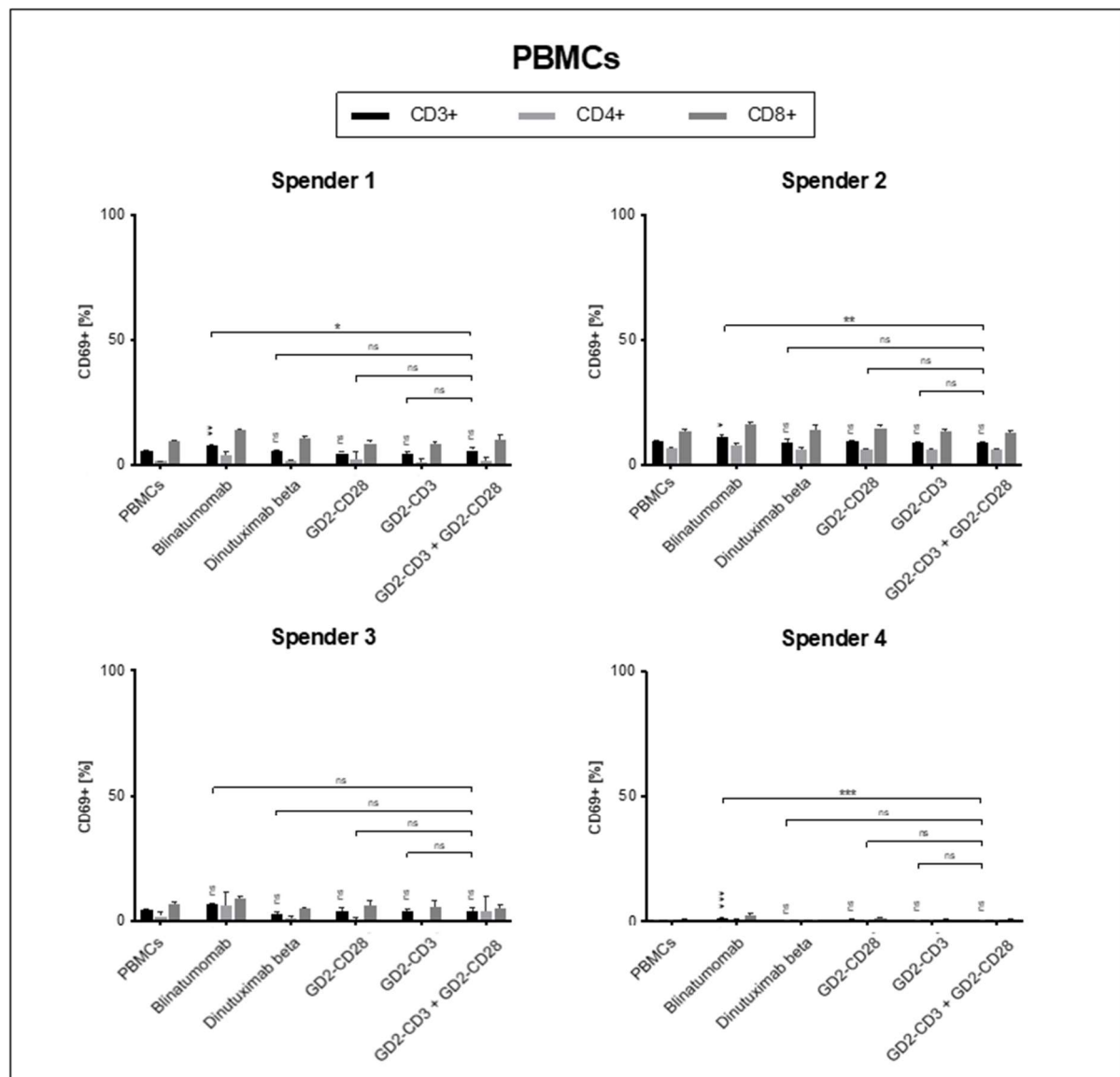


**Abbildung 9:** CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Bei den Effektorzellen der PBMCs ohne NB-Zellen konnten nur unter Blinatumomab signifikant erhöhte CD3+/CD69+ Aktivierungsraten beobachtet werden (s. Abbildung



10) ( $p \leq 0,05$ ). Alle anderen Behandlungsbedingungen wiesen keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle auf ( $p \leq 0,05$ ).

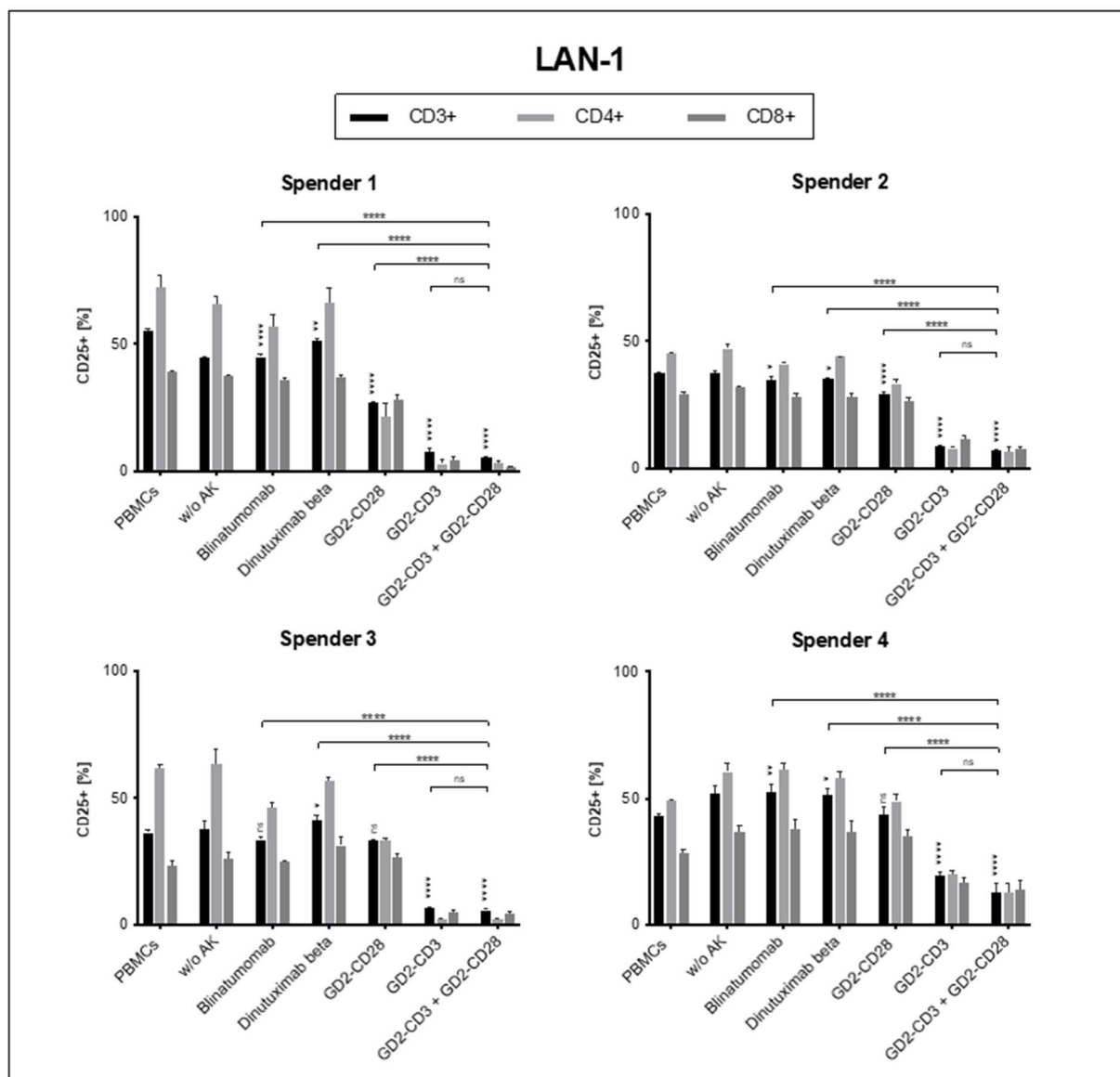


**Abbildung 10:** CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten Effektorzellen (PBMCs). Der Anteil CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: h, Stunden; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.

### 3.2.1.2 CD25+ Aktivierung

Für die NB-Zelllinie LAN-1 ließ sich bei allen Spender:innen unter GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung der geringste Anteil CD3+/CD25+ Effektorzellen nachweisen (s. Abbildung 11). Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab unter der

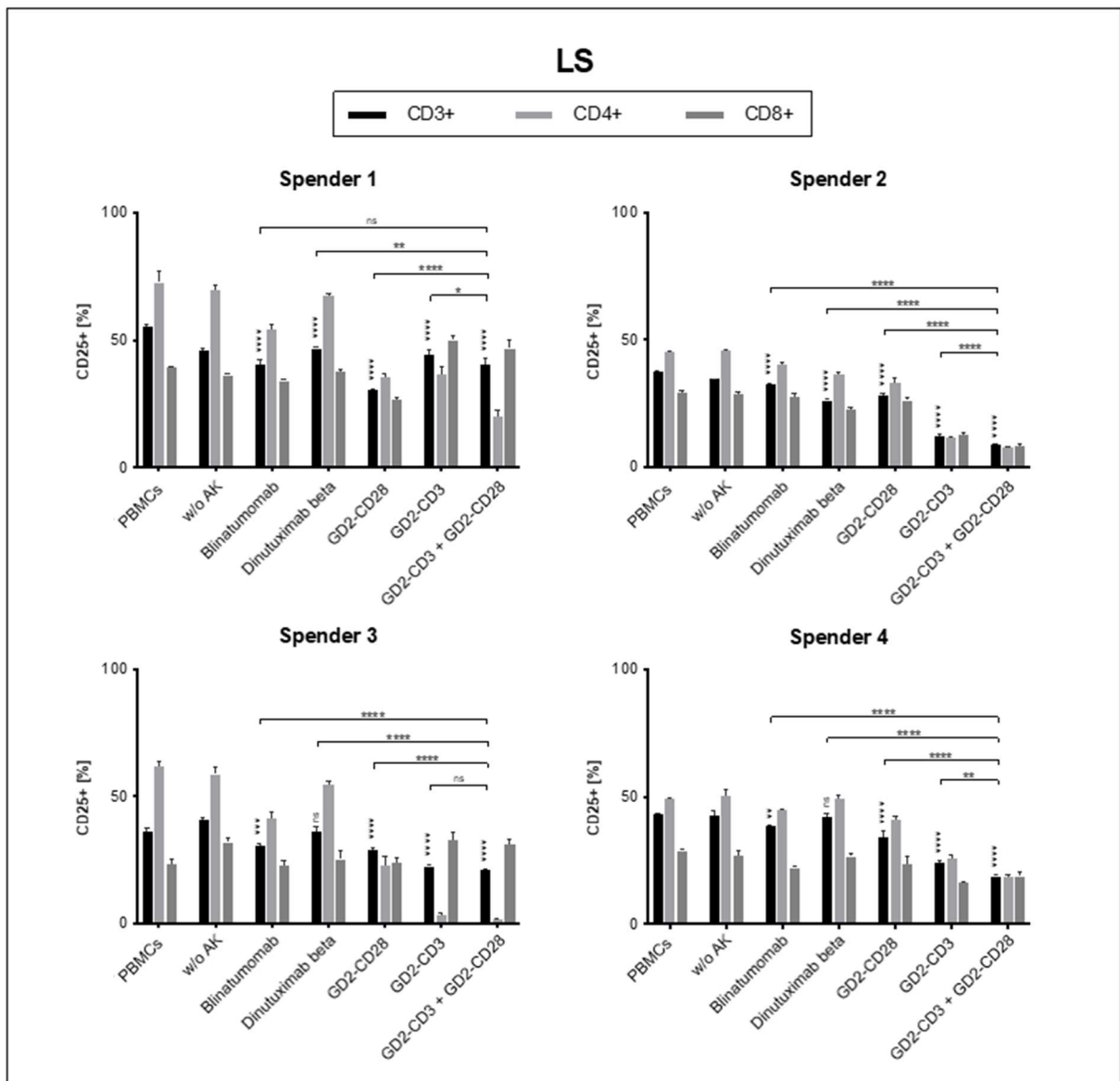
Kombinationsbehandlung signifikant niedrigere CD25+ Aktivierungsraten als unter den anderen Behandlungsbedingungen und der Negativkontrolle, ausgenommen GD2-CD3, hier ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ). Unter GD2-CD28, Dinutuximab beta und Blinatumomab stellten sich die Aktivierungsraten nicht stark erniedrigt dar. Während unter den GD2-Antikörpern meist höhere Anteile CD8+/CD25+ Zellen festgestellt werden konnten, war es unter den anderen Behandlungsbedingungen umgekehrt und die CD4+/CD25+ Zellen bildeten den größeren Anteil.



**Abbildung 11:** CD25+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests

dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

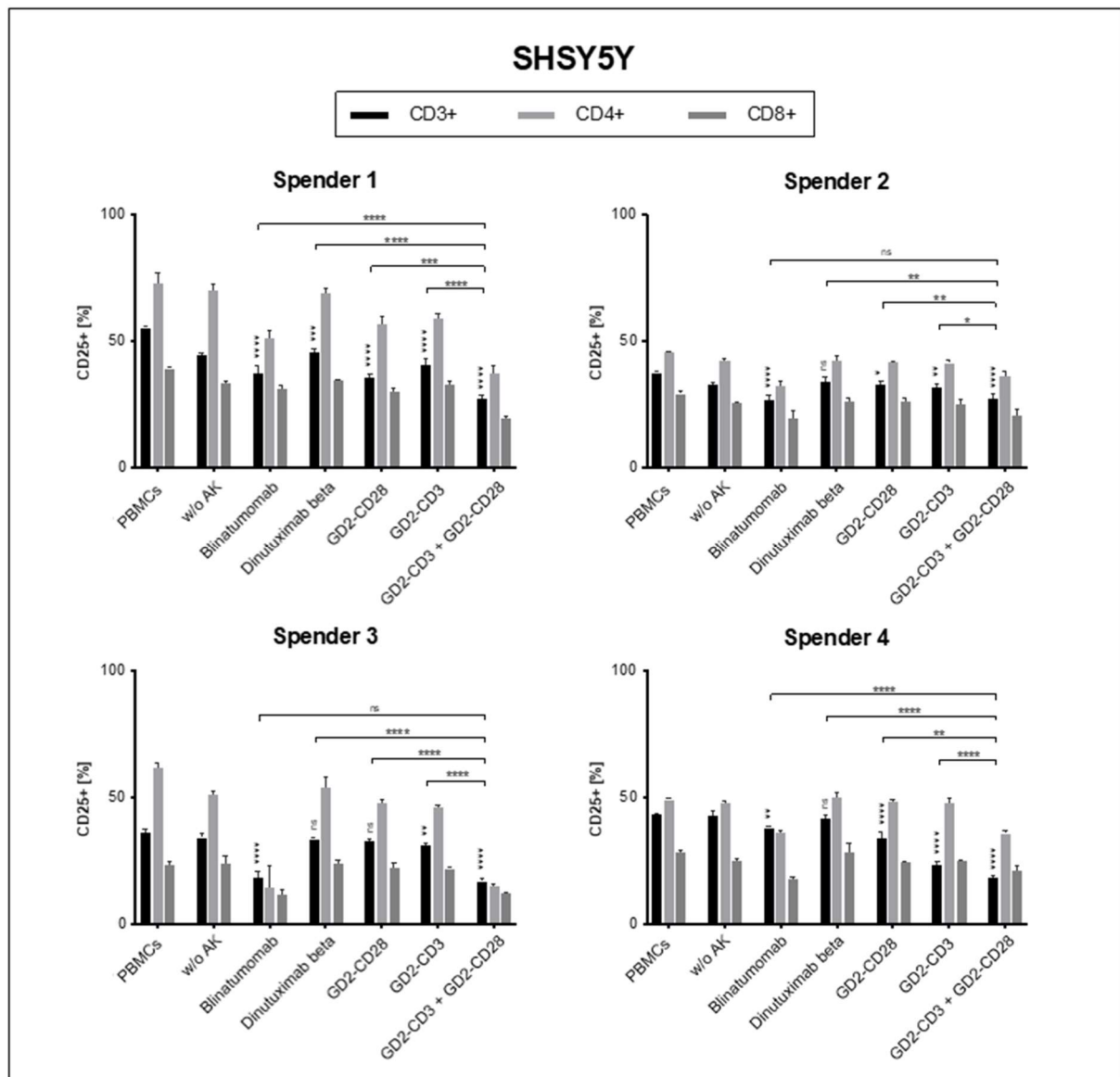
Die beschriebenen Effekte ließen sich bei der Zelllinie LS für die Spender:innen 2, 3 und 4 weitestgehend replizieren, sie waren bei LAN-1 weniger ausgeprägt (s. Abbildung 12). Unter der Kombinationsbehandlung konnten signifikant niedrigere CD3+/CD25+ Aktivierungsraten als unter den anderen Behandlungsbedingungen nachgewiesen werden ( $p \leq 0,05$ ). Außer bei Spender:in 1 waren die CD25+ Aktivierungsraten unter der Kombinationsbehandlung signifikant niedriger als unter GD2-CD3 allein ( $p \leq 0,05$ ). Bei Spender:in 1 ließ sich außerdem kein signifikanter Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung und Blinatumomab feststellen ( $p \leq 0,05$ ). Auch bei dieser Zelllinie konnten unter den GD2-Antikörpern meist höhere oder etwa gleich hohe CD8+ Aktivierungsraten als CD4+ Aktivierungsraten beobachtet werden. Unter den anderen Behandlungsbedingungen überwogen meist die Anteile der CD4+ Zellen.



**Abbildung 12:** CD25+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Unter der Kombinationsbehandlung zeigten sich bei der NB-Zelllinie SHSY5Y bei allen Spender:innen die niedrigsten CD3+/CD25+ Aktivierungsraten (s. Abbildung 13). Bei Spender:in 2 und 3 ergab sich kein signifikanter Unterschied zu Blinatumomab ( $p \leq 0,05$ ). Die Unterschiede waren weniger stark ausgeprägt als bei der Zelllinie LAN-1 und ähnlich wie bei der Zelllinie LS. Meist ließen sich unter den Antikörperbehandlungen signifikant niedrigere Aktivierungsraten als bei der

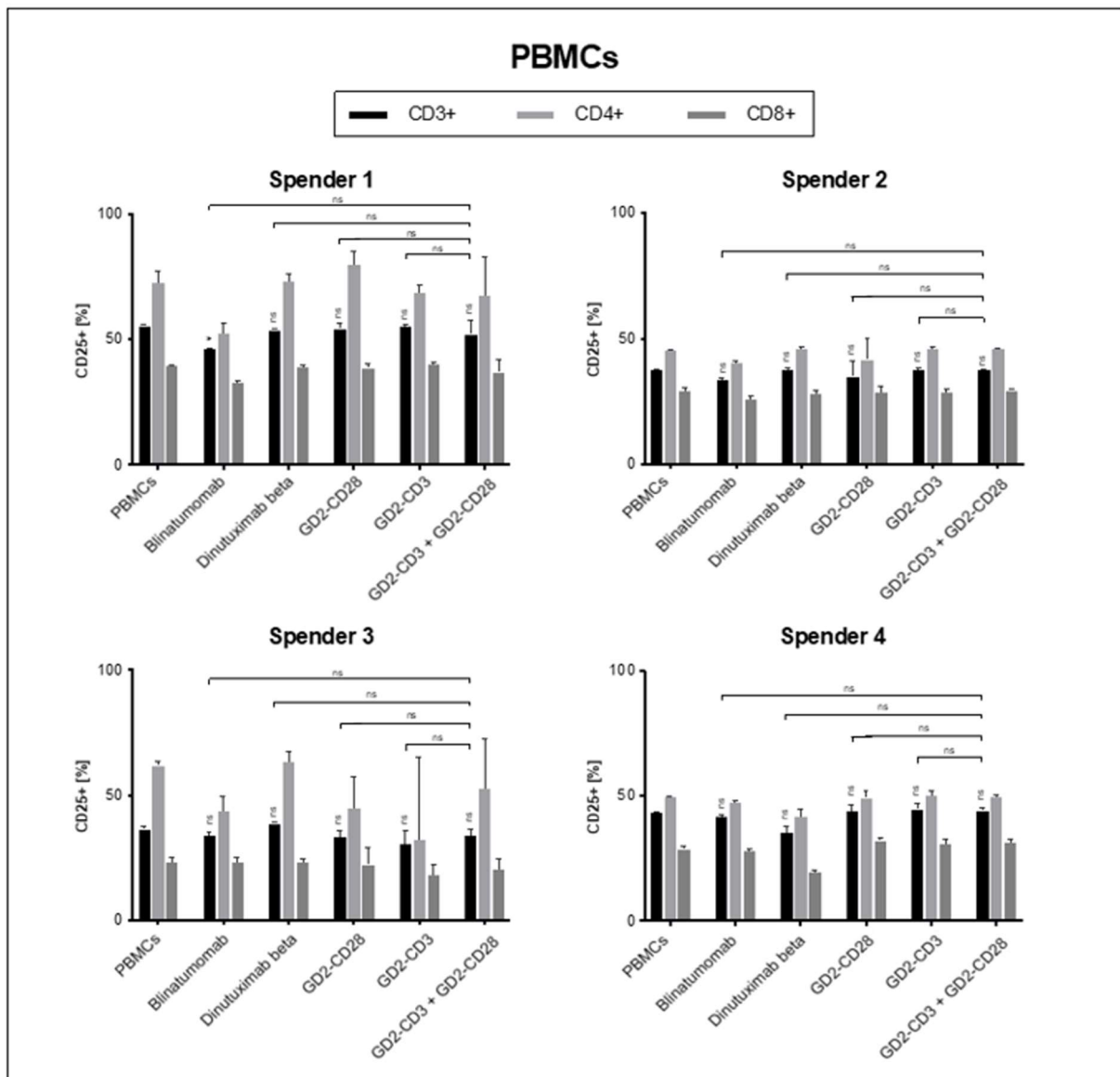
Negativkontrolle feststellen ( $p \leq 0,05$ ). Bei dieser Zelllinie konnten unter allen Behandlungsbedingungen höhere CD25+ Aktivierungsraten der CD4+ Zellen als bei den CD8+ Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 13:** CD25+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Bei den Effektorzellen der PBMCs ohne NB-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsbedingungen und der Negativkontrolle festgestellt werden (s. Abbildung 14) ( $p \leq 0,05$ ). Für die CD4+ Zellen waren höhere

CD25+ Aktivierungsraten als für die CD8+ Zellen nachweisbar, dieser Unterschied war weniger stark ausgeprägt als bei den NB-Zelllinien.

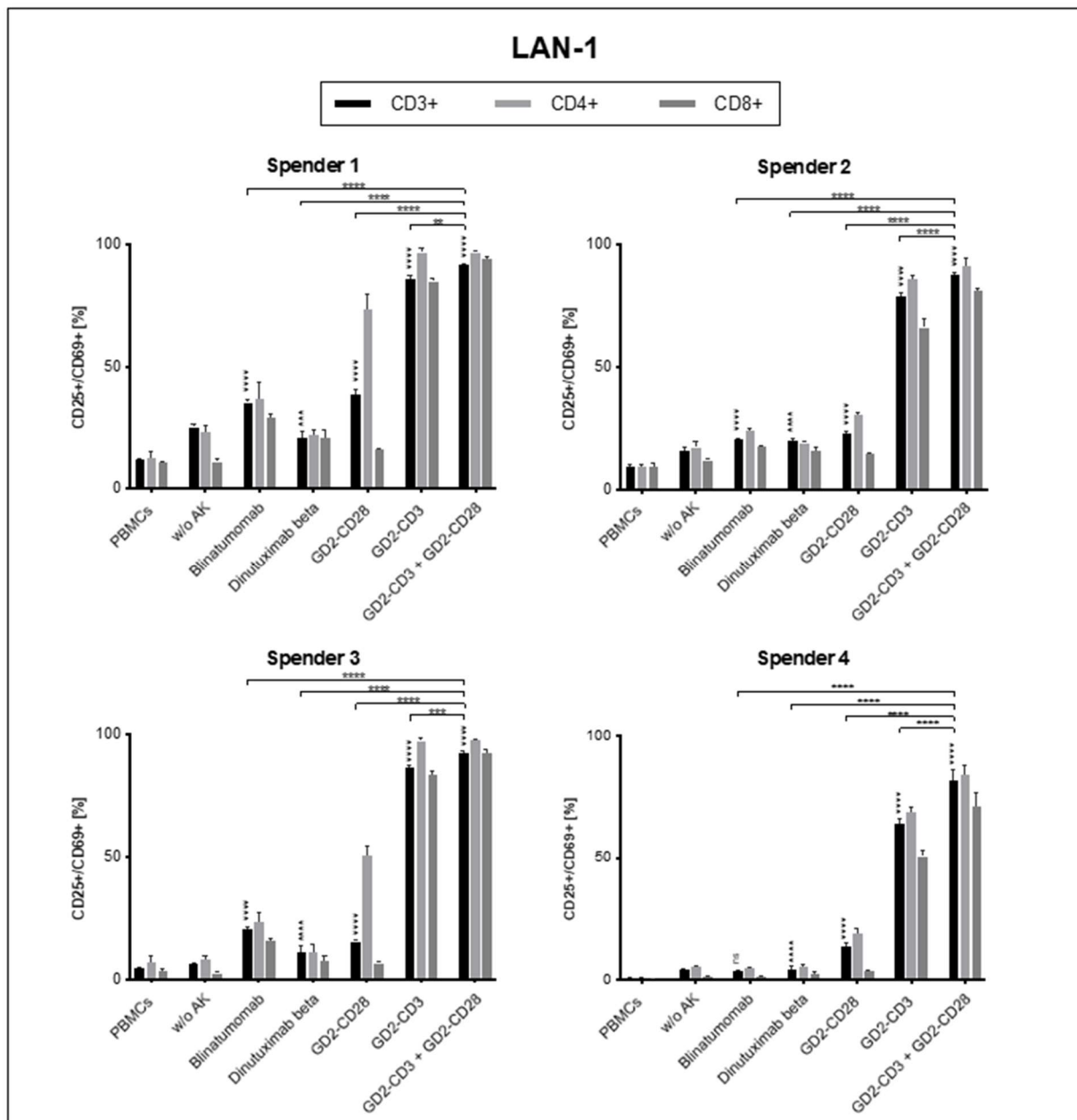


**Abbildung 14:** CD25+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten Effektorzellen (PBMCs). Der Anteil CD25+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: h, Stunden; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.

### 3.2.1.3 CD25+/CD69+ Aktivierung

Bei der NB-Zelllinie LAN-1 zeigten sich unter den Behandlungsbedingungen GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung die höchsten Anteile CD3+/CD25+/CD69+ Effektorzellen (s. Abbildung 15). Unter der Kombinationsbehandlung konnten dabei

signifikant höhere Aktivierungsraten als unter GD2-CD3 allein nachgewiesen werden ( $p \leq 0,01$ ). Unter den anderen Behandlungsbedingungen konnten im Vergleich zur Negativkontrolle nur leicht, aber signifikant erhöhte Aktivierungsraten festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). Unter Blinatumomab und GD2-CD28 waren diese meist höher als unter Dinutuximab beta. Es war eine stärkere Aktivierung der CD4+ Zellen als der CD8+ Zellen zu beobachten.

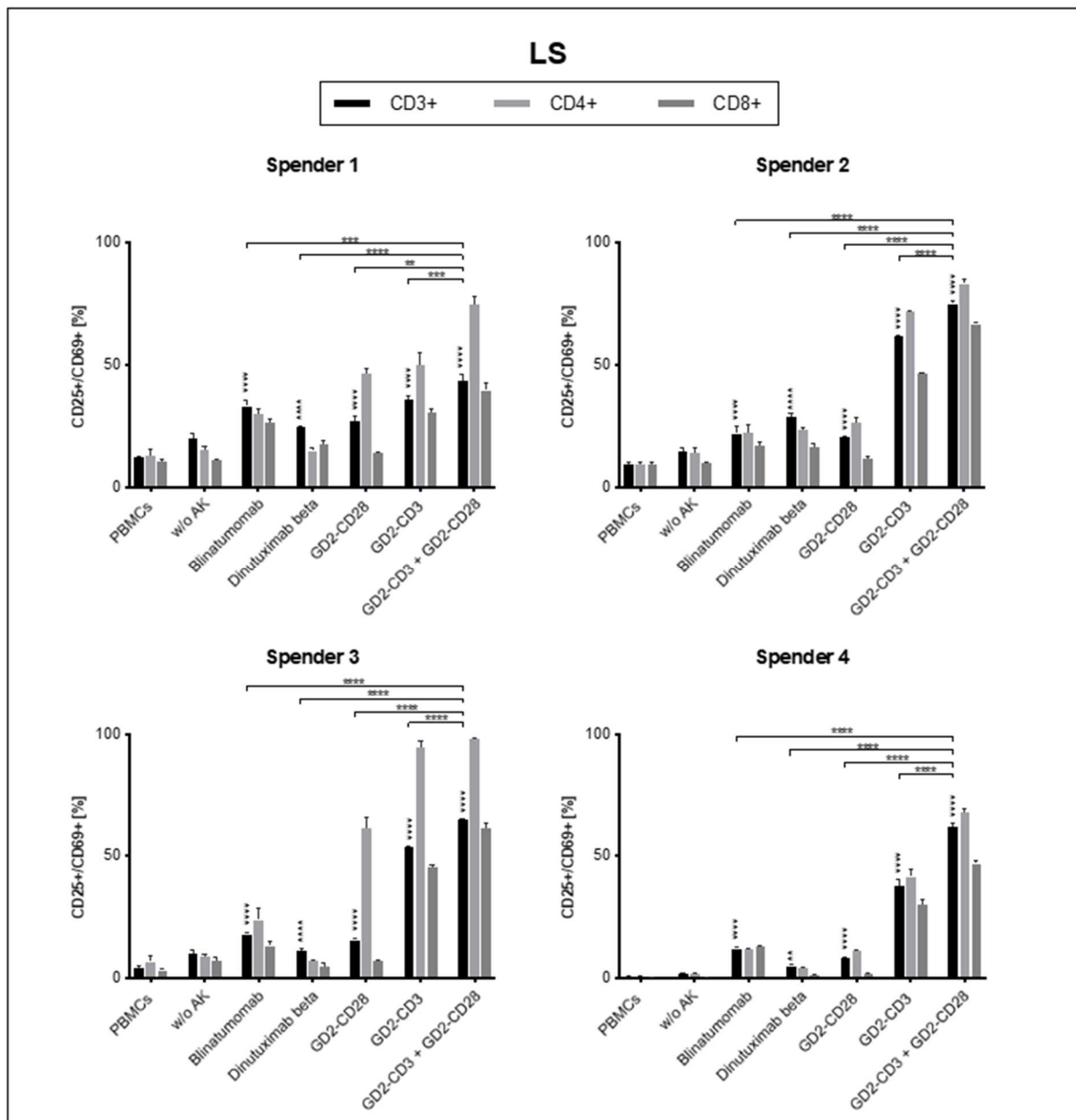


**Abbildung 15:** CD25+/CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+/CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an.

Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Für die Zelllinie LS waren die beschriebenen Effekte replizierbar (s. Abbildung 16). Die Aktivierungsraten unter der Behandlung mit GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung waren am höchsten. Für die Kombinationsbehandlung konnte eine signifikant stärkere Aktivierung nachgewiesen werden als für GD2-CD3 allein ( $p \leq 0,001$ ). Unter Blinatumomab und Dinutuximab beta konnten bei den Spender:innen 1, 3 und 4 die dritt- beziehungsweise vierthöchsten Aktivierungsraten beobachtet werden. Bei Spender:in 2 war eine etwas höhere Aktivierungsrate unter Dinutuximab beta feststellbar. Die Aktivierungsraten stellten sich unter allen Behandlungsbedingungen etwas niedriger dar als bei der Zelllinie LAN-1. Es war eine stärkere Aktivierung der CD4+ als der CD8+ Zellen nachweisbar.

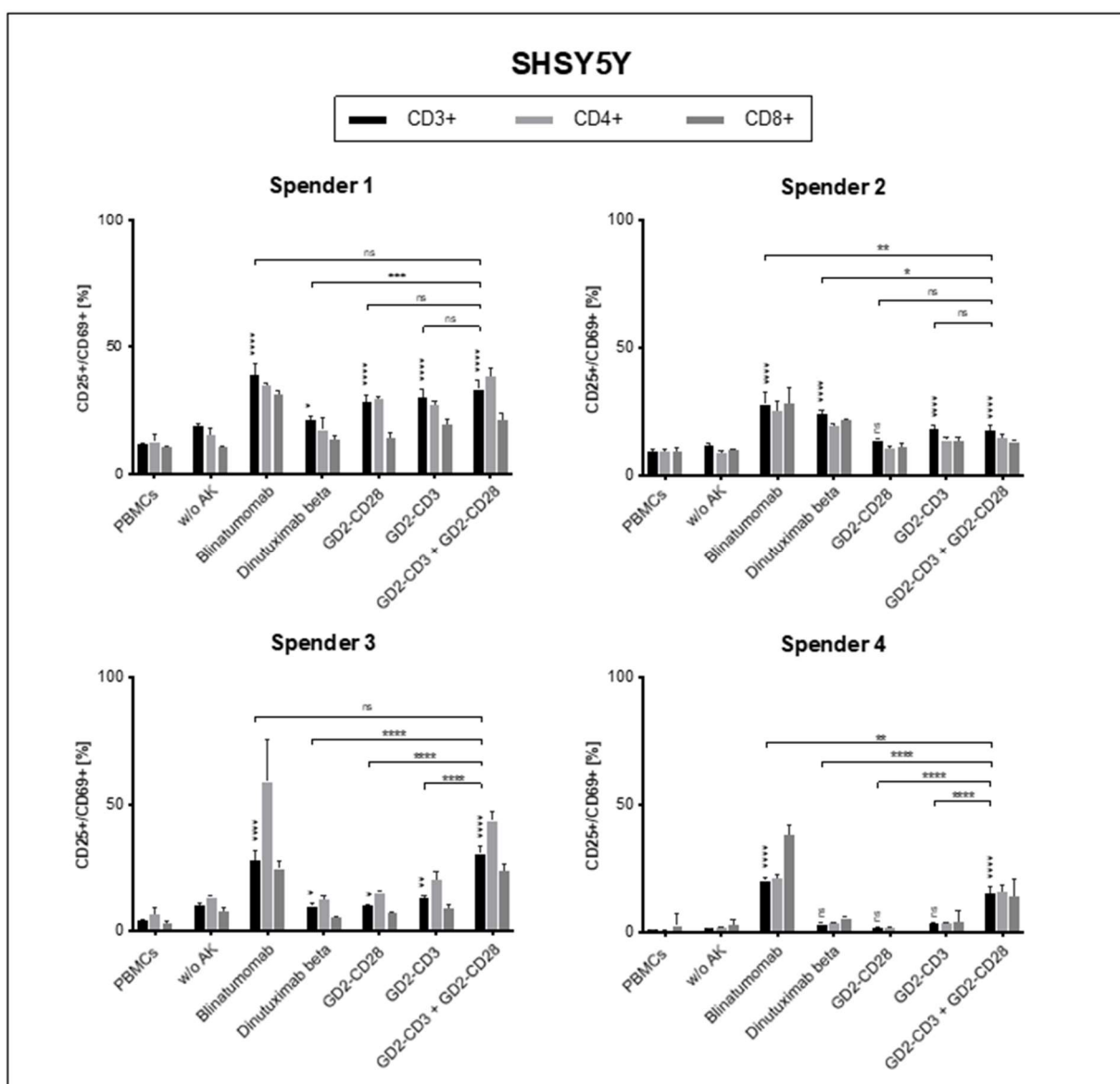




**Abbildung 16:** CD25+/CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+/CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*\*,  $p \leq 0,01$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Die Ergebnisse für die Zelllinie SHSY5Y waren weniger einheitlich als bei den anderen Zelllinien (s. Abbildung 17). Die höchsten Aktivierungsraten ließen sich unter der Behandlung mit Blinatumomab und der Kombinationsbehandlung feststellen. Bei Spender:in 1 und 3 waren die Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Spender:in 2 und 4 wiesen unter der Kombinationsbehandlung

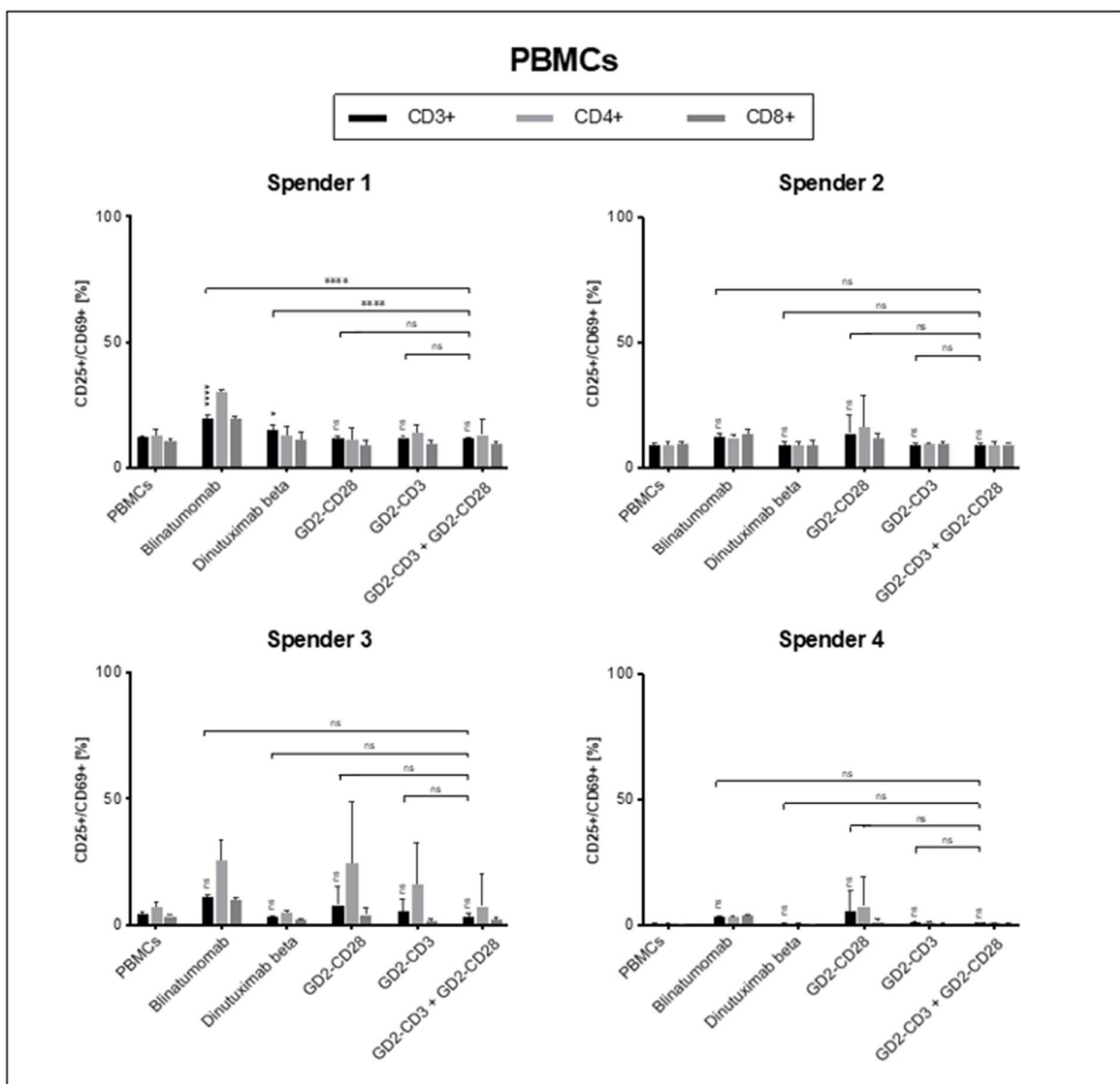
niedrigere Aktivierungsraten auf. Insgesamt waren die Aktivierungsraten unter der Kombinationsbehandlung bei SHSY5Y meist niedriger als bei den anderen Zelllinien. Unter GD2-CD3 war die Aktivierung in etwa gleich gering wie unter GD2-CD28 und schwächer als unter Blinatumomab. Für Dinutuximab beta waren signifikant erhöhte Aktivierungsraten im Vergleich zur Negativkontrolle feststellbar ( $p \leq 0,05$ ). Die Aktivierung war immer schwächer als unter Blinatumomab und bis auf Spender:in 2 schwächer als die Kombinationsbehandlung. Die Aktivierungsraten der Effektorzellen der Kontrolle aus PBMCs und SHSY5Y ohne Antikörper waren nicht signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ). Die CD4+ Zellen stellten sich meist stärker aktiviert als die CD8+ Zellen dar.



**Abbildung 17:** CD25+/CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil CD25+/CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist

die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Für die Effektorzellen der PBMCs ohne NB-Zellen konnten nur bei Spender:in 1 signifikant erhöhte Aktivierungsraten im Vergleich zur Negativkontrolle unter Blinatumomab und Dinutuximab beta festgestellt werden (s. Abbildung 18) ( $p \leq 0,05$ ). Bei den anderen Spender:innen und für die anderen Behandlungsbedingungen war kein signifikanter Effekt nachweisbar ( $p \leq 0,05$ ). Die Aktivierungsraten stellten sich geringer dar als in den Versuchsreihen mit PBMCs und NB-Zellen.



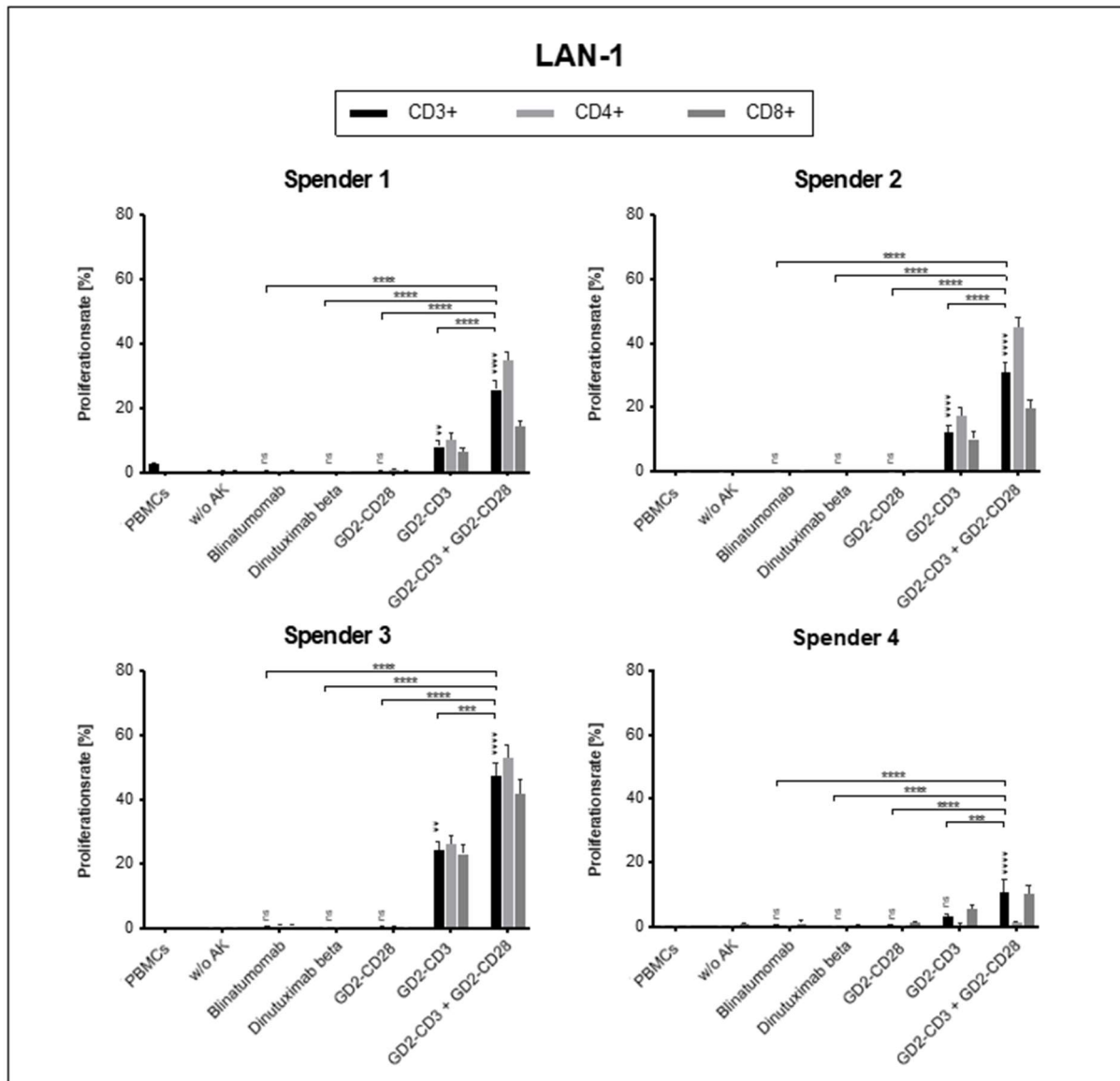
**Abbildung 18:** CD25+/CD69+ Aktivierung der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Der Anteil CD25+/CD69+ Effektorzellen wurde 48 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die

CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle (PBMCs) an. Abkürzungen: h, Stunden; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.

### 3.2.2 Proliferationsassays

Die Untersuchung der Proliferation der Effektorzellen erfolgte bei einem E/T-Ratio von 1:1 und den in Tabelle 4 (s. Abschnitt 2.3) angegebenen Antikörperkonzentrationen. Die Proliferationsraten wurde nach 96 h über die durchflusszytometrische Messung des Anteils der mindestens einmal geteilten Effektorzellen ( $> 1$ . Generation) ermittelt. Der optimale Zeitpunkt für die Messungen wurde in Vorversuchen (s. Abschnitt 3.4.3.2) identifiziert. Als Positivkontrolle diente der T-Zell-Aktivator PHA, welcher die Proliferationsfähigkeit der Effektorzellen belegen konnte; die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.4.4 zu finden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalysen mit Tukey post-hoc Tests (\*,  $p \leq 0,05$ ).

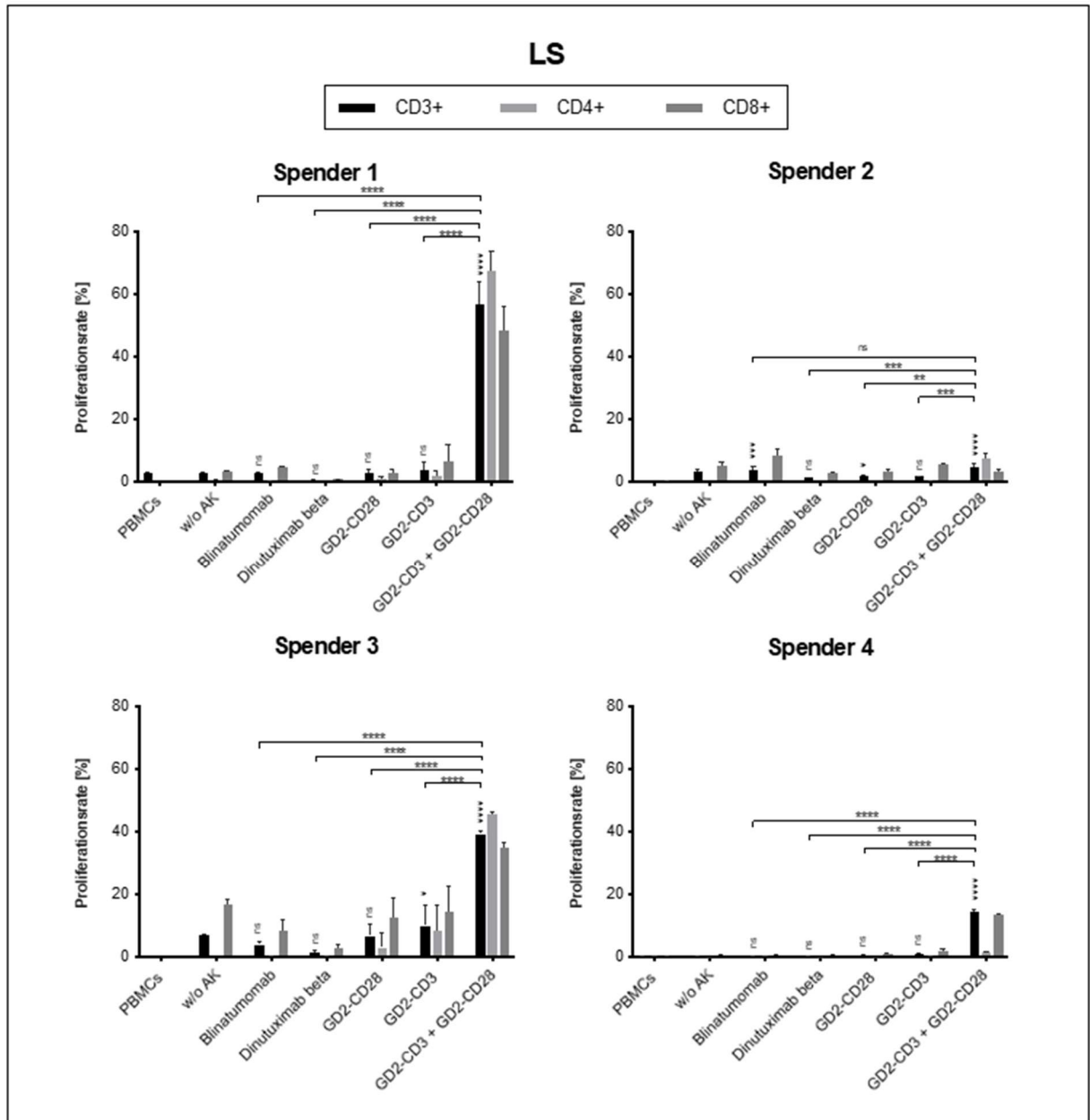
Bei der NB-Zelllinie LAN-1 konnten unter der Kombinationsbehandlung die höchsten Proliferationsraten der CD3+ Effektorzellen festgestellt werden (s. Abbildung 19). Diese waren signifikant höher als unter der alleinigen Behandlung mit GD2-CD3, welche die zweithöchsten Proliferationsraten aufwies ( $p \leq 0,001$ ). Unter GD2-CD28, Dinutuximab beta, Blinatumomab sowie der unbehandelten Kontrolle kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Proliferationsraten im Vergleich zur Negativkontrolle ( $p \leq 0,05$ ). Außer bei Spender:in 4 konnte jeweils eine stärkere Proliferation der CD4+ Zellen als der CD8+ Zellen beobachtet werden. Bei Spender:in 4 stellten sich die Proliferationsraten insgesamt niedriger als bei den anderen Spender:innen dar.



**Abbildung 19:** Proliferationsraten der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil der proliferierten Effektorzellen (> 1. Generation) wurde 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

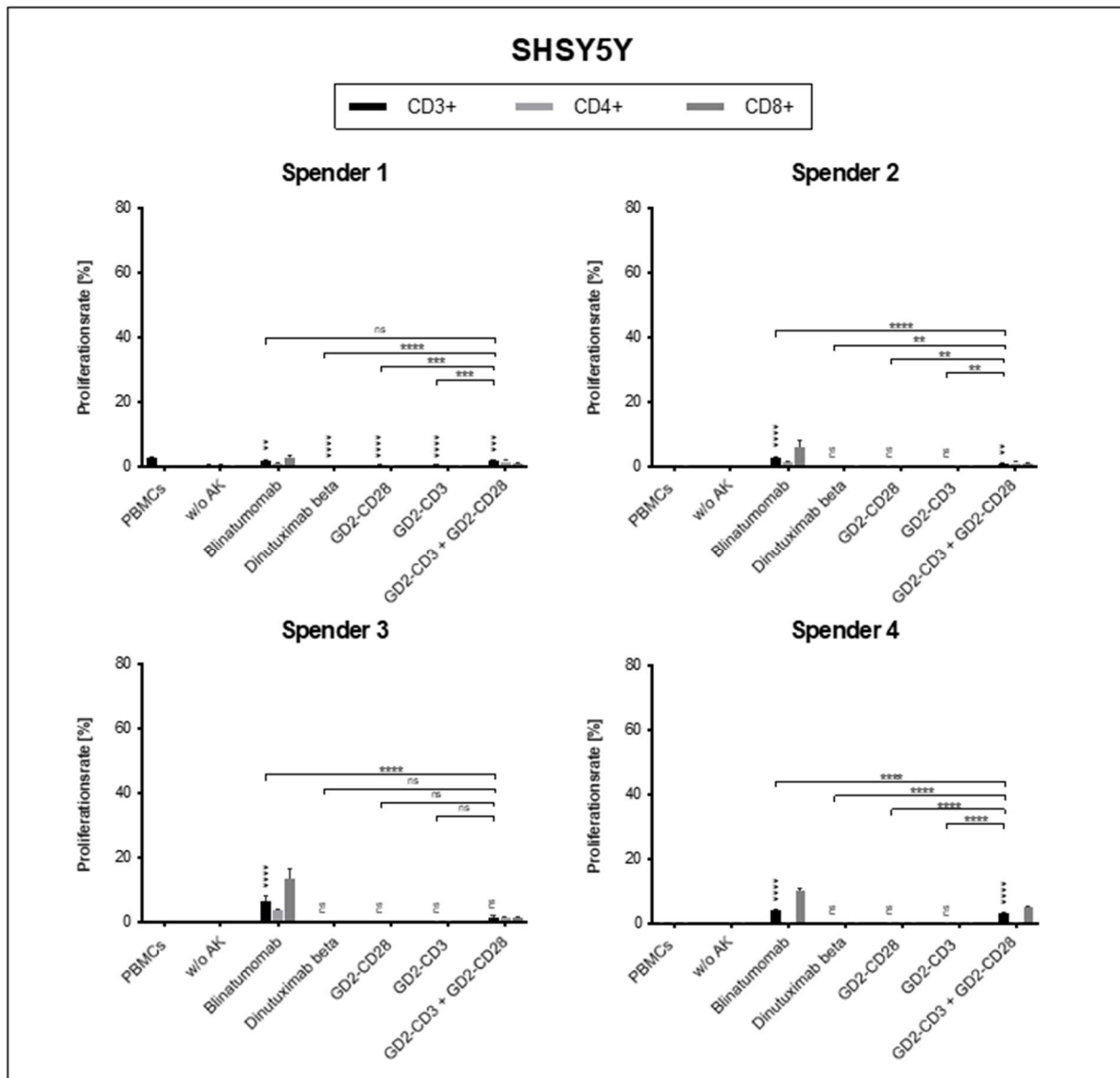
Die Ergebnisse der Zelllinie LAN-1 ließen sich für die Zelllinie LS replizieren (s. Abbildung 20). Unter der Kombinationsbehandlung konnten die signifikant höchsten Proliferationsraten festgestellt werden ( $p \leq 0,0001$ ). Unter Dinutuximab beta und den anderen Behandlungsbedingungen sowie der unbehandelten Kontrolle waren meist keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle nachweisbar ( $p \leq 0,05$ ). Spender:in 4 bildete die einzige Ausnahme von einer verstärkten Proliferation der

CD4+ Zellen als der CD8+ Zellen. Bei Spender:innen 2 und 4 konnten generell niedrigere Proliferationsraten beobachtet werden. Außerdem waren bei Spender:in 2 signifikant erhöhte Proliferationsraten unter Blinatumomab und GD2-CD28 feststellbar ( $p \leq 0,05$ ).



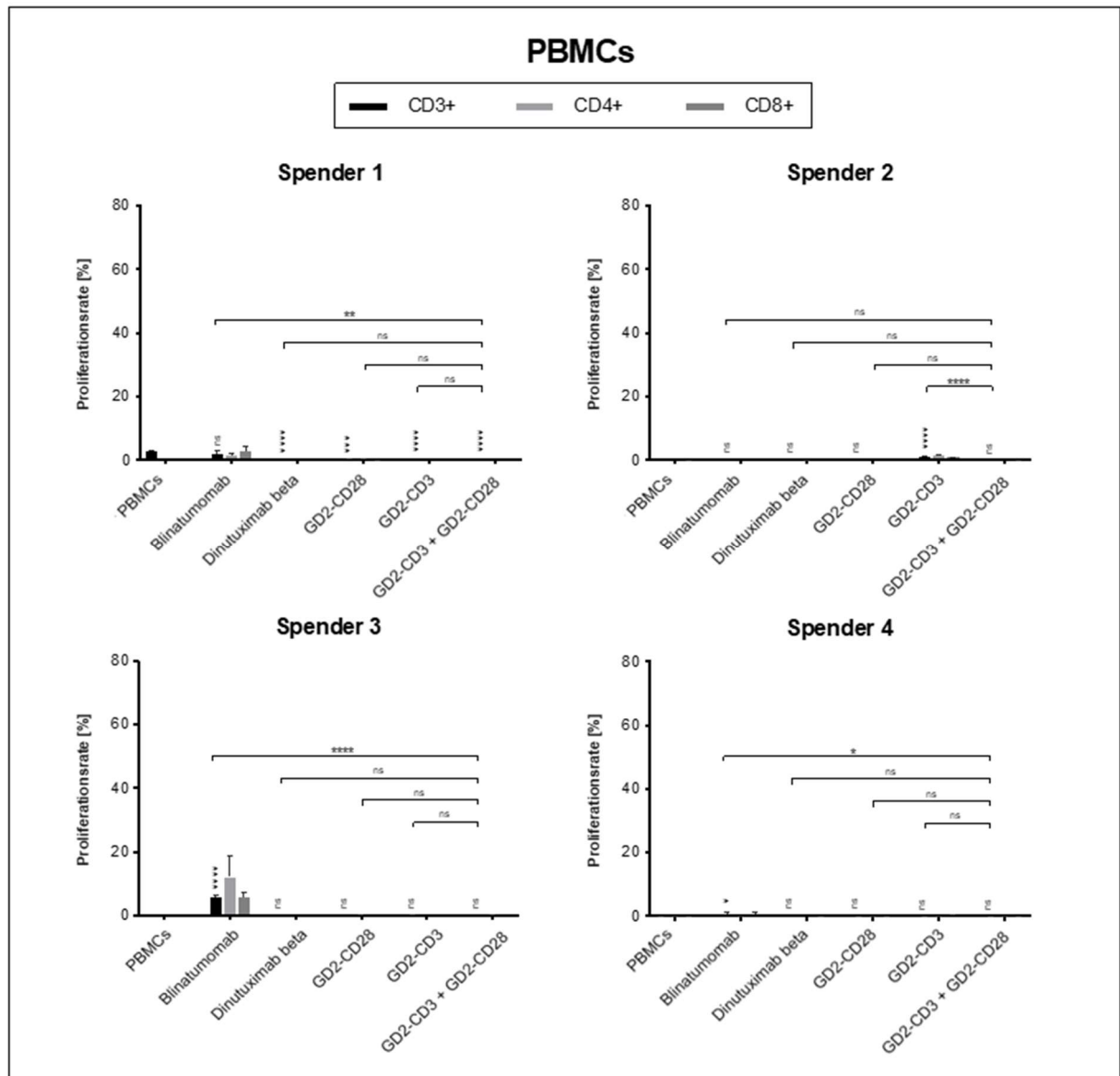
**Abbildung 20:** Proliferationsraten der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil der proliferierten Effektorzellen (> 1. Generation) wurde 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Für die NB-Zelllinie SHSY5Y zeigten sich unter Blinatumomab die höchsten Proliferationsraten (s. Abbildung 21). Diese waren meist signifikant höher als unter der Kombinationsbehandlung ( $p \leq 0,0001$ ). Die Kombinationsbehandlung wies im Vergleich zur Negativkontrolle meist signifikant erhöhte Proliferationsraten auf ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 21:** Proliferationsraten der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen in Kombination mit der NB-Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle (PBMCs) bestand aus unbehandelten Effektorzellen ohne NB-Zellen. Der Anteil der proliferierten Effektorzellen (> 1. Generation) wurde 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Bei den PBMCs ohne NB-Zellen konnten unter den Behandlungsbedingungen meist nicht oder nur geringfügig erhöhte Proliferationsraten festgestellt werden (s. Abbildung 22). Bei zwei Spender:innen waren unter Blinatumomab signifikant erhöhte Proliferationsraten nachweisbar ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 22:** Proliferationsraten der CD3+, CD4+ und CD8+ Effektorzellen von 4 Spender:innen unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten Effektorzellen. Der Anteil der proliferierten Effektorzellen ( $> 1$ . Generation) wurde 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikats von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung bezogen auf die CD3+ Zellen mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Balken geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen.



### **3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivierungs- und Proliferationsassays**

Um Aussagen über die Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen zu treffen, wurde der Anteil der Aktivierungsmarker-positiven Zellen nach 48 h und der Anteil der Effektorzellen ab der 2. Generation nach 96 h durchflusszytometrisch ermittelt.

Die Kombinationsbehandlung zeigte in den Versuchen die stärksten Effekte auf die CD25+/CD69+ Aktivierung und Proliferation. Bei den stark GD2-positiven Zelllinien LAN-1 und LS konnten unter der Behandlung die höchsten CD25+/CD69+ Aktivierungsraten und im Verlauf Proliferationsraten festgestellt werden. Diese waren signifikant höher als unter der Behandlung mit GD2-CD3, unter welcher es ebenfalls zu erhöhten CD25+/CD69+ Aktivierungs- und Proliferationsraten kam ( $p \leq 0,05$ ). Unter der alleinigen Behandlung mit GD2-CD28 konnten meist nur leicht gesteigerte CD25+/CD69+ Aktivierungs- und nur selten gesteigerte Proliferationsraten festgestellt werden. Für Blinatumomab und Dinutuximab beta konnten nur leicht gesteigerte CD25+/CD69+ Aktivierungsraten und kaum Proliferationsaktivität beobachtet werden. Bei der schwach GD2-positiven Zelllinie SHSY5Y ließen sich die beschriebenen Effekte teilweise beobachten. Sie waren weniger ausgeprägt und die Ergebnisse insgesamt weniger einheitlich.

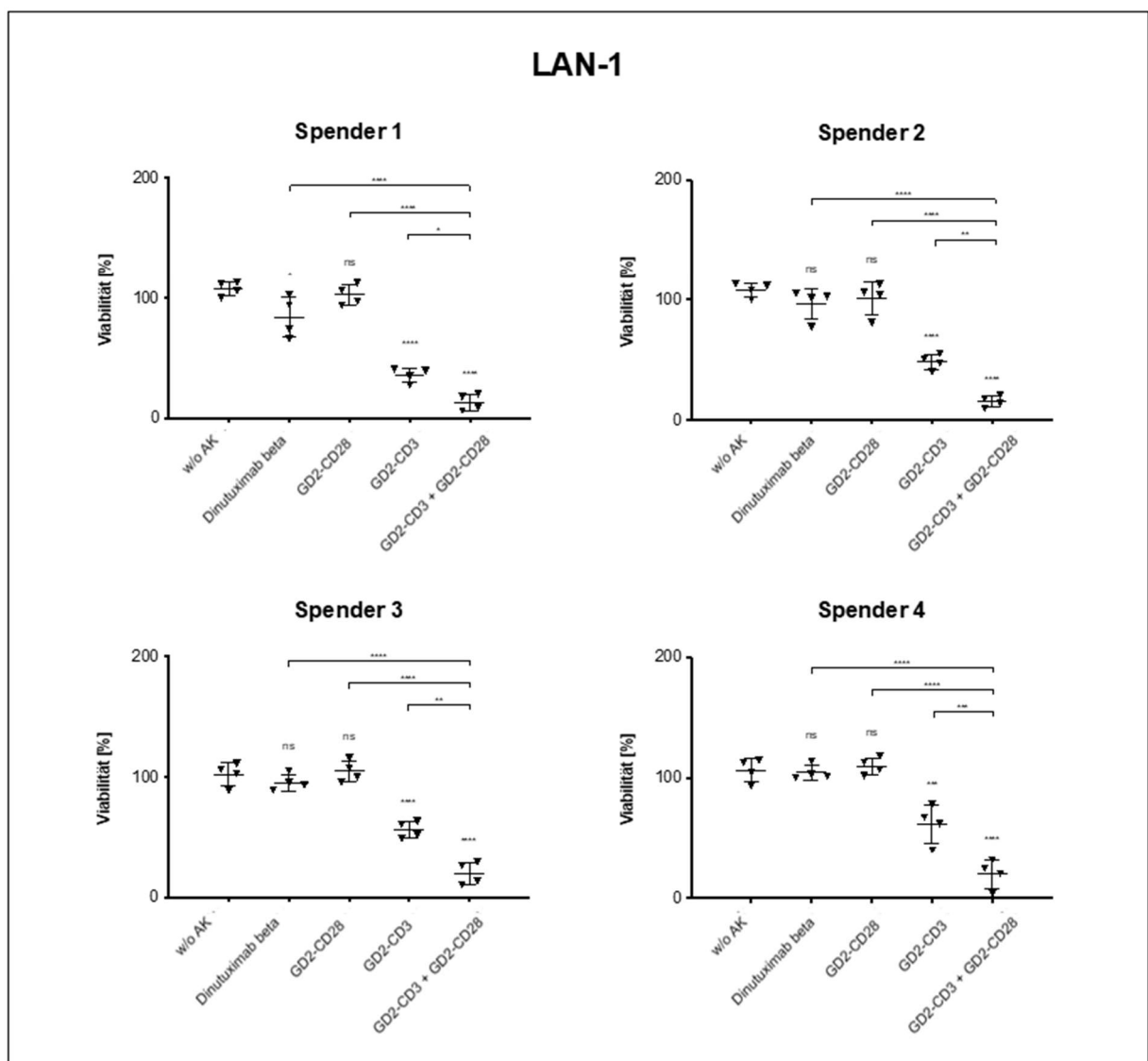
Für die einzelnen Aktivierungsmarker ergaben sich hohe CD25+ Aktivierungsraten und vergleichsweise sehr niedrige Aktivierungsraten für CD69. Unter der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 konnten jeweils erniedrigte CD25+ Aktivierungsraten und bei zwei Zelllinien erhöhte CD69+ Aktivierungsraten festgestellt werden. Die Aktivierungsraten unter GD2-CD28, Dinutuximab beta und Blinatumomab stellten sich im Vergleich zur Negativkontrolle meist wenig verändert dar. Für CD69 ergab sich insgesamt ein eher uneinheitliches Bild.

### **3.3 Lyse der Neuroblastom-Zelllinien**

In Lyse-Assays erfolgte die Bestimmung der Lyse der NB-Zellen durch die Effektorzellen unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen mittels luminometrischer Messung des Luciferin-Umsatzes der NB-Zellen. Die Viabilität der NB-Zellen ergab sich aus der prozentualen Differenz der Messungen der Ansätze mit den verschiedenen Behandlungsbedingungen im Vergleich zu den Ansätzen, die nur

aus NB-Zellen bestanden. Die Untersuchungen wurden mit einem E/T-Ratio von 1:1 und den niedrigen Antikörperkonzentrationen (s. Tabelle 3, Abschnitt 2.3) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalysen mit Tukey post-hoc Tests (\*,  $p \leq 0,05$ ).

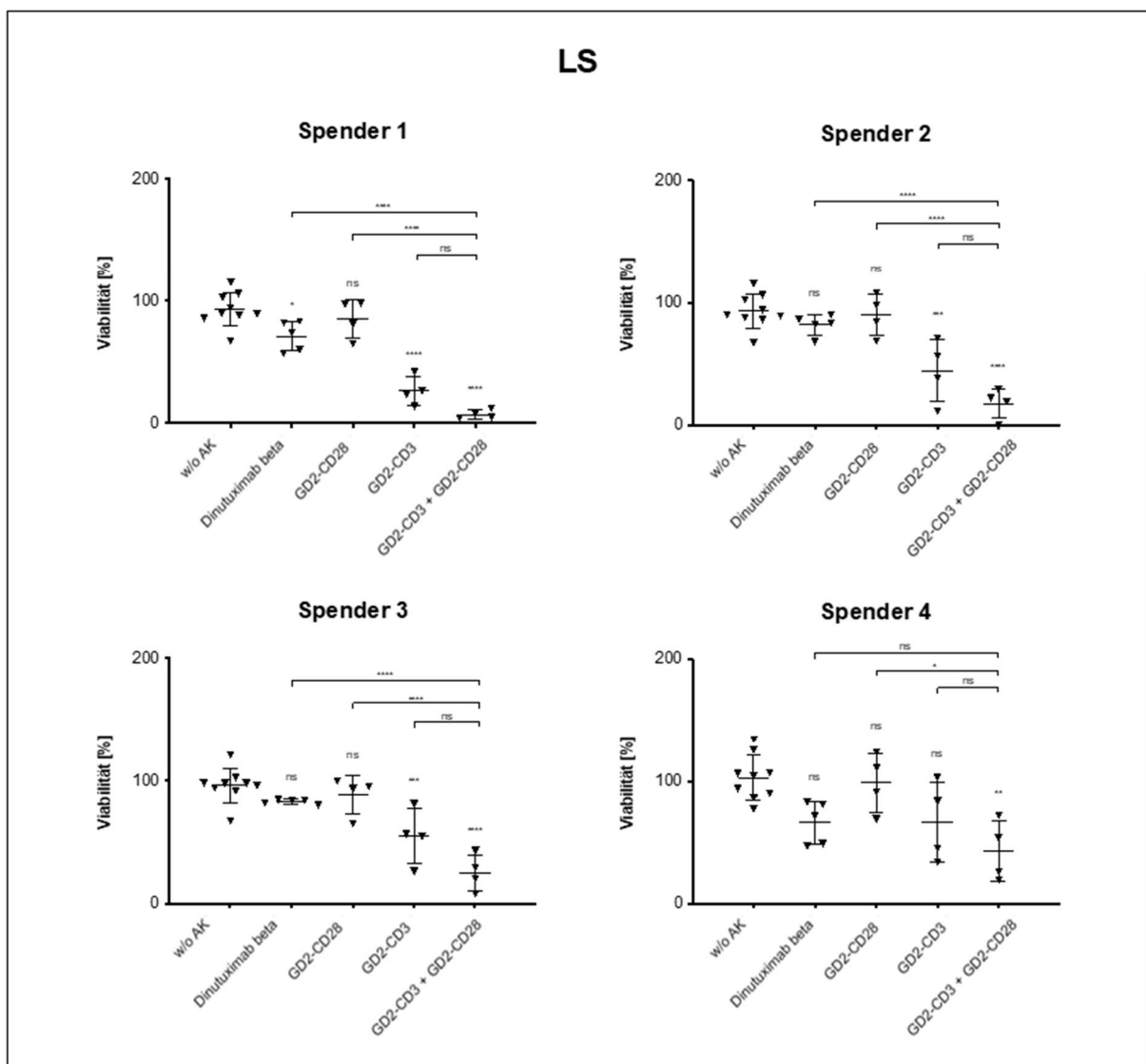
Unter der Kombinationsbehandlung konnten bei der Zelllinie LAN-1 die signifikant niedrigsten Viabilitäten der NB-Zellen festgestellt werden (s. Abbildung 23) ( $p \leq 0,0001$ ). Die Lyse war hier signifikant stärker als unter der alleinigen Behandlung mit GD2-CD3, unter welcher die zweitniedrigsten Viabilitäten beobachtet werden konnten ( $p \leq 0,05$ ). Bei GD2-CD28 und Dinutuximab beta waren meist keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle nachweisbar ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 23:** Lyse der Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der

Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Plots geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

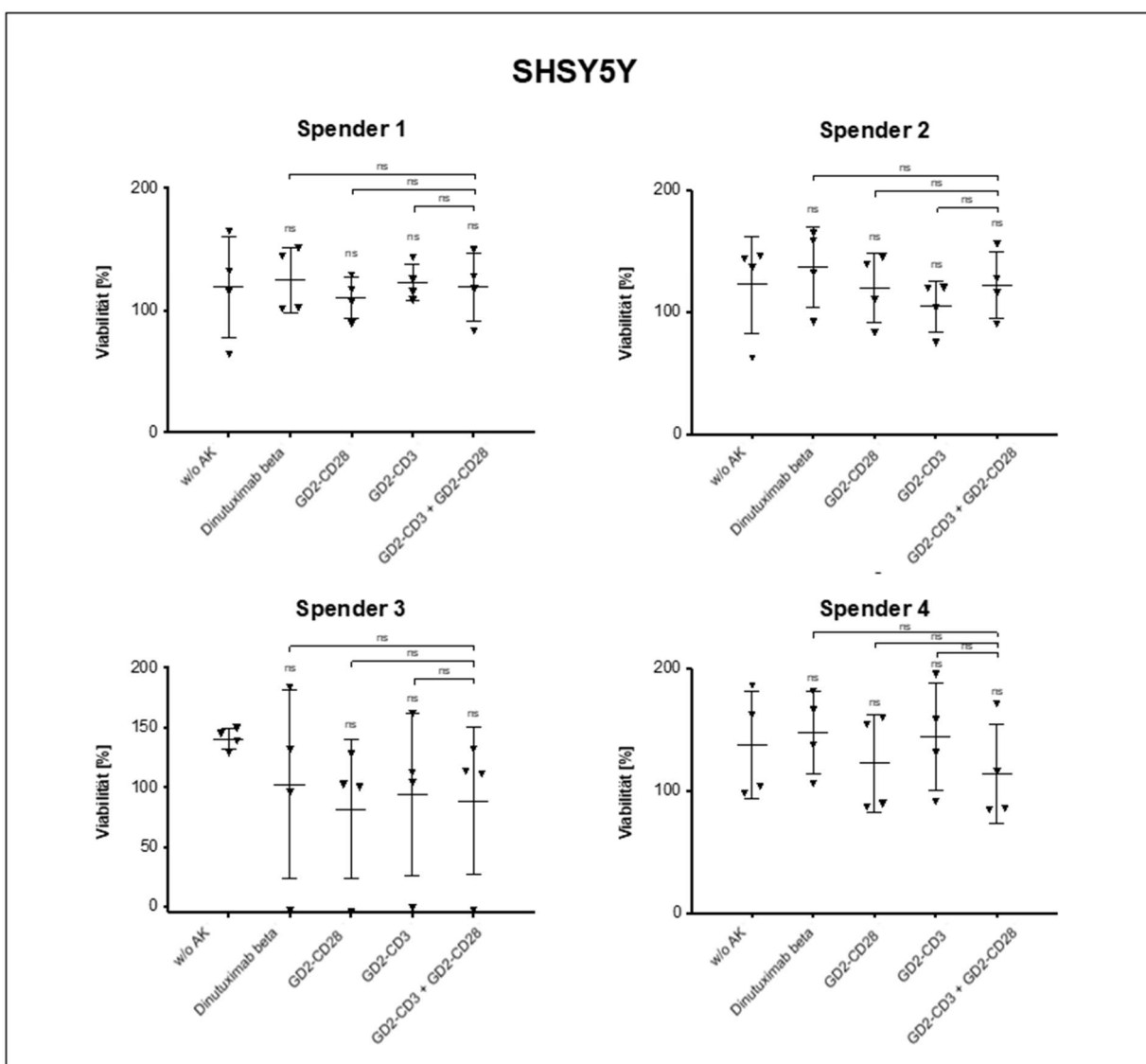
Die Ergebnisse der Zelllinie LAN-1 ließen sich für die Zelllinie LS weitestgehend replizieren (s. Abbildung 24). Unter der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 konnte hier die stärkste Lyse nachgewiesen werden. Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 ( $p \leq 0,05$ ). Unter GD2-CD28 und Dinutuximab beta konnte im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikant verstärkte Lyse festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 24:** Lyse der Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4-9 unabhängigen Experimenten ( $N = 4 - 9$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und

den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Plots geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Für die Zelllinie SHSY5Y konnte unter keiner der Behandlungsbedingungen ein Effekt festgestellt werden, es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle (s. Abbildung 25) ( $p \leq 0,05$ ). Im Vergleich zu den anderen Zelllinien war unter allen Bedingungen oft eine erhöhte Viabilität ( $> 100\%$ ) nachweisbar. Außerdem waren eine größere Streuung der Werte und höhere Standardabweichungen als bei den anderen Zelllinien feststellbar.



**Abbildung 25:** Lyse der Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzen oberhalb der Plots

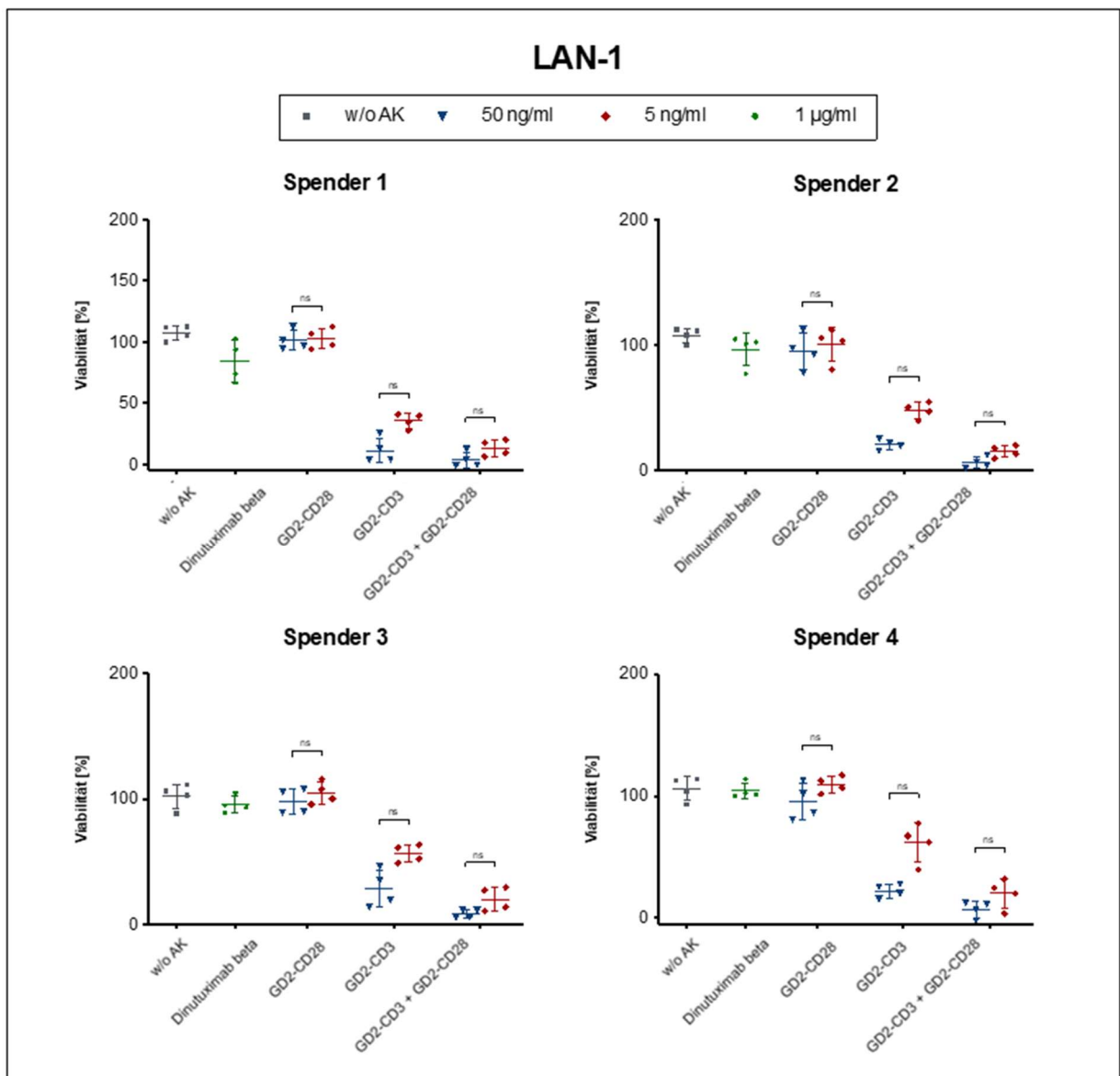
geben die Unterschiede zur Negativkontrolle an. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

### **3.4 Etablierung der Konditionen für die Zellkultur-Versuche**

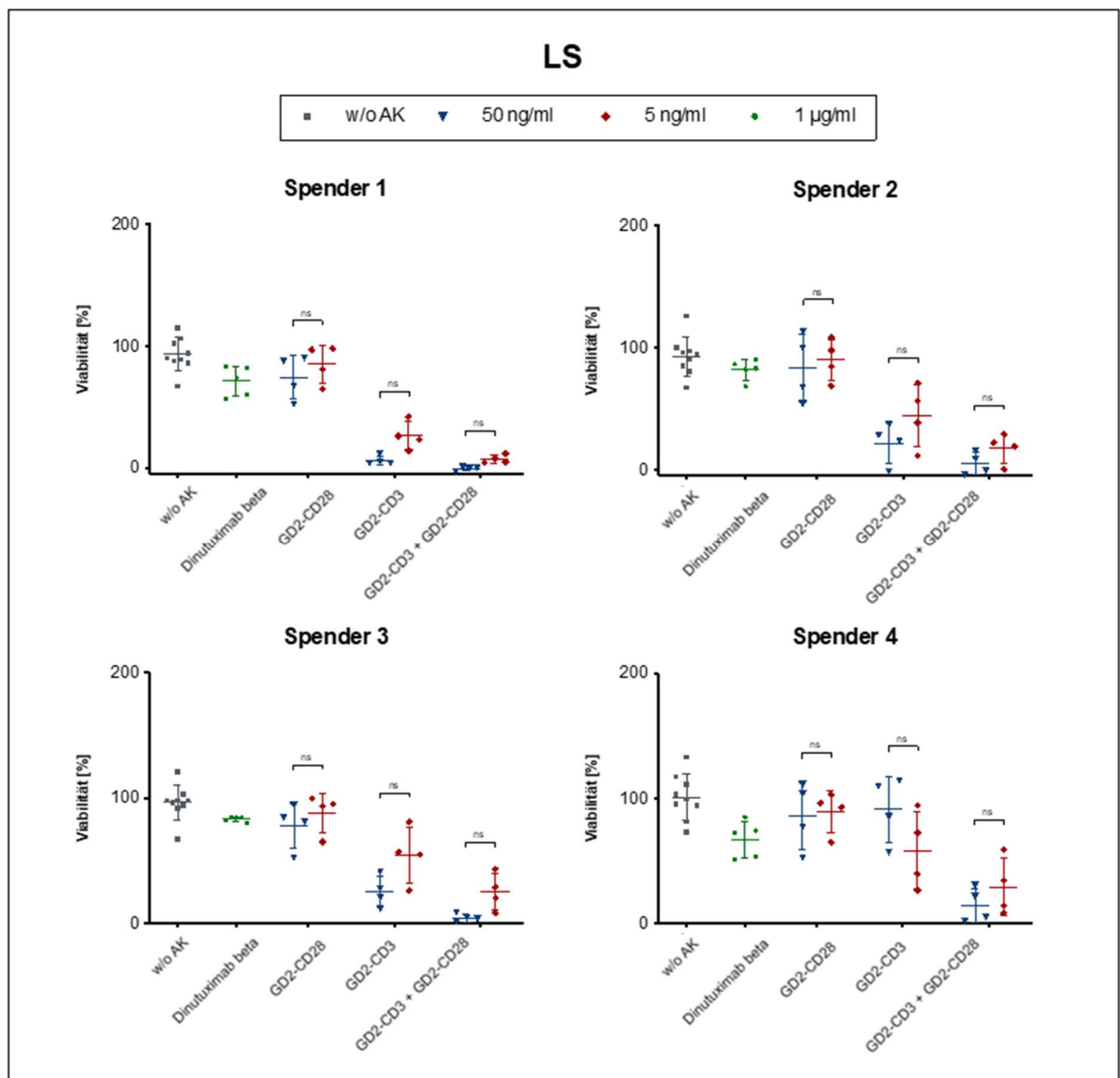
Um die Toxizität der Therapien *in vivo* so gering wie möglich zu halten, wurden auch *in vitro* ein möglichst geringes E/T-Ratio und geringe Antikörperkonzentrationen verwendet. In Vorversuchen wurden daher das geringstmögliche und dennoch wirksame E/T-Ratio und die minimal wirksamen Antikörperkonzentrationen der bispezifischen Antikörper ermittelt. Außerdem erfolgte die Bestimmung der für die Versuche geeigneten Zeitpunkte.

#### **3.4.1 Antikörperkonzentrationen**

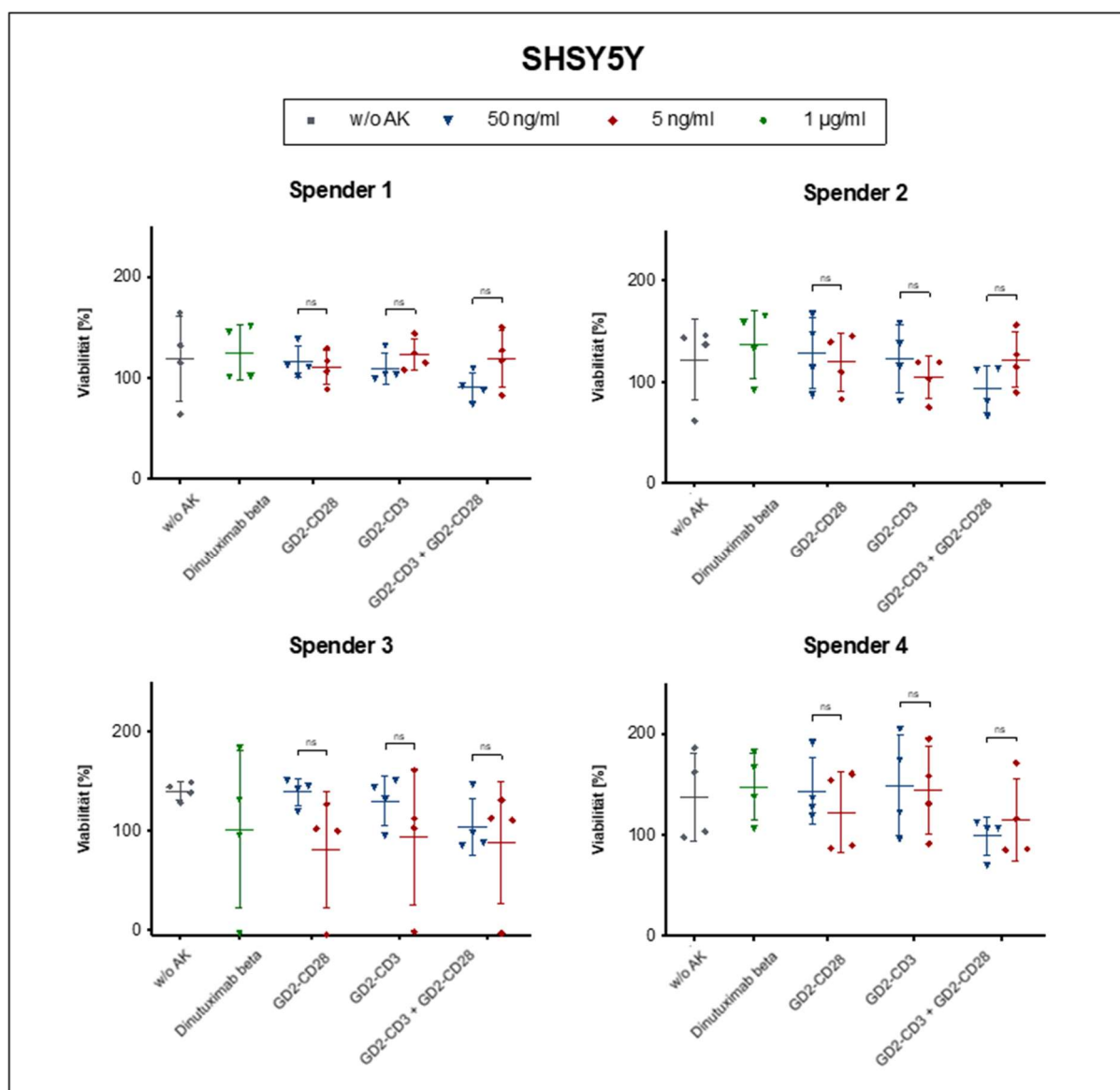
Es erfolgte die Ermittlung der optimalen Konzentration der bispezifischen Antikörper mittels Lyse-Assays nach 48 h und bei einem E/T-Ratio von 1:1. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 3 zu finden (s. Abschnitt 2.3). Bei allen Zelllinien, allen Spender:innen und allen Behandlungsbedingungen konnten in der einfaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Konzentrationen beobachtet werden (s. Abbildungen 26 - 28) ( $p \leq 0,05$ ). Auch bei einer Antikörperkonzentration von 5 ng/ml zeigt sich eine Wirksamkeit der untersuchten Behandlungen. Es wurde daher eine Konzentration von 5 ng/ml für die bispezifischen Antikörper für die weiteren Versuche verwendet. Der Antikörper Dinutuximab beta wurde in der etablierten Konzentration von 1 µg/ml verwendet.



**Abbildung 26:** Lyse der Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und Antikörperkonzentrationen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die dargestellten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.



**Abbildung 27:** Lyse der Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und Antikörperkonzentrationen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die dargestellten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.



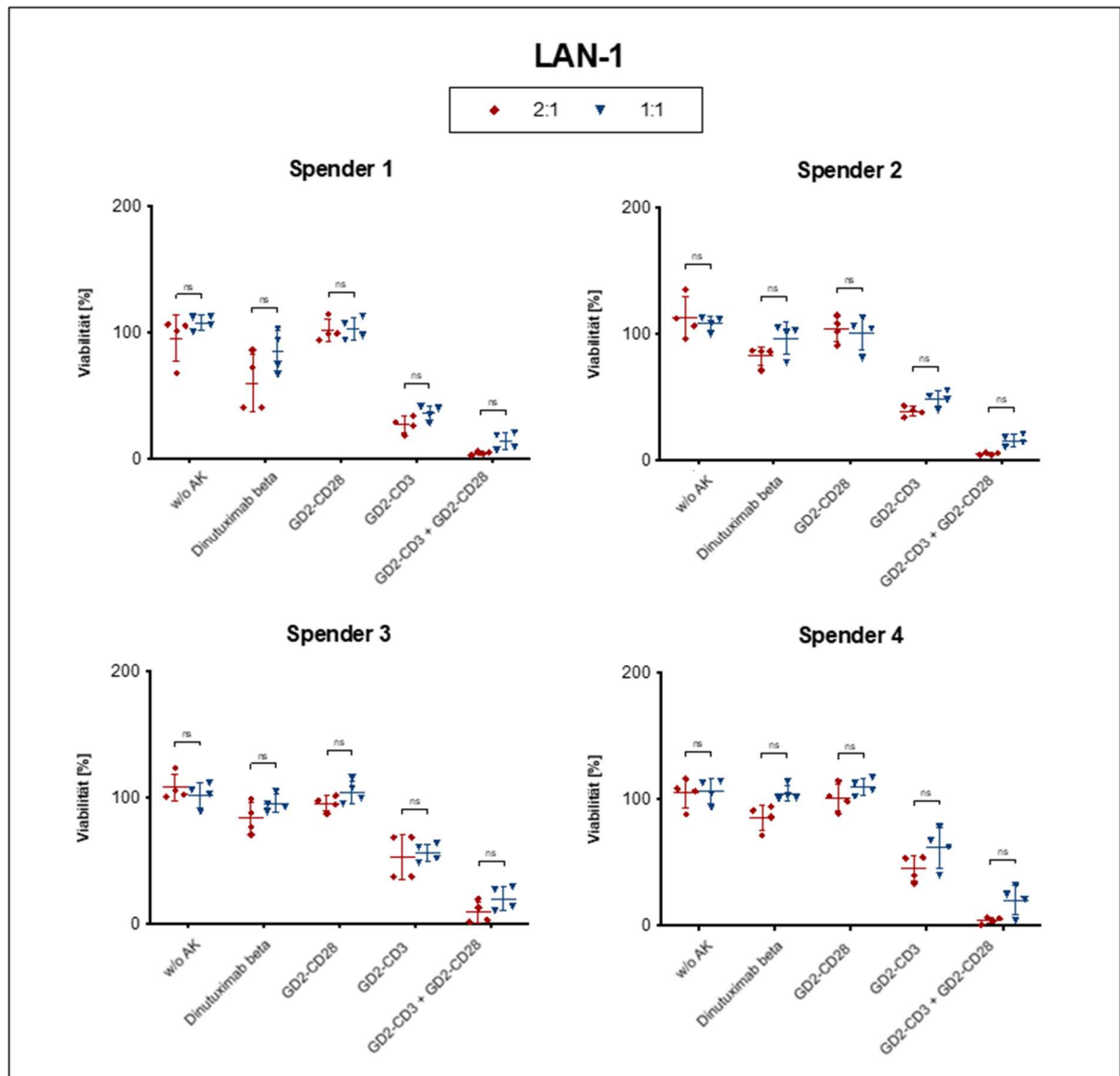
**Abbildung 28:** Lyse der Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und Antikörperkonzentrationen durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die dargestellten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

### 3.4.2 Effektorzellen-Zielzellen-Ratio

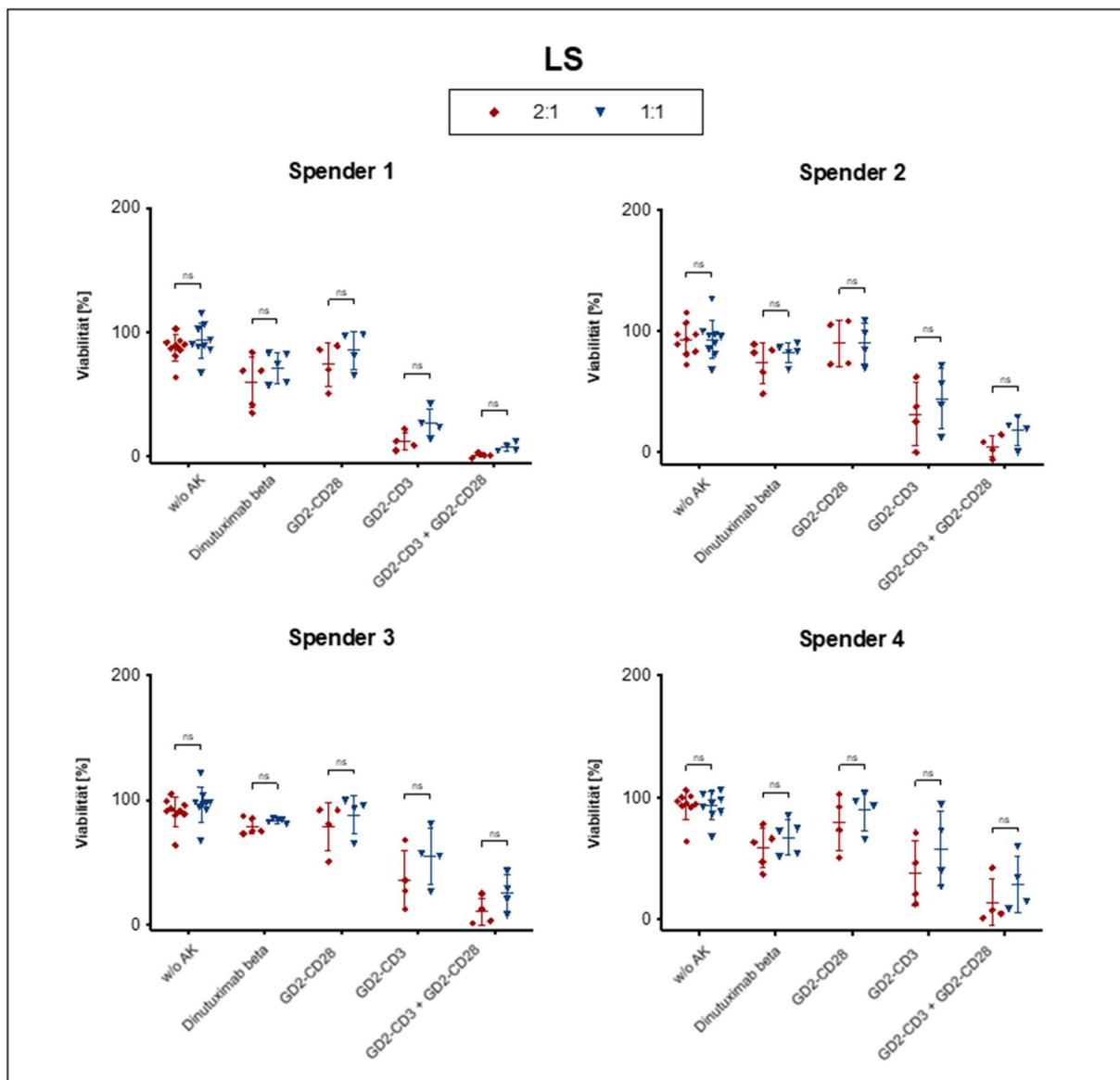
Die Ermittlung des optimalen E/T-Ratios (2:1, 1:1) erfolgte mittels Lyse-Assays nach 48 h und bei den in Tabelle 3 (s. Abschnitt 2.3) aufgeführten Antikörperkonzentrationen. Bei allen Zelllinien, allen Spender:innen und allen Behandlungsbedingungen zeigten sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (s. Abbildungen 29 – 31) ( $p \leq 0,05$ ). Auch bei einem E/T-Ratio



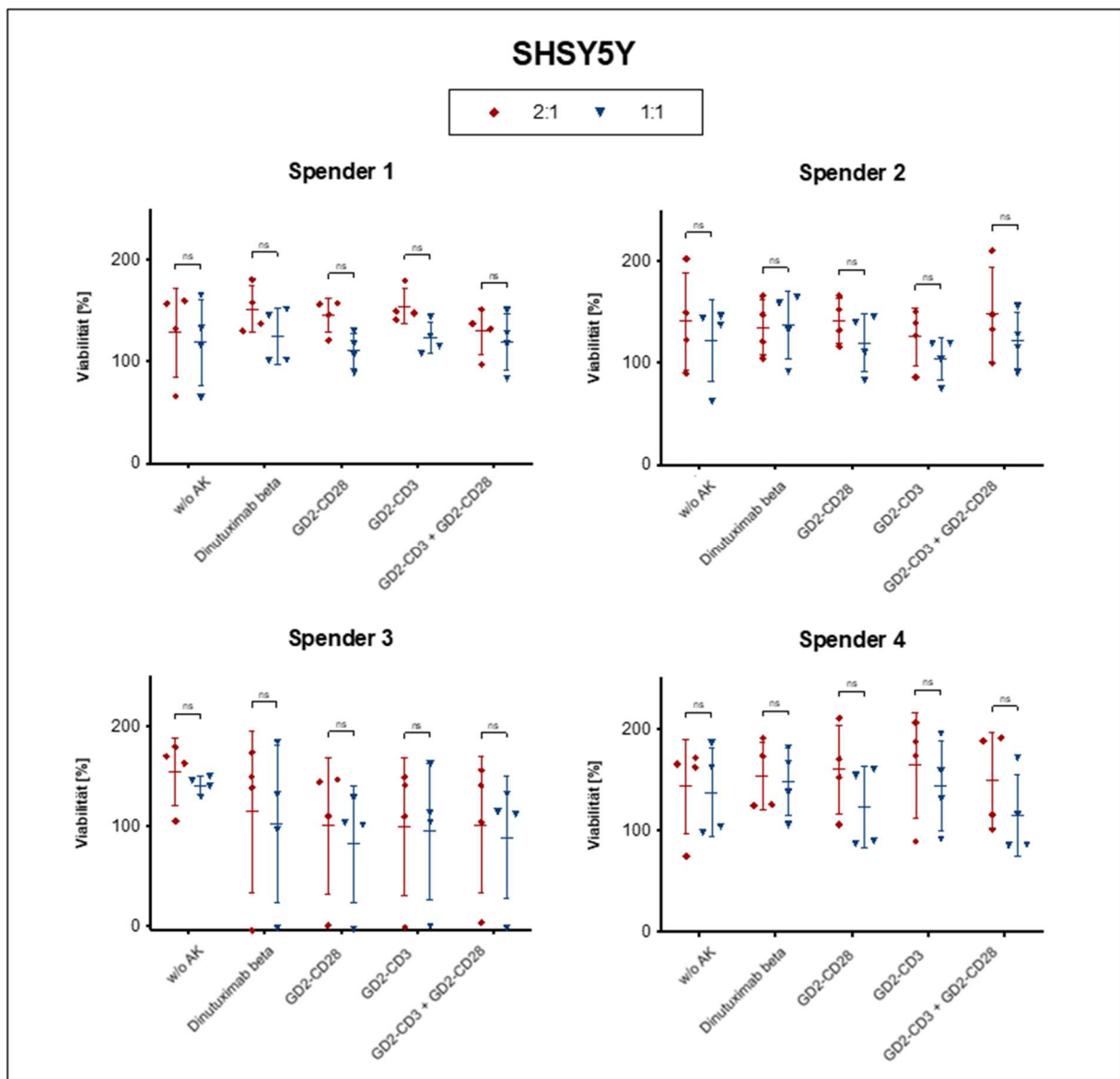
von 1:1 konnte eine Wirksamkeit der untersuchten Behandlungen nachgewiesen werden. Es wurde daher ein E/T-Ratio von 1:1 für die weiteren Versuche verwendet.



**Abbildung 29:** Lyse der Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und E/T-Ratios durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen und die dargestellten E/T-Ratios verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.



**Abbildung 30:** Lyse der Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und E/T-Ratios durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen und die dargestellten E/T-Ratios verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4-9 unabhängigen Experimenten ( $N = 4 - 9$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorierter Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.



**Abbildung 31:** Lyse der Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen und E/T-Ratios durch die Effektorzellen von 4 Spender:innen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen und die dargestellten E/T-Ratios verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Außerdem ist die statistische Auswertung mittels einfaktorier Varianzanalyse und den Ergebnissen des Tukey post-hoc Tests dargestellt. \*,  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

### 3.4.3 Zeitpunkt

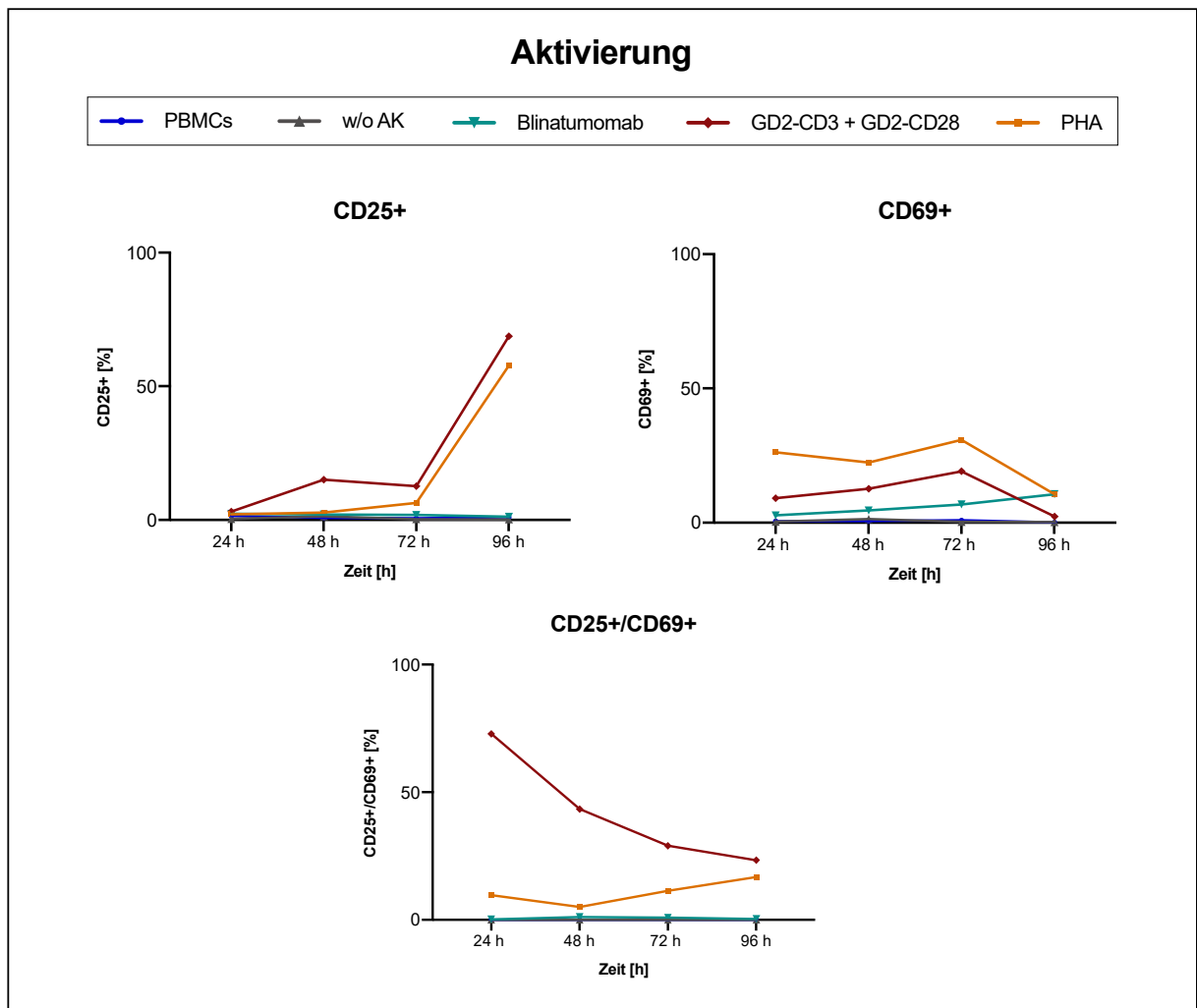
Vorab wurden die für die Versuchsreihen geeigneten Zeitpunkte ermittelt. Für die Aktivierungs- und Proliferationsassays erfolgte dies durchflusszytometrisch und für die Lyse-Assays mittels luminometrischer Messung der Viabilität der NB-Zellen. Ziel war es, Zeitpunkte zu finden, zu denen sich die betrachteten Merkmale zwischen den Behandlungsbedingungen gut differenzieren ließen.

### 3.4.3.1 Aktivierungsassays

Die Untersuchung des optimalen Zeitpunkts zur Darstellung der Aktivierungsraten erfolgte anhand der NB-Zelllinie LAN-1 und dem/der Spender:in 3 durch Messungen der Aktivierungsmarker-positiven CD3+ Zellen nach 24 h, 48 h, 72h und 96 h. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Für die CD25+ Aktivierung konnte zunächst ein leichter und ab 72 h ein deutlicher Anstieg der Aktivierungsraten unter der Kombinationsbehandlung und der Positivkontrolle festgestellt werden. Die anderen Aktivierungsraten unter den anderen Behandlungsbedingungen stellten sich zu keinem der Zeitpunkte erhöht dar.

Für die CD69+ Aktivierung ließ sich unter der Kombinationsbehandlung, Blinatumomab und bei der Positivkontrolle bis 72 h ein leichter Anstieg beobachten. Während Blinatumomab danach weiter leicht anstieg, kam es unter der Kombinationsbehandlung und bei der Positivkontrolle danach zum Abfall der Aktivierungsraten.

Für die CD25+/69+ Aktivierung konnte nach 24 h eine stark erhöhte Aktivierungsrate unter der Kombinationsbehandlung festgestellt werden, welche dann abnahm. Bei der Positivkontrolle kam es nach 48 h zu einem leichten Anstieg der Aktivierungsrate. Die Aktivierungsraten stellten sich unter den anderen Behandlungsbedingungen zu keinem Zeitpunkt erhöht dar.



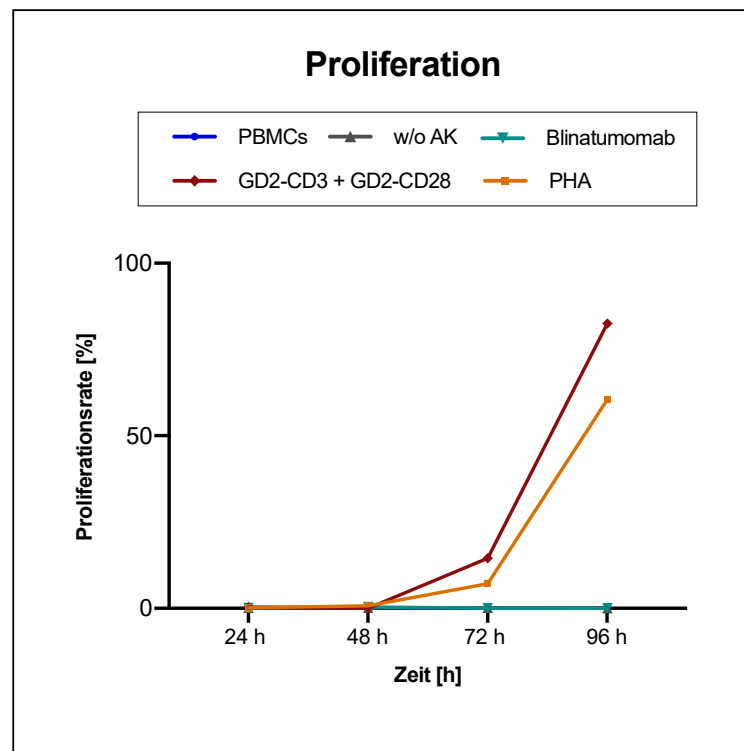
**Abbildung 32:** CD25+, CD69+ und D25+/CD69+ Aktivierung der CD3+ Effektorzellen einer/eines Spender:in bei der Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten PBMCs ohne NB-Zellen (PBMCs). Der Anteil Aktivierungsmarker-positiven Effektorzellen wurde 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 3 unabhängigen Experimenten ( $N = 3$ ) ab. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; PHA, Phytohämagglutinin; w/o AK, ohne Antikörper.

Da sich die Aktivierungsraten aller Aktivierungsmarker nach 48 h abgrenzbar darstellten, wurde dieser Zeitpunkt für die weiteren Versuche gewählt.

### 3.4.3.2 Proliferationsassays

Die Untersuchung des optimalen Zeitpunkts zur Darstellung der Proliferationsraten unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen erfolgte anhand der NB-Zelllinie LAN-1 und Spender:in 3 durch Messungen der proliferierten CD3+ Zellen nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Unter der Kombinationsbehandlung und bei der Positivkontrolle kam es nach 48 h zu einem leichten und ab 72 h zu einem starken Anstieg der

Proliferationsrate (s. Abbildung 33). Unter den anderen Behandlungsbedingungen waren zu keinem Zeitpunkt erhöhte Proliferationsraten nachweisbar.



**Abbildung 33:** Proliferation der CD3+ Effektorzellen einer/eines Spender:in bei der Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten PBMCs ohne NB-Zellen (PBMCs). Die Proliferationsrate wurde 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Behandlungsbeginn anhand der Effektorzellen in der > 1. Generation durchflusszytometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 4 angegebenen Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 3 unabhängigen Experimenten ( $N = 3$ ) ab. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; PHA, Phytohämagglutinin; w/o AK, ohne Antikörper.

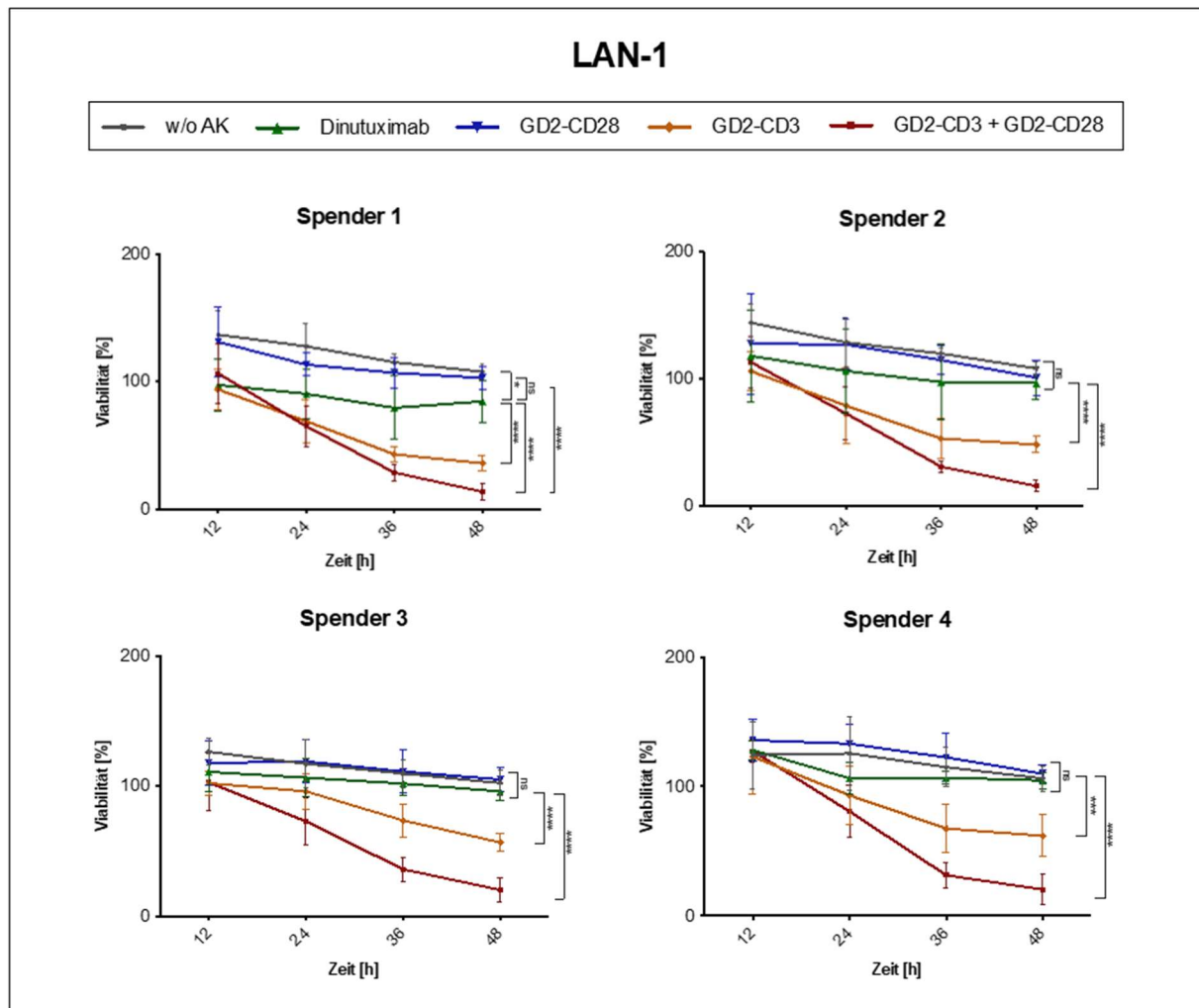
Aufgrund der nach 96 h deutlich erhöhten Proliferationsraten wurde dieser Zeitpunkt als optimaler Zeitpunkt für die weiteren Versuche identifiziert.

### 3.4.3.3 Lyse-Assays

Es erfolgte die Ermittlung des geeigneten Zeitpunkts für die Lyse-Assays bei einem E/T-Ratio von 1:1 und den in Tabelle 3 (s. Abschnitt 2.3) dargestellten Konzentrationen der Antikörper durch luminometrische Bestimmung der Viabilität der NB-Zellen nach 12 h, 24 h, 36 h und 48 h.

Bei der Zelllinie LAN-1 kam es nach einer anfänglichen Viabilität von meist > 100 % unter allen Behandlungsbedingungen im Verlauf zum Abfall dieser (s. Abbildung 34). Unter der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 war dieser Abfall am stärksten und

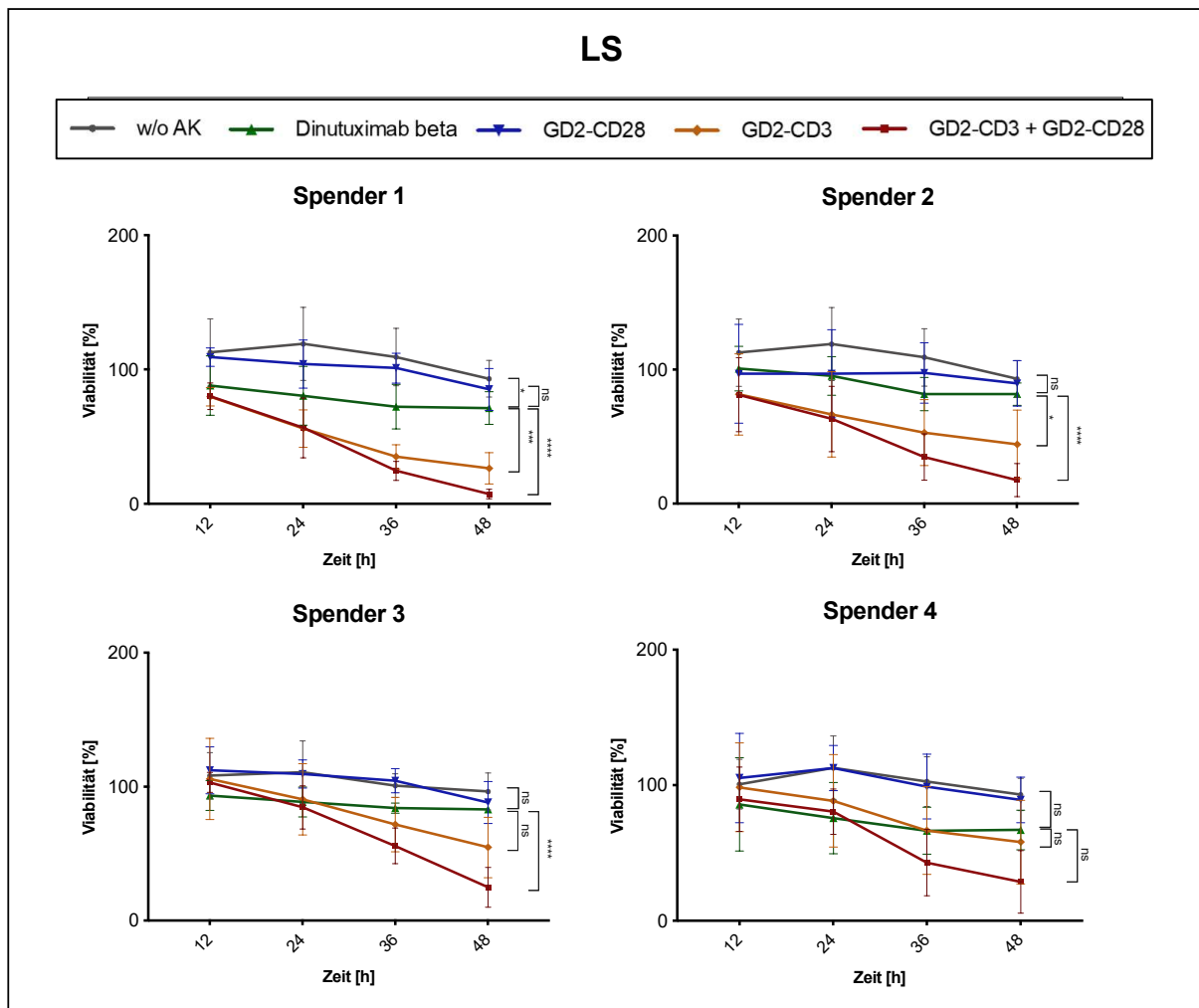
die Viabilität stellte sich durchgehend am niedrigsten dar. Unter der Behandlung mit GD2-CD28, Dinutuximab und der unbehandelten Kontrolle kam es nur zu einem leichten Abfall der Viabilität und die Viabilitäten waren durchgehend die höchsten. Unter allen Behandlungsbedingungen stagnierte der Abfall der Viabilität meist nach 36 h etwas und erreichte nach 48 h sein Minimum. Die Unterschiede zwischen allen Behandlungsbedingungen waren nach 48 h am deutlichsten.



**Abbildung 34:** Lysefähigkeit der Effektorzellen von 4 Spender:innen bezogen auf die Zelllinie LAN-1 unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Die Ergebnisse der Zelllinie LAN-1 ließen sich für die Zelllinie LS weitestgehend replizieren. Auch hier kam es unter der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 zum stärksten Abfall der Viabilität (s. Abbildung 35). Dieser stellte sich unter den anderen Behandlungsbedingungen auch, aber weniger stark dar. Nach 48 h konnte unter allen

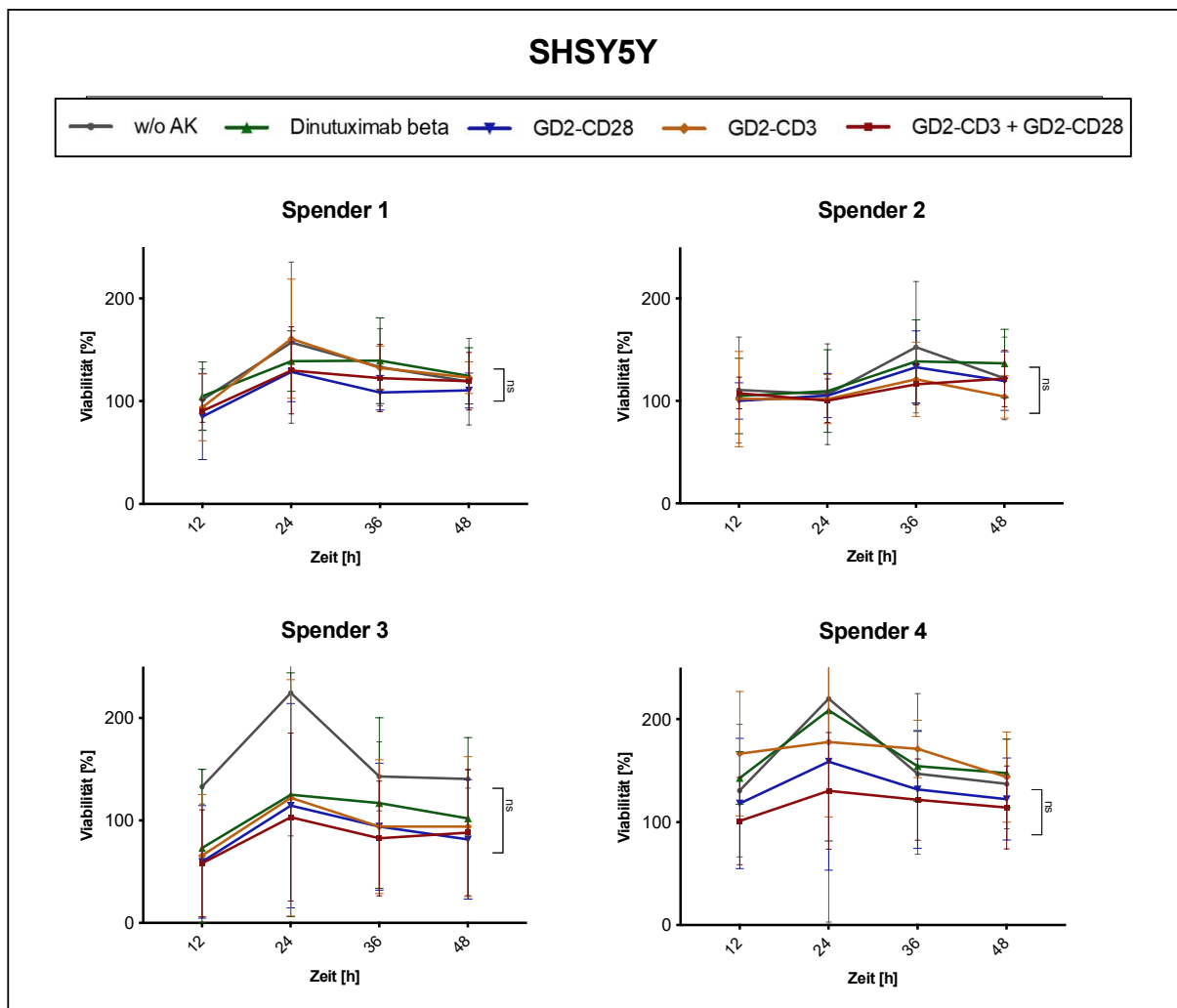
Bedingungen die niedrigste Viabilität und die deutlichsten Unterschiede festgestellt werden. Die anfänglich > 100 % erhöhte Viabilität ließ sich bei dieser Zelllinie nur unter w/o AK und GD2-CD28 beobachten.



**Abbildung 35:** Lysefähigkeit der Effektorzellen von 4 Spender:innen bezogen auf die Zelllinie LS unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4-9 unabhängigen ( $N = 4 - 9$ ) Experimenten ab. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Bei der Zelllinie SHSY5Y kam es bei drei Spender:innen nach 24 h unter allen Behandlungsbedingungen zu einem deutlichen Anstieg und danach zum Abfall der Viabilität (s. Abbildung 36). Bei Spender:in 2 trat dieser Effekt erst nach 36 h ein. Außer bei Spender:in 3 war meist durchgehend eine Viabilität > 100 % unter allen Behandlungsbedingungen feststellbar. Der Verlauf der Kurven stellte sich zwischen den Spender:innen uneinheitlich dar und die Unterschiede zwischen den Behandlungsbedingungen waren meist geringer als bei den anderen Zelllinien.



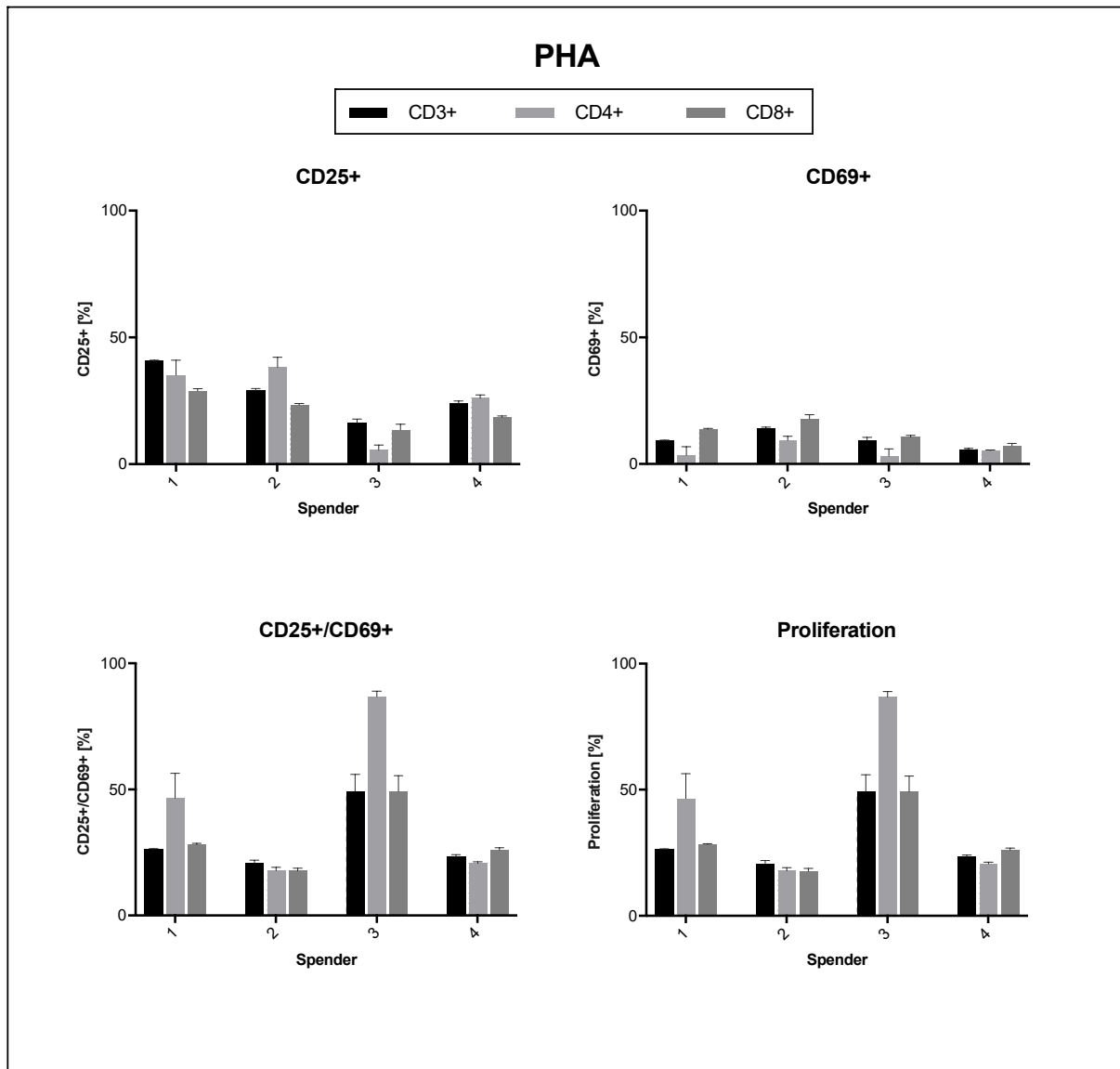


**Abbildung 36:** Lysefähigkeit der Effektorzellen von 4 Spender:innen bezogen auf die Zelllinie SHSY5Y unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Negativkontrolle bestand aus unbehandelten NB-Zellen und Effektorzellen (w/o AK). Die Viabilität der NB-Zellen wurde mittels Lyse-Assay 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Behandlungsbeginn luminometrisch detektiert. Es wurde ein E/T-Ratio von 1:1 und die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperkonzentrationen verwendet. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate von 4 unabhängigen Experimenten ( $N = 4$ ) ab. Abkürzungen: E/T-Ratio, Effektorzellen-/Zielzellen-Ratio; h, Stunden; NB-Zellen, Neuroblastom-Zellen; w/o AK, ohne Antikörper.

Aufgrund der deutlichen Wirkung auf die Viabilität und der guten Unterscheidbarkeit der Behandlungen nach 48 h, wurde dieser Zeitpunkt für die weiteren Lyse-Assays gewählt.

### 3.4.4 Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der Effektorzellen

Der T-Zell-Aktivator PHA diente als Positivkontrolle und konnte die Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der Effektorzellen in den Aktivierungs- und Proliferationsassays belegen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37:** Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der Effektorzellen (PBMCs) von 4 Spender:innen nach Stimulation mit 2,5 µg/ml PHA. Die Aktivierungsfähigkeit der CD25+, CD69+ und CD25+/CD69+ Zellen wurde 48 h und die Proliferationsfähigkeit 96 h nach Behandlungsbeginn durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte bilden den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Triplikaten von 1 Experiment ( $N = 1$ ) ab. Abkürzungen: PBMCs, periphere mononukleäre Zellen; PHA, Phytohämagglutinin.

## 4 Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zu den einzelnen Therapien im Kontext des aktuellen Forschungsstands eingeordnet. Anschließend erfolgt ein Blick auf die Limitationen und Stärken der Studie sowie die klinischen Implikationen und ein Ausblick in die Zukunft.

### 4.1 Dinutuximab beta

Unter Dinutuximab beta konnten von allen Behandlungsbedingungen die niedrigsten Aktivierungsraten der vollständigen Aktivierung festgestellt werden. Erwartungsgemäß führt der monospezifische Antikörper zwar zu einer Aktivierung, weist aber eine deutlich niedrigere Aktivierungsaktivität auf als GD2-CD3. Nach 96 h stellten sich die Proliferationsraten unter Dinutuximab beta entsprechend der vorherigen Aktivierung am niedrigsten dar. Als Konsequenz dieser verminderten Aktivierung und Proliferation konnte unter Dinutuximab beta keine signifikant reduzierte Viabilität der Tumorzellen festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ).

Die Ergebnisse belegen, dass die alleinige Spezifität für GD2 zu einer weniger effektiven Elimination der NB-Zellen führt als die Einbeziehung von T-Zellen über den Antikörper GD2-CD3. Es ist zu vermuten, dass unter Dinutuximab beta weiterhin eine Aktivierung und Proliferation der NK-Zellen stattfindet (Zeng *et al.*, 2005; Belounis *et al.*, 2020). Dies könnte über die Bestimmung des NK-Zell-Markers CD56 herausgefunden werden. Es bleibt jedoch festzustellen, dass die T-Zellen, als wichtiger Teil der Immunantwort, unter Dinutuximab beta zu einem großen Teil ungenutzt bleiben.

Durch den monospezifischen Antikörper werden keine Rezeptoren oder Aktivierungssignale außer GD2 gezielt angesprochen. Es ist davon auszugehen, dass es im Gegensatz zu den bispezifischen Antikörpern zu einer weniger gezielten und starken Bindung der Effektorzelle an die Tumorzelle kommt. Außerdem fehlt das co-stimulatorische aktivierende Signal über CD28. Dies könnte für die geringere Effektivität mit verantwortlich sein. Es wird daran geforscht, diese Nachteile zu beheben, beispielsweise durch die Entwicklung bispezifischer NK-Zell-Antikörper (Tarazona *et al.*, 2017). Des Weiteren nutzen die Tumorzellen Immunescape-Mechanismen, um den NK-Zellen zu entgehen. Beispielsweise über die Bildung von

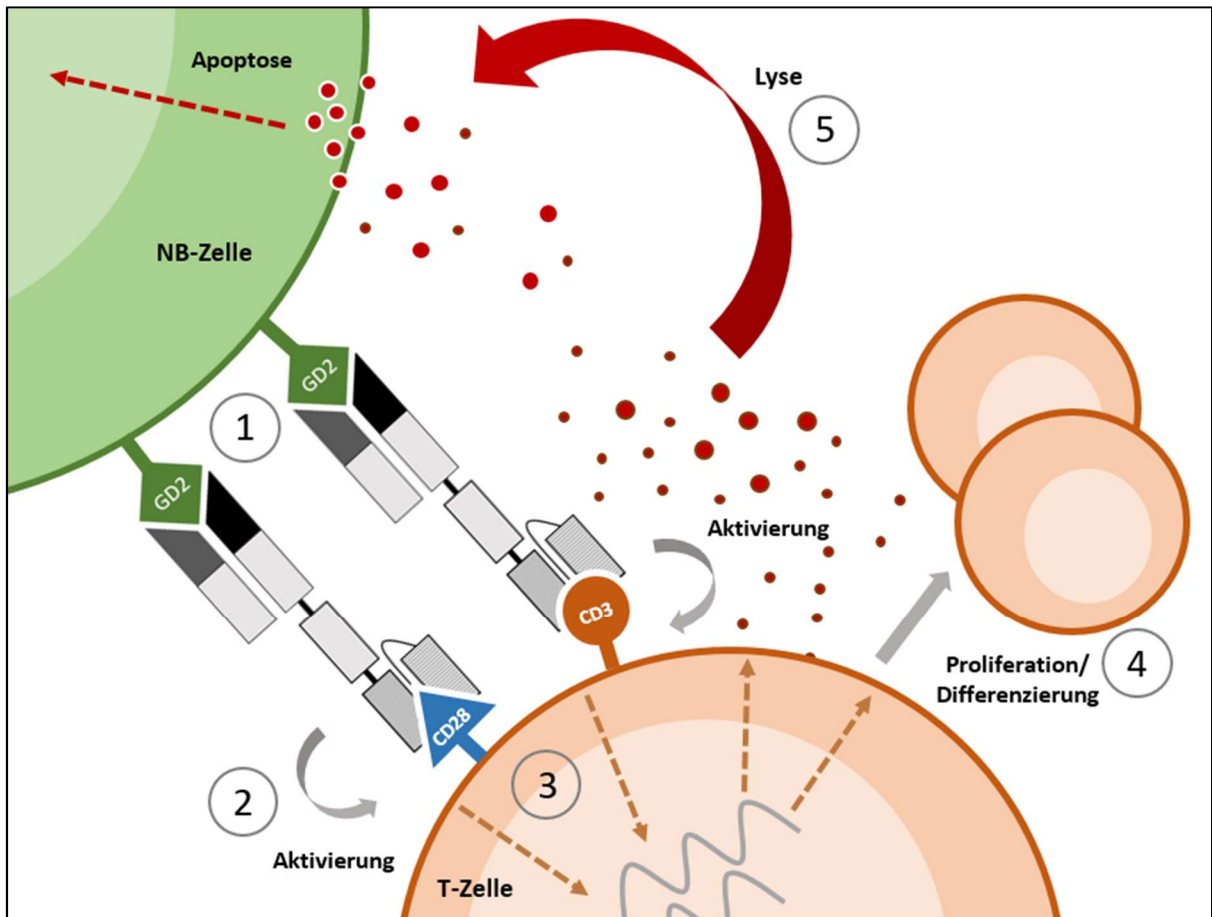
TGF- $\beta$ , die Runterregulierung von NK-Zellen-aktivierenden Molekülen oder die Überexpression von protektiven Molekülen (Bottino *et al.*, 2014; Zenarruzabeitia *et al.*, 2017). Die T-Zellen könnten durch Immunescape-Mechanismen des Neuroblastoms weniger betroffen sein oder die höhere Spezifität der bispezifischen Antikörper diese Effekte ausgleichen.

Es müssen jedoch auch Faktoren des Studiendesigns als Ursachen für die fehlende Wirksamkeit von Dinutuximab beta in Betracht gezogen werden. So fällt auf, dass Dinutuximab beta im Vergleich zur Negativkontrolle zu keiner signifikanten Reduktion der Viabilität der Tumorzellen führte ( $p \leq 0,05$ ). In den Versuchen wurden vergleichsweise geringe E/T-Ratios von 1:1 beziehungsweise 2:1 verwendet. In einer ebenfalls an frischen PBMCs mit der Zelllinie LAN-1 durchgeführten Studie von Ladenstein *et al.* (2018) konnten erst bei höheren E/T-Ratios Effekte festgestellt werden. Nach Stimulation mit IL-2 kam es bei E/T-Ratios von 5:1 zu einem gesteigerten zytotoxischen Effekt und bei einem E/T-Ratio von 20:1 zu einem optimalen Effekt von Dinutuximab beta. Diese Abhängigkeit der Wirksamkeit von Dinutuximab beta vom E/T-Ratio ist bereits aus früheren Studien bekannt (Barker *et al.*, 1991; Ladenstein *et al.*, 2018). Um eine differenziertere Betrachtung zu ermöglichen, wäre es von Vorteil, wenn auch für Dinutuximab beta ein Effekt nachweisbar wäre. Dies sollte in zukünftigen Studiendesigns berücksichtigt werden. Gleichzeitig sind diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass Dinutuximab beta auf eine höhere Anzahl von Effektorzellen angewiesen ist als die bispezifischen Antikörper (Tarazona *et al.*, 2017).

Trotz der bislang nicht zufriedenstellenden Effektivität von Dinutuximab beta ist zu beachten, dass bereits an Modifikationen geforscht wird, diese etablierte Therapie zu verbessern. Zum Beispiel über die unterstützende Gabe von IL-2 oder die *ex vivo*-Aktivierung von NK-Zellen (Bottino *et al.*, 2014; Zobel *et al.*, 2020).

#### **4.2 Bispezifische Antikörper**

Die Effektivität der bispezifischen Antikörper ließ sich in den Versuchen sehr gut abbilden und die Wirkweise nachvollziehen. Diese ist in Abbildung 38 schematisch dargestellt.



**Abbildung 38:** Schematische Darstellung der Wirkweise der bispezifischen Antikörper GD2-CD3 und GD2-CD28 gegen NB-Zellen. Abkürzungen: NB-Zelle, Neuroblastom-Zelle; rote Punkte, zytotoxische Granula; T-Lymphozyt, T-Zelle; 1, Bindung der bispezifischen Antikörper an GD2 auf der NB-Zelle; 2, Aktivierung der T-Zelle; 3, Signaltransduktion in die T-Zelle; 4, Proliferation und Differenzierung der T-Zellen; 5, Lyse der NB-Zelle.

Nachdem die bispezifischen Antikörper mit einem Arm an das GD2-Molekül auf der Oberfläche der NB-Zelle (1) und mit dem anderen Arm an die T-Zelle binden, kommt es über CD3 und CD28 zur Aktivierung der T-Zelle (2). CD3 bildet zusammen mit dem TCR den TCR-CD3-Komplex und ist maßgeblich an der Erkennung von Antigenen und in Folge der Signaltransduktion in die T-Zelle (3) sowie Aktivierung dieser beteiligt (Murphy und Weaver, 2017). Gleichzeitig diente GD2-CD28 als Co-Stimulator. Die Bedeutung von CD28 als Co-Stimulator für die Aktivierung von T-Zellen ist schon länger bekannt und bestätigt sich in dieser Studie für die Immunantwort gegen das Neuroblastom (Linsley und Ledbetter, 1993; Esensten *et al.*, 2016). Die Aktivierung ließ sich über die vermehrte Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 in den Aktivierungsassays nachvollziehen. Nach erfolgreicher Aktivierung kommt es zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen (4), damit diese ihre Effektorfunktionen angemessen ausführen können. Die verstärkte Teilung der Zellen konnte in den Proliferationsassays beobachtet werden. Schließlich kommt es über die Ausführung

verschiedener Effektorfunktionen, wie beispielsweise die Freisetzung zytotoxischer Granula (rote Punkte), zur apoptotischen Lyse der NB-Zellen (5). Die Abnahme der Viabilität konnte in den Lyse-Assays nachvollzogen werden.

#### 4.2.1 GD2-CD28

Die fehlende Wirksamkeit von GD2-CD28 ohne die Bindung von CD3 deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur und ist in Anbetracht der Probleme, die sich in vergangenen Studien mit einem monospezifischen CD28-Superagonisten gezeigt haben, positiv zu werten (Hombach *et al.*, 2001; Suntharalingam *et al.*, 2006). Nach dem Vorfall in der TGN1412-Studie wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, toxische Effekte zu umgehen. So wurden die ersten bispezifischen CD28-Antikörper entwickelt, welche nur bei Zielzell-Kontakt zu einer Lyse führten (Grosse-Hovest *et al.*, 2003; Otz *et al.*, 2009). Auch wurde ein modifizierter CD28-Antikörper entwickelt, der ohne die zusätzliche Gabe eines CD3-Antikörpers *in vitro* und *in vivo* keine Wirkung zeigte (Skokos *et al.*, 2020; Waite *et al.*, 2020).

Dass der in diesen Versuchen verwendete konventionelle bispezifische CD28-Antikörper im Gegensatz zu den Ergebnissen von Grosse-Hovest *et al.* (2003), Otz *et al.* (2009) oder Skokos *et al.* (2020) auch bei Antigenkontakt zu keiner verstärkten Lyse führte, kann verschiedene Ursachen haben. So wurden eine sehr geringes E/T-Ratio von 1:1 und eine sehr geringe Antikörper-Konzentration von 5 ng/ml verwendet. Bei Skokos *et al.* (2020) wurde beispielweise eine deutlich höhere Antikörper-Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt. Außerdem könnten Neuroblastom-spezifische Gründe, wie zum Beispiel Rezeptorbesonderheiten, eine Rolle spielen. In *in vivo*-Experimenten sollte zwingend ausgeschlossen werden, dass es zu unvorhergesehenen toxischen Effekten kommt. Der Einsatz eines modifizierten bispezifischen CD28-Antikörpers, wie von Skokos *et al.* (2020) entwickelt, könnte außerdem in Betracht gezogen werden (Grosse-Hovest *et al.*, 2003; Otz *et al.*, 2009; Skokos *et al.*, 2020).

#### 4.2.2 GD2-CD3

GD2-CD3 sollte über die Bindung der Zielzelle an die Effektorzelle zu einer effektiven Aktivierung dieser bei Antigenkontakt führen. Die alleinige Verwendung von GD2-CD3 führte in den Versuchen bereits zu hohen Aktivierungs- und Proliferationsraten sowie

einer effizienten Lyse der Tumorzellen. Diese Effekte waren jedoch signifikant geringer als in Kombination mit dem Co-Stimulator GD2-CD28 ( $p \leq 0,05$ ). Darüber hinaus zeigte sich die Wirkung abhängig vom GD2-Profil der NB-Zelllinien. Die stärksten Effekte konnten bei der Zelllinie LAN-1 und die schwächsten bei der schwach-positiven Zelllinie SHSY5Y festgestellt werden.

Die starke Wirkung von GD2-CD3 in Abhängigkeit von der GD2-Positivität der Zelllinie deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Bernhard *et al.*, 1993; Manzke *et al.*, 2001; Yankelevich *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2015). Auch die hervorgerufene Expansion der T-Zellen konnte bereits in früheren Studien zu GD2-CD3-Antikörpern festgestellt werden (Hoffmann *et al.*, 2005; Klinger *et al.*, 2012). Dabei ist hervorzuheben, dass die Effekte trotz einer sehr niedrigen Antikörper-Konzentration von 5 ng/ml und einem niedrigen E/T-Ratio von 1:1 beobachtet werden konnten. Diese festgestellte hohe Wirksamkeit müsste *in vivo* bestätigt werden. Gegebenenfalls könnte auch eine Wirkungssteigerung durch Verwendung eines modifizierten GD2-CD3 Antikörpers, wie von Ahmed *et al.* (2015) entwickelt, in Betracht gezogen werden.

#### **4.2.3 Kombinationsbehandlung**

Die höchsten Aktivierungs- und Proliferationsraten sowie die stärkste Lyse der Tumorzellen konnten unter der Kombinationsbehandlung beobachtet werden. In den Aktivierungs- und Proliferationsassays zeigten sich nach 48 h und 96 h signifikant höhere Raten als bei allen anderen Behandlungsbedingungen, auch GD2-CD3 allein ( $p \leq 0,05$ ). Außerdem stellten sich die CD4<sup>+</sup> Zellen meist stärker aktiviert beziehungsweise proliferiert dar.

Es wird deutlich, dass das co-stimulatorische Signal durch GD2-CD28 synergistisch mit GD2-CD3 zusammenwirkt und zu einer Verstärkung der Effekte führt (Yankelevich *et al.*, 2012). Die Ergebnisse decken sich mit den Befunden einer Studie von Skokos *et al.* (2020). Hier wurde die Wirkung bispezifischer CD28-Antikörper alleine oder in Kombination mit einem bispezifischen CD3-Antikörper gegen Prostata- und Ovarialkarzinom-Zellen *in vitro* und *in vivo* gegenübergestellt. Die Kombination zeigte in der Studie ebenfalls deutlich erhöhte Aktivierungs- und Proliferationsraten sowie eine gesteigerte Zytotoxizität durch humane PBMCs. Zusätzlich konnte eine verstärkte Akkumulation von CD28 in der „Immunsynapse“ zwischen Tumorzelle und Effektorzelle und eine verstärkte Ausschüttung von Zytokinen festgestellt werden. Die

T-Zell-Spezifität des zytotoxischen Effekts wurde ebenfalls nachgewiesen. So zeigten sich bei isolierten T-Zellen ähnliche Ergebnisse wie bei den PBMCs und ein ADCC-basiertes Assay konnte keine Beteiligung von NK-Zellen nachweisen (Skokos *et al.*, 2020). Yankelevich *et al.* (2012) konnten für GD2-CD3 vergleichbare Effekte feststellen. In syngenem Tumormodellen mit genetisch humanisierten Mäusen konnte außerdem *in vivo* eine gute Anti-Tumoraktivität beobachtet werden. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse von Skokos *et al.* (2020) an PBMCs mit den Ergebnissen dieser Studie stützen diese und legen nahe, dass bei weiteren Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen gerechnet werden könnte. Neben den geplanten *in vivo*-Versuchen wären auch weitere *in vitro*-Versuche, wie die von Skokos *et al.* (2020) durchgeführten, eine sinnvolle Ergänzung, um Neuroblastom-spezifische Erkenntnisse zu gewinnen (Skokos *et al.*, 2020).

### 4.3 GD2-Spezifität der gegen GD2 gerichteten Antikörper

Es zeigte sich eine deutliche Wirkung der Behandlungen mit GD2-CD3 und der Kombinationsbehandlung auf die Aktivierung, Proliferation und Lyse der Tumorzellen bei den stark GD2-positiven Zelllinien LAN-1 und LS. Dass die Wirkung bei der Zelllinie LS geringer und bei der schwach-positiven Zelllinie SHSY5Y deutlich geringer ausfiel, entspricht den GD2-Profilen der beiden Zelllinien. Für Dinutuximab beta zeigten sich die Effekte abgeschwächt ebenfalls. Gleichzeitig konnten bei den unbehandelten Kontrollen und unter der GD2-unabhängigen Stimulation durch Blinatumomab meist nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien festgestellt werden.

Die Bindung der Effektorzelle an eine spezifische Zielzelle ist eine zentrale Voraussetzung für eine effiziente Antikörpertherapie (Cheever *et al.*, 2009). Die Spezifität der bispezifischen Antikörper für GD2 konnte in diesen Versuchen belegt werden. Die Abhängigkeit der Wirkung von GD2-Antikörpern vom GD2-Profil der Zelllinien stimmt mit anderen Ergebnissen in der Literatur überein (Terzic *et al.*, 2017). Es fand außerdem keine Aktivierung, Proliferation oder Lyse der Effektorzellen ohne Kontakt zu den Zielzellen statt. Andere Studien konnten ebenfalls keine Antigen-unabhängige Aktivierung von Effektorzellen nach Stimulation mit gegen GD2 oder andere Antigene gerichtete bispezifische CD3-Antikörper feststellen (Amann *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2015). Außerdem konnte in dieser Studie keine Lyse Antigen-negativer Zellen, wie sie in anderen Studien gefunden wurde, beobachtet werden



(Ross et al., 2017). Die Effektorzellen können somit gezielt zu ihrem Ziel dirigiert und Toxizitäten durch unspezifische Reaktionen verhindert werden. Unspezifische Reaktionen der Effektorzellen werden, neben der GD2-Expression auf anderen Geweben, für die Nebenwirkungen der Therapie mit Dinutuximab beta verantwortlich gemacht (Dahlén, Veitonmäki und Norlén, 2018; Keyel und Reynolds, 2019). Die zu vermutenden geringen Nebenwirkungen müssen in weiteren Versuchen *in vivo* bestätigt werden.

Da die meisten Tumoren eine GD2-Positivität von unter 50 % aufzuweisen scheinen, wäre bei anderen NB-Zelllinien eine Effektivität im Mittelfeld dieser Ergebnisse zu erwarten (Terzic *et al.*, 2017). Es sollten weitere Versuche mit weniger stark GD2-positiven Zelllinien durchgeführt werden. Außerdem könnte die Bindung an die Zielzelle und Bildung der „Immunsynapse“ nach dem Beispiel von Skokos et al. (2020) oder Cheng et al. (2015) dargestellt werden (Cheng *et al.*, 2015; Skokos *et al.*, 2020).

#### **4.4 Subpopulationen der T-Lymphozyten**

Alle bispezifischen Antikörper wiesen erhöhte Aktivierungs- und Proliferationsraten der CD4+ T-Helferzellen auf. Bei den anderen Therapien war die verstärkte Aktivierung der CD4+ Zellen meiste geringer oder das Verhältnis in Richtung der CD8+ Zellen verschoben. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen anderer Studien mit GD2-CD3-Antikörpern. So konnten ausgeglichene Raten der Subpopulationen oder erhöhte Raten an CD8+ Zellen festgestellt werden (Cheng *et al.*, 2015; Hoseini *et al.*, 2017). Dabei muss beachtet werden, dass in den Studien mittels CD3/CD28-Beads *ex vivo*-aktivierte T-Zellen verwendet wurden (Trickett und Kwan, 2003). Der Aktivierungsmechanismus ähnelt somit der Kombinationsbehandlung in diesen Versuchen. Die *ex vivo*-Aktivierung findet jedoch über Tage bis Wochen statt und wurde mit IL-2 unterstützt. Dies entspricht nicht den physiologischen Begebenheiten und könnte die Unterschiede erklären.

Gleichzeitig deckt sich die festgestellte starke zytotoxische Aktivität der T-Helferzellen mit den Befunden anderer Studien (Quezada *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2020). Quezada et al. (2010) konnten in Mausstudien mit unbehandelten CD4+ Zellen eine unerwartet starke zytotoxische Aktivität der T-Helferzellen gegen Melanomzellen nach Radiotherapie feststellen. Die transfizierten T-Helferzellen erwiesen sich dabei bereits in sehr geringer Zahl und ohne *ex vivo*-Aktivierung als äußerst wirksam bei der

Elimination der Tumorzellen. Die Autoren führen dies auf eine besonders erfolgreiche Expansion und Differenzierung in zytotoxische Helferzellen zurück. Bedingt durch eine durch die Radiotherapie lymphopene und sensitivierte Umgebung (Quezada *et al.*, 2010). Eventuell erwies sich auch die in diesen Versuchen durch das niedrige E/T-Ratio von 1:1 erzeugte lymphopene Umgebung als Vorteil für die Ausbildung von zytotoxischen T-Helferzellen. Dies müsste anhand isolierter CD4+ Zellen oder der Analyse spezifischer Marker für zytotoxische T-Helferzellen untersucht werden.

Da Immuntherapien bislang vor allem auf CD8+ Zellen konzentriert waren, ist dies in jedem Falle ein interessanter Befund. Beispielsweise könnte dies Implikationen für MHC-Moleküle betreffende Immunescape-Mechanismen haben.

#### **4.5 Effektorzellen-Zielzellen-Ratios**

Die vorangehende myeloablative Chemotherapie und die stark immunsuppressive Mikroumgebung der Tumorzellen sind problematisch für die Immuntherapie des Neuroblastoms. So ist die Zahl der Effektorzellen in der Tumorumgebung deutlich reduziert (Mackall, 1999; Joshi, 2020). Gleichzeitig konnten Mina *et al.* (2015) nachweisen, dass die T-Zell-Infiltration bei schlecht differenzierten Neuroblastomen deutlich geringer ausfällt. Es konnte ein direkter Zusammenhang mit dem Outcome der Patient:innen festgestellt werden. Dass die Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 bereits bei einem E/T-Ratio von 1:1 eine deutlich höhere Effektivität als Dinutuximab beta aufwies, ist somit positiv zu werten. In vergleichbaren Studien mit bispezifischen (GD2-)CD3-Antikörpern wurden meist deutlich höhere E/T-Ratios verwendet (Manzke *et al.*, 2001; Yankelevich *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2015).

#### **4.6 Antikörperkonzentrationen**

Die bispezifischen Antikörper zeigten bereits in sehr niedrigen Konzentrationen von 5 ng/ml eine sehr hohe Wirksamkeit. Diese unterschied sich nicht signifikant von der höheren Dosierung von 50 ng/ml ( $p \leq 0,05$ ). Auch in anderen Studien wurde GD2-CD3 bereits erfolgreich in niedriger Konzentration eingesetzt (Yankelevich *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2015). Hier wurden jedoch vorab mit OKT3 oder CD28 aktivierte und kultivierte T-Zellen verwendet. Diese Studie belegt nun, dass auch frische PBMCs, die

eher physiologische Bedingungen widerspiegeln, eine gute Wirksamkeit in sehr niedriger Konzentration aufweisen.

#### 4.7 Zeitverlauf

Die starke Erhöhung der CD25+/69+ Aktivierungsraten unter der Kombinationsbehandlung nach 24 h und der anschließende deutliche Abfall sind wahrscheinlich durch die Runterregulation von CD69 als Marker der frühen Aktivierung bedingt (Caruso *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen, die auch in anderen Studien nach CD3- und CD28-Co-Stimulation gemacht wurden (Motamedi, Xu und Elahi, 2016). Nach erfolgreicher Aktivierung setzen andere Prozesse der Immunantwort, wie beispielweise die Proliferation, ein und das Aktivierungssignal wird obsolet (Murphy und Weaver, 2017). Im Einklang mit den Ergebnissen der Aktivierung, konnte unter der Kombinationsbehandlung nach 48 h ein leichter und nach 72 h ein deutlicher Anstieg der Proliferationsraten beobachtet werden. Diese zeitliche Verzögerung zur Aktivierung deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur und erscheint im Rahmen der physiologischen Vorgänge plausibel (Caruso *et al.*, 1997).

Die Viabilität der Tumorzellen nahm bei den stark GD2-positiven Zelllinien nach 12 h zunächst bis über das Niveau der unbehandelten Tumorzellen zu. Bei der schwach GD2-positiven Zelllinie SHSY5Y konnte dies hingegen nur bei einer/einem Spender:in beobachtet werden. Obwohl diese Zelllinie im weiteren Verlauf eine Zunahme und keine Abnahme der Viabilität zeigte. Das vermehrte Wachstum der Zellen zu Beginn und in Abhängigkeit von der GD2-Positivität der NB-Zelllinien könnte auf eine reaktive Proliferation der NB-Zellen als Antwort auf die Immunreaktion zurückzuführen sein und sollte weiter untersucht werden. Bislang gibt es dazu keine Erkenntnisse in der Literatur. Alternativ kann ein Messfehler bei den Referenzwerten in Betracht gezogen werden, welcher für den Vergleich der Bedingungen allerdings keine weitere Konsequenz hätte.

Im Zeitverlauf kam es zu einer Abnahme der Viabilität der stark GD2-positiven Zelllinien unter allen Bedingungen. Unter der Kombinationsbehandlung und GD2-CD3 war dieser Effekt zu allen Zeitpunkten am stärksten und es konnte bereits nach 12 h eine effektive Lyse beobachtet werden, die mit der Zeit noch zunahm. Eine zügige Lyse ist essentiell, um eine Selektion und Proliferation resistenter Tumorzellen zu vermeiden

und einen nachhaltigen Effekt zu erzielen (Schreiber, Old und Smyth, 2011). Die Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen nahm im weiteren zeitlichen Verlauf noch zu. In zukünftigen Versuchen könnten die Lyse-Assays ausgedehnt werden, um eine gegebenenfalls stärkere Lyse zu späteren Zeitpunkten ebenfalls zu erfassen.

#### **4.8 Kontrollen**

Um die beschriebenen Effekte der bispezifischen Antikörper und von Dinutuximab beta eindeutig diesen Therapien zuordnen zu können, wurden verschiedene Kontrollen verwendet. Außerdem belegte die erfolgreiche Positivkontrolle mit PHA die Aktivierungs- und Proliferationsfähigkeit der PBMCs.

##### **4.8.1 Effektorzellen mit Neuroblastom-Zellen ohne Antikörper**

Die unbehandelten PBMCs in Kombination mit den Tumorzellen dienten als Kontrolle, um nachzuweisen, dass die Effekte nicht nur auf die natürliche Reaktivität der PBMCs gegen die Tumorzellen zurückzuführen sind. Die PBMCs zeigten ohne die Stimulation durch Antikörper in den Versuchen keine Aktivität gegen die NB-Zellen. Dies ist überraschend, da auch unabhängig von einer artifiziellen Stimulation durch die Antikörper von einer Aktivität des Immunsystems gegen die Tumorzellen auszugehen ist (Hellström *et al.*, 1968). So wird auch bei spontan remittierenden Neuroblastomen von einer Elimination der Tumorzellen durch das natürliche Immunsystem ausgegangen (Cheung und Dyer, 2013). Eine Erklärung könnte die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen sein. Die Wirkung der Effektorzellen könnte bei einem deutlich höheren Anteil an Tumorzellen eingeschränkt sein (Cheung und Dyer, 2013; Pistoia *et al.*, 2013; Joshi, 2020). Gleichzeitig führten die bispezifischen Antikörper auch bei einem niedrigen E/T-Ratio zu einer effektiven Immunantwort. Es ergibt sich also ein signifikanter Vorteil gegenüber der natürlichen Immunantwort.

##### **4.8.2 Blinatumomab**

Der CD3-CD19-Antikörper Blinatumomab diente als unspezifischer T-Zell-Aktivator der Kontrolle der GD2-spezifischen Aktivierung der Effektorzellen. Da Blinatumomab innerhalb von 48 h zu einer fast vollständigen Depletion von B-Zellen führt, ist davon auszugehen, dass die in diesen Versuchen beobachteten Effekte nicht auf einen CD19-Stimulus zurückzuführen sind (Klinger *et al.*, 2012).

Unter Blinatumomab konnten leicht erhöhte Aktivierungsraten, unabhängig von der GD2-Positivität der Zelllinien, festgestellt werden. Bei den PBMCs ohne NB-Zellen war hingegen fast keine Aktivierung nachweisbar. Eine durch Blinatumomab verstärkte monospezifische Aktivierung der T-Zellen bei Kontakt mit den NB-Zellen könnte beispielsweise durch eine vermehrte IL-2 Ausschüttung in diesem Umfeld ausgelöst sein (Murphy und Weaver, 2017). Die Proliferationsraten waren unter Blinatumomab nur leicht oder gar nicht erhöht. Es scheint also unter Blinatumomab zu keiner effizienten Aktivierung mit anschließender Proliferation gekommen zu sein.

Für die bispezifischen GD2-Antikörper bestätigt sich damit, dass die Wirkung dieser nicht alleine auf eine unspezifische Aktivierung über CD3 zurückzuführen ist. Die Bindung an GD2 und die Spezifität dafür sind Voraussetzungen für die beobachtete starke Immunantwort.

#### **4.9 Stärken, Limitationen und Ausblick**

Die Stärken und Limitationen der Studie müssen bei der Evaluation der Ergebnisse kritisch betrachtet werden. So sind zum einen die besonderen Herausforderungen des Neuroblastoms, wie beispielsweise Immunescape-Mechanismen, zu berücksichtigen. Zum anderen bringt das kindliche, durch die Induktionstherapie beeinträchtigte, Immunsystem Besonderheiten mit sich. Ein weiterer Fokus liegt auf den Limitationen der Dinutuximab-beta-Therapie und den Implikationen für die Therapie mit den bispezifischen Antikörpern.

Für alle gegen ein Antigen gerichteten Immuntherapien kann eine verminderte Expression des entsprechenden Oberflächenmoleküls ein limitierender Faktor des Therapieerfolgs sein. Auch in dieser Studie zeigte sich eine verminderte Effektivität aller gegen GD2 gerichteten Therapien bei geringen Expressionsraten von GD2. Dies ist besonders relevant, da nach neueren Erkenntnissen bis zu 12 % der Patient:innen eine verminderte oder keine GD2-Expression auf den Tumorzellen aufweisen. Auch bei Dinutuximab beta wird dies als eine der Ursachen für ein Therapieversagen angesehen (Schumacher-Kuckelkorn *et al.*, 2017; Keyel und Reynolds, 2019). Andere Studien weisen hingegen auf einen deutlich niedrigeren Anteil GD2-negativer Neuroblastome hin (Terzic *et al.*, 2017). Trotzdem ist zu beachten, dass eine Chemo- oder Immuntherapie einen Selektionsdruck ausüben kann, der zum GD2-Verlust der Tumorzellen führen kann (Kramer *et al.*, 1998; Schumacher-Kuckelkorn *et al.*, 2005).

Die in diesen Versuchen verwendeten stark GD2-positiven NB-Zelllinien unterschieden sich in ihren GD2-Expressionsraten stark von der schwach GD2-positiven Zelllinie. Es könnten weitere Versuche zur Effektivität der Therapien bei unterschiedlichen Expressionsraten durchgeführt werden. Gleichzeitig scheinen hohe GD2-Expressionsraten mit einem schnelleren Krankheitsfortschritt zu korrelieren und haben damit eine besondere Relevanz (Kholodenko *et al.*, 2018).

Im Sinne einer stratifizierten Therapie könnten in Zukunft die Erfolgsaussichten einer gegen GD2 gerichteten Immuntherapie über eine Analyse der individuellen GD2-Expression der NB-Zellen vorab eingeschätzt werden. Für Dinutuximab beta konnte bereits ein erhöhtes Rezidivrisiko bei niedrigen GD2-Expressionen der Tumorzellen festgestellt werden (Terzic *et al.*, 2017). Außerdem sollte die Suche nach weiteren Zielantigenen neben GD2 weiterverfolgt werden. Diese könnten Alternativen bei vollständigem GD2-Verlust bieten oder in Kombination eine sinnvolle Ergänzung sein. Bei anderen Tumorarten wird dieses Prinzip bereits angewandt, auch wenn es bei pädiatrischen Tumoren eine besondere Herausforderung darstellt (Cheung und Dyer, 2013; Sapski *et al.*, 2020).

Bei den Effektorzellen der Neuroblastom-Patient:innen sind verschiedene Besonderheiten zu beachten. Insbesondere muss nach der Depletion durch die Induktions-Chemotherapie und Stammzelltransplantation mit deutlich erniedrigten Leukozytenzahlen gerechnet werden. Zwar ist bekannt, dass sich NK-Zellen von der Therapie quantitativ schneller wieder erholen als T- und B-Zellen, doch scheinen diese in ihrer Funktion eingeschränkt zu sein (Pukownik *et al.*, 2015; Nassin *et al.*, 2018; Casey und Cheung, 2020). So ist weiterhin eine größere Zahl NK-Zellen für eine wirksame Behandlung nötig (Tarazona *et al.*, 2017). In diesem Kontext ist von einer suboptimalen Wirkung von NK-Zell-medierten Therapien, wie Dinutuximab beta, auszugehen. Um die Wirksamkeit zu steigern, werden Immunstimulatoren, wie IL-2 und GM-CSF, verwendet. Diese führen zu einer Expansion der Effektorzellen, verschlechtern allerdings das Nebenwirkungsprofil der Dinutuximab beta-Therapie (Ladenstein *et al.*, 2018; Keyel und Reynolds, 2019). Vor diesem Hintergrund ist es positiv hervorzuheben, dass die bispezifischen Antikörper auch bei sehr niedrigem E/T-Ratio eine höhere Wirksamkeit als Dinutuximab beta aufwiesen. Gegebenenfalls könnte somit auf den zusätzlichen Einsatz von Immunstimulatoren verzichtet und Nebenwirkungen reduziert werden. Außerdem sollte ein Monitoring des Immunstatus

während und nach der Chemotherapie angedacht werden. So könnte individuell ein geeigneter Zeitpunkt für die Therapie festgestellt werden (Laszlo *et al.*, 2015; Szanto *et al.*, 2020).

Ein Mechanismus mit dem das Neuroblastom der Elimination durch das Immunsystem entgeht, ist die Entwicklung einer immunsuppressiven TME. Komplexe Faktoren der TME, wie die hervorgerufene Hypoxie, Vaskularisierung oder metabolische Veränderungen, konnten in diesen Versuchen nicht vollständig abgebildet werden (Wu *et al.*, 2015; Lim, Rathmell und Rathmell, 2020). Sie könnten die Effektivität der Therapien *in vivo* beeinflussen und sollten weiter untersucht werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Hypoxie zu einer Inhibierung des TCR und des CD28-Signals sowie einer Rekrutierung von regulatorische T-Zellen führen kann (Palazón *et al.*, 2012). Dies könnte T-Zell-medierte Therapien beeinflussen. Eine Kombination dieser Therapien mit speziell die TME inhibierenden Medikamenten könnte erwogen werden. Zum Beispiel über die Hemmung von Wachstumsfaktoren oder die Unterdrückung von tumorassoziierten Makrophagen (Joshi, 2020; Liu und Joshi, 2020).

Um den Selektionsdruck auf die Zellen zu reduzieren, sollte eine Therapie zügig zu einer möglichst vollständigen Lyse der Tumorzellen führen (Schreiber, Old und Smyth, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass eine Limitation der Therapie mit Dinutuximab beta die Ausbildung von Resistenzmechanismen aufgrund einer unvollständigen Elimination der Tumorzellen ist (Keyel und Reynolds, 2019). Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf eine zügige und starke Reduktion der Tumorzellzahl durch die untersuchten bispezifischen Antikörper hin. Dies wurde zuvor bereits für andere bispezifische CD3-Antikörper beobachtet (Hoffmann *et al.*, 2005). Aufgrund der Kürze der Beobachtungszeit, kann eine spätere Ausbildung von Resistenzmechanismen oder ein GD2-Verlust jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die hohe Effektivität von GD2-CD3 im Vergleich zu Dinutuximab beta ist ein Hinweis darauf, dass T-Zell spezifische Immunescape-Mechanismen, wie ein MHC-Verlust oder ein Affinitätsverlust für Ganglioside, umgangen werden konnten (Cheung und Dyer, 2013). Für ein besseres Verständnis, sollten die Effekte auf molekularer Ebene weiter untersucht werden.

Die Nachhaltigkeit der Therapie und das Nebenwirkungsprofil werden sich erst in Tierversuchen und klinischen Langzeitstudien vollständig zeigen. Erste Phase-I/II-Studien zu bispezifischen GD2-CD3-Antikörpern verliefen ohne Zwischenfälle und auch für Dinutuximab beta sind keine Langzeitnebenwirkungen bekannt (Casey und Cheung, 2020). Um Nebenwirkungen zu reduzieren sollten außerdem niedrige Dosierungen angestrebt werden (Suntharalingam *et al.*, 2006). In den Versuchen erwiesen sich die bispezifischen Antikörper bereits in einer sehr geringen Dosis als wirksam. Die Ergebnisse lassen somit auf eine geringe Toxizität der Therapie hoffen. Ein geplantes Zytokinassay konnte bei eingeschränkter Verfügbarkeit der Blutspender:innen im Rahmen dieser Studie nicht mehr durchgeführt werden. Dieses sollte nachgeholt und weitere Toxizitätsanalysen durchgeführt werden. Einschränkend ist außerdem zu beachten, dass der synergistische Effekt von CD28 in dieser niedrigen Dosis vergleichsweise gering war (Laszlo *et al.*, 2015; Skokos *et al.*, 2020). Positiv ist hervorzuheben, dass eine Dosissteigerung, beispielsweise bei niedrigen GD2-Expressionsraten, möglich scheint.

Die hohe Wirksamkeit der bispezifischen Antikörper lässt darauf hoffen, dass eine der Hauptursachen von Rezidiven, die minimale Resterkrankung, durch die Therapie erreicht und eliminiert werden kann (Maris, 2010). Einerseits erlaubt die geringe Größe von Antikörpern ihnen eine gute Gewebepenetration. Andererseits könnte die geringe Halbwertszeit zu einer schlechteren Wirksamkeit bei soliden Tumoren im Vergleich zu hämatologischen Neoplasien führen (Hoseini *et al.*, 2017; Trabolsi *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2015). Bei bispezifischen Antikörpern ist die Halbwertszeit zusätzlich aufgrund des fehlenden Fc-Fragments reduziert (Huehls, Coupet und Sentman, 2015). In der Anwendung könnte dies eine besondere Herausforderung darstellen, da sehr geringe Infusionsintervalle über einen langen Zeitraum eingehalten werden müssten. Gleichzeitig wäre die Therapie so gut steuerbar und Nebenwirkungen könnten frühzeitig erkannt werden. Des Weiteren muss die eingeschränkte Erreichbarkeit des ZNS und des lymphatischen Systems beachtet werden. Darauf weisen erhöhte Raten verbliebener Tumorzellen in diesen Kompartimenten bei Rezidiven hin (Dobrenkov und Cheung, 2014). Diese Limitation könnte auch die bispezifischen Antikörper betreffen.

Eine Kombination von bispezifischen Antikörpern mit anderen Therapien sollte im Rahmen eines multimodalen, individuellen Therapiekonzepts angestrebt werden. Die Immuntherapie wird eine Resektion des Tumors nicht ersetzen können, doch gibt es



Hinweise auf einen Vorteil für den Behandlungserfolg nach einer neoadjuvant eingesetzten GD2-Immuntherapie. Dies erklärt sich am ehesten durch eine frühzeitige Elimination von Metastasen und der minimalen Resterkrankung (Zobel *et al.*, 2020). Der geeignete Zeitpunkt für die bispezifischen Antikörper im Verlauf der Stufentherapie sollte also weiter untersucht werden. Inwiefern die hoch toxische Chemotherapie reduziert werden kann, ist aktuell jedoch noch nicht abzusehen. Eine Kombination verschiedener immunologischer Strategien könnte die Effektivität steigern und sollte erwogen werden. So könnten die bispezifischen Antikörper mit der Gabe von Zytokinen oder Immuncheckpoint-Inhibitoren unterstützt werden. Die Toxizitäten müssten dabei streng beobachtet werden. Außerdem kann die Kombination mit Radiotherapien sinnvoll sein, um beispielsweise das ZNS besser zu erreichen (Dobrenkov und Cheung, 2014).

Hinsichtlich des Studiendesigns muss berücksichtigt werden, dass die Effektorzellen, welche in diesen Versuchen verwendet wurden, von gesunden, erwachsenen Spender:innen stammten. Bei pädiatrischen Patient:innen könnten, insbesondere nach der Induktionstherapie, Unterschiede in der Anzahl und den Subpopulationen der Effektorzellen vorliegen. Dies könnte die Wirksamkeit der Therapie beeinflussen (Szanto *et al.*, 2020). Auch könnten die Effektorantworten beim unreifen kindlichen Immunsystem anders ausfallen (Casey und Cheung, 2020). Des Weiteren ist zu beachten, dass die Tumorzellen von anderen Spender:innen als die PBMCs stammten. Allogene Effekte, welche Einfluss auf die Wirkung der Therapien hatten, können also nicht ausgeschlossen werden.

Positiv hervorzuheben ist der Einsatz frischer PBMCs aus Vollblut. So wurden physiologischere Bedingungen geschaffen, als beispielsweise über die in anderen Studien verwendeten aktivierten Effektorzellen. Diese aktivierten Effektorzellen sollen eine höhere Wirksamkeit der Therapien bei niedrigen Dosierungen erzielen. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass eine effektive Therapie auch ohne *ex vivo*-Aktivierung möglich ist. Dies könnte durch den Einsatz von CD28 zu erklären sein. Bestätigt sich dies *in vivo*, wäre ein großer Vorteil in der Anwendung gegeben. Es könnte eine Infusion der Antikörper ohne vorherige, aufwendige Isolation von Effektorzellen erfolgen. Die Handhabung wäre einfacher, die Kosten niedriger und die Therapie verfügbarer (Trickett und Kwan, 2003; Yankelevich *et al.*, 2012).

Abschließend ist die erfolgreiche Replikation der Ergebnisse bei vier Spender:innen und drei NB-Zelllinien als große Stärke der Studie zu sehen. Geringe Unterschiede zwischen den Spender:innen könnten genetische Ursachen haben oder mit dem aktuellen Immunstatus zum Zeitpunkt der Blutentnahme zusammenhängen. Auch dies könnte weitergehend untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war der *in vitro*-Vergleich des gegen das Oberflächenprotein GD2 auf dem Neuroblastom gerichteten monospezifischen Antikörpers Dinutuximab beta mit neuartigen T-Zellen aktivierenden bispezifischen GD2-Antikörpern beziehungsweise einer Kombination dieser. Dazu wurde der Einfluss der verschiedenen Therapien auf die Aktivierung und Proliferation der Effektorzellen aus frischen PBMCs von vier Spendern, sowie die Lyse der Tumorzellen von drei NB-Zelllinien evaluiert. Die Versuche ergaben deutlich erhöhte Aktivierungs-, Proliferations- und Lyseraten unter der Behandlung mit dem GD2-CD3-Antikörper und eine signifikante Verstärkung dieses Effekts in Kombination mit einem GD2-CD28-Antikörper ( $p \leq 0,05$ ). Die Effekte zeigten sich in geringer Dosierung der Antikörper und bei niedrigem E/T-Ratio. Der alleinige Einsatz von GD2-CD28 zeigte nur eine geringe Wirkung. Unter dem Einsatz von GD2-CD3 alleine und noch verstärkt in Kombination mit GD2-CD28, konnte somit *in vitro* eine deutlich höhere Wirksamkeit als unter der etablierten Therapie mit Dinutuximab beta festgestellt werden. Ebenfalls nachgewiesen werden konnten eine hohe Spezifität der Antikörper für GD2, die essentiell ist um Tumorzellen gezielt zu bekämpfen und Schäden an unbeteiligten Geweben zu vermeiden. Außerdem eine Expansion der Effektorzellen, um eine nachhaltige und starke Immunantwort, auch gegen größere Tumormengen zu gewährleisten. Und als Folge eine zügige und effiziente Lyse der Tumorzellen, die möglichst wenig Residuen zurücklässt.

*Summary:* The aim of this study was the *in vitro* comparison of the monospecific GD2-antibody dinutuximab beta and two t-cell activating bispecific GD2-antibodies as well as a combination of these against neuroblastoma. Activation and proliferation of the effector cells from fresh PBMCs of four donors as well as lysis of three tumor cell lines were measured to evaluate this. In comparison with dinutuximab beta the results showed significantly higher levels of activation and proliferation of effector cells as well as lysis of tumor cells when applying the GD2-CD3 antibody; this effect was enhanced in combination with the GD2-CD28 antibody. The effects showed in low antibody doses and E/T-ratio and were dependent on the GD2-positivity of the tumor cell lines. GD2-CD28 alone showed only a minor effect.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
B-ALL	B-Vorläufer-Akute Lymphatische Leukämie
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
CHO	Chinese hamster ovary
CH1	Konstantes Fragment/schwere Kette 1
CH3	Konstantes Fragment/schwere Kette 3
ca.	circa
CL	Konstantes Fragment/leichte Kette
COG	Children's Oncology Group
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor
E/T-Ratio	Effektorzellen-Zielzellen-Ratio

Fab	engl. antigen binding fragment
FACS	Durchflusszytometer
FBS	Fetal bovine serum
Fc	engl. crystallising fragment
FMO-Kontrolle	Fluorescence-Minus-One-Kontrolle
FVS 780	Fixable viability stain 780
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunden
IDRF	Image defined risk factors
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
IL-10	Interleukin 10
I-mIBG	Iod-meta-Iodobenzylguanidine
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
LDH	Laktatdehydrogenase
LT- $\alpha$	Lymphotoxin- $\alpha$
MFI-R	Median fluorescence intensity-ratio
MHC	Major histocompatibility complex

MHC-I	MHC-Klasse-I-Moleküle
MHC-II	MHC-Klasse-II-Moleküle
mIBG	Metajodbenzylguanidin
MRT	Magnetresonanztomographie
NB-Zellen	Neuroblastom-Zellen
NB-Zelllinien	Neuroblastom-Zelllinien
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSE	Neuronenspezifische Enolase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PHA	Phytohämagglutinin
PBMC	Peripheren mononukleäre Zellen
PD1	Programmed cell death protein 1
PPi	Pyrophosphat
PSMA	Prostate specific membrane antigen
P/S	Penicillin-Streptomycin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
s.	siehe
SD	Standardabweichung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	Tumor growth factor β
TME	Tumormikroumgebung

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T-Zelle	T-Lymphozyt
VH	Variables Fragment/schwere Kette
VL	Variables Fragment/leichte Kette
w/o AK	ohne Antikörper
ZNS	Zentralnervensystem
$^{131}\text{I}$ -mIBG	$^{131}\text{I}$ od-meta-Iodobenzylguanidine
+	positiv

## 7 Literaturverzeichnis

Adler, M. J. and Dimitrov, D. S. (2012) 'Therapeutic Antibodies Against Cancer', *Hematol Oncol Clin of North Am*, pp. 447–481. doi: 10.1016/j.hoc.2012.02.013.

Ahmed, M. *et al.* (2015) 'Human derived dimerization tag enhances tumor killing potency of a T-cell engaging bispecific antibody', *Onc Immunology*, 4(4). doi: 10.4161/2162402X.2014.989776.

Ahmed, M. and Cheung, N.-K. V. (2014) 'Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy', *FEBS Letters*, 588(2), pp. 288–297. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.030.

Amann, M. *et al.* (2009) 'Therapeutic window of an EpCAM/CD3-specific BiTE antibody in mice is determined by a subpopulation of EpCAM-expressing lymphocytes that is absent in humans', *Cancer Immunol Immunother*, 58(1), pp. 95–109. doi: 10.1007/s00262-008-0529-y.

Amoroso, L. *et al.* (2017) 'Investigational drugs in phase II clinical trials for the treatment of neuroblastoma', *Expert Opin Investig Drugs*, 26(11), pp. 1281–1293. doi: 10.1080/13543784.2017.1380625.

Arumugam, S. *et al.* (2019) 'The Evidence for External Beam Radiotherapy in High-Risk Neuroblastoma of Childhood: A Systematic Review', *Clinical Oncology*, 31(3), pp. 182–190. doi: 10.1016/j.clon.2018.11.031.

Barker, E. *et al.* (1991) 'Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells', *Cancer Research*, 51(1), pp. 144–149.

Belounis, A. *et al.* (2020) 'Patients' NK cell stimulation with activated plasmacytoid dendritic cells increases dinutuximab-induced neuroblastoma killing', *Cancer Immunol Immunother*, 69(9), pp. 1767–1779. doi: 10.1007/s00262-020-02581-0.

Bernhard, H. *et al.* (1993) 'Induction of tumor-cell lysis by bi-specific antibody recognizing ganglioside GD2 and T-cell antigen CD3', *Int J Cancer*, 55(3), pp. 465–470. doi: 10.1002/ijc.2910550324.

Bottino, C. *et al.* (2014) 'Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition,



escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches', *Front Immunol*, 5(56), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2014.00056.

Brodeur, G. M. *et al.* (1993) 'Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment.', *Journal of Clinical Oncology*, 11(8), pp. 1466–1477. doi: 10.1080/16501960410016046.

Van Den Broek, T., Borghans, J. A. M. and Van Wijk, F. (2018) 'The full spectrum of human naive T cells', *Nature Reviews Immunology*, 18, pp. 363–373. doi: 10.1038/s41577-018-0001-y.

Caruso, A. *et al.* (1997) 'Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation', *Cytometry*, 27(1), pp. 71–76. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O.

Casey, D. L. and Cheung, N.-K. V (2020) 'Immunotherapy of pediatric solid tumors: treatments at a crossroads, with an emphasis on antibodies', *Cancer Immunology Research*, 8, pp. 161–166.

Cavdarli, S., Groux-Degroote, S. and Delannoy, P. (2019) 'Gangliosides: the double-edge sword of neuro-ectodermal derived tumors', *Biomolecules*, 9(311). doi: 10.3390/biom9080311.

Cheever, M. *et al.* (2009) 'The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research', *Clin Cancer Res*, 15(17), pp. 5323–5337. doi: 10.1038/s41395-018-0061-4.

Chen, L. and Flies, D. B. (2013) 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nature Reviews Immunology*, 13(4), pp. 227–242. doi: 10.1038/nri3405.

Cheng, M. *et al.* (2015) 'Structural design of disialoganglioside GD2 and CD3-bispecific antibodies to redirect T cells for tumor therapy', *International Journal of Cancer*, 136(2), pp. 476–486. doi: 10.1002/ijc.29007.

Cheresh, D. A. *et al.* (1986) 'Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins', *Journal of Cell Biology*, 102(3), pp. 688–696. doi: 10.1083/jcb.102.3.688.

Cheung, N.-K. V. and Dyer, M. A. (2013) 'Neuroblastoma: Developmental Biology, Cancer Genomics, and Immunotherapy Nai-Kong', *Nature Reviews Cancer*, 13(6), pp. 397–411. doi: 10.1038/nrc3526.Neuroblastoma.

Children's Oncology Working Group (COG) (2011) *Neuroblastoma Risk Stratification*, [Online im Internet]. Available at: url: <https://childrensoncologygroup.org/index.php/newly-diagnosed-with-neuroblastomavanc> [Stand: 15.06.2021, 09.53 Uhr].

Chouaib, S. *et al.* (2012) 'Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape', *Frontiers in Immunology*, 3(21), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2012.00021.

Crawford, A. *et al.* (2019) 'A mucin 16 bispecific T cell-engaging antibody for the treatment of ovarian cancer', *Science Translational Medicine*, 11(6), pp. 1–14. doi: 10.1126/scitranslmed.aau7534.

Dahlén, E., Veitonmäki, N. and Norlén, P. (2018) 'Bispecific antibodies in cancer immunotherapy', *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 6(1), pp. 3–17. doi: 10.1177/2515135518763280.

Dimberu, P. M. and Leonhardt, R. M. (2011) 'Cancer immunotherapy takes a multi-faceted approach to kick the immune system into gear', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(4), pp. 371–380.

Dobrenkov, K. and Cheung, N.-K. V. (2014) 'GD2-targeted immunotherapy and radioimmunotherapy', *Seminars in Oncology*, 41(5), pp. 589–612. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.07.003.GD2-targeted.

Erdmann, F. *et al.* (2020) *Deutsches Kinderkrebsregister - Jahresbericht 2019 (1980-2018)*. Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Esensten, J. H. *et al.* (2016) 'CD28 costimulation: from mechanism to therapy', *Immunity*, 44(5), pp. 973–988. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.020.

Farkona, S., Diamandis, E. P. and Blasutig, I. M. (2016) 'Cancer immunotherapy: the

beginning of the end of cancer?', *BMC Medicine*, 14(73), pp. 1–18. doi: 10.1186/s12916-016-0623-5.

Gould, S. J. and Subramani, S. (1988) 'Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology', *Analytical Biochemistry*, 175(1), pp. 5–13. doi: 10.1016/0003-2697(88)90353-3.

Grosse-Hovest, L. *et al.* (2003) 'A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing', *European Journal of Immunology*, 33(5), pp. 1334–1340. doi: 10.1002/eji.200323322.

Haas, C. *et al.* (2006) 'A tumor vaccine containing anti-CD3 and anti-CD28 bispecific antibodies triggers strong and durable antitumor activity in human lymphocytes', *International Journal of Cancer*, 118(3), pp. 658–667. doi: 10.1002/ijc.21390.

Haghiri, S. *et al.* (2021) 'Long-term follow-up of high-risk neuroblastoma survivors treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation rescue', *Bone Marrow Transplantation*. doi: 10.1038/s41409-021-01258-1.

Hellström, I. E. *et al.* (1968) 'Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(4), pp. 1231–1238. doi: 10.1073/pnas.60.4.1231.

Hoffmann, P. *et al.* (2005) 'Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct', *International Journal of Cancer*, 115(1), pp. 98–104. doi: 10.1002/ijc.20908.

Hombach, A. *et al.* (2001) 'T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis', *Cancer Research*, 61(5), pp. 1976–1982.

Horcher, E. and Ladenstein, R. (2009) 'Neuroblastom und andere Nebennierentumoren', in *Kinderchirurgie*. Springer, Berlin, Heidelberg., pp. 542–557. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-89032-4\\_43](https://doi.org/10.1007/978-3-540-89032-4_43).

Horta, Z. P., Goldberg, J. L. and Sondel, P. M. (2016) 'Anti-GD2 mAbs and next-

generation mAb-based agents for cancer therapy', *Immunotherapy*, 8(9), pp. 1097–1117. doi: 10.2217/imt-2016-0021.

Hoseini, S. S. *et al.* (2017) 'Bispecific antibody does not induce T-cell death mediated by chimeric antigen receptor against disialoganglioside GD2', *OncolImmunology*, 6(6), pp. 1–10. doi: 10.1080/2162402X.2017.1320625.

Hoy, S. M. (2016) 'Dinutuximab: a review in high-risk neuroblastoma', *Targeted Oncology*, 11(2), pp. 247–253. doi: 10.1007/s11523-016-0420-2.

Huehls, A. M., Coupet, T. A. and Sentman, C. L. (2015) 'Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy', *Immunology and Cell Biology*, 93(3), pp. 290–296. doi: 10.1038/icb.2014.93.

Hung, J. T. and Yu, A. L. (2019) *GD2-targeted immunotherapy of neuroblastoma, Neuroblastoma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions*. Philadelphia: Elsevier Inc., Philadelphia. doi: 10.1016/B978-0-12-812005-7.00004-7.

Irwin, M. S. and Park, J. R. (2015) 'Neuroblastoma: Paradigm for precision medicine', *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), pp. 225–256. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.015.

Jahan-Tigh, R. R. *et al.* (2012) 'Flow cytometry', *Journal of Investigative Dermatology*, 132(10), pp. 1–6. doi: 10.1038/jid.2012.282.

Johnson, S., Nguyen, V. and Coder, D. (2013) 'Assessment of cell viability', *Current Protocols in Cytometry*, 9.2.1(SUPPL.64), pp. 1–26. doi: 10.1002/0471142956.cy0902s64.

Joshi, S. (2020) 'Targeting the tumor microenvironment in neuroblastoma: recent advances and future directions', *Cancers*, 12(2057). doi: 10.3390/cancers12082057.

Julien, S. *et al.* (2013) 'How do gangliosides regulate RTKs signaling?', *Cells*, 2(4), pp. 751–767. doi: 10.3390/cells2040751.

Kantarjian, H. *et al.* (2017) 'Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia', *New England Journal of Medicine*, 376(9), pp. 836–847. doi: 10.1056/nejmoa1609783.

- Keyel, M. E. and Reynolds, C. P. (2019) 'Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy', *Biologics: Targets and Therapy*, 13, pp. 1–12. doi: 10.2147/BTT.S114530.
- Kholodenko, I. V. *et al.* (2018) 'Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy', *Journal of Immunology Research*, 2018, pp. 1–25. doi: 10.1155/2018/7394268.
- Klinger, M. *et al.* (2012) 'Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab', *Blood*, 119(26), pp. 6226–6233. doi: 10.1182/blood-2012-01-400515.
- Kohler, J. A. *et al.* (2000) 'A randomized trial of 13-Cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy', *British Journal of Cancer*, 83(9), pp. 1124–1127. doi: 10.1054/bjoc.2000.1425.
- Kramer, K. *et al.* (1998) 'Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 4, pp. 2135–2139. doi: 10.1136/bmj.1.4186.493.
- Krishnamurthy, A. and Jimeno, A. (2018) 'Bispecific antibodies for cancer therapy: a review', *Pharmacology and Therapeutics*, 185, pp. 122–134. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.12.002.
- Kumar, B. V, Connors, T. and Farber, D. L. (2018) 'Human T cell development, localization, and function throughout life', *Immunity*, 48(2), pp. 202–213. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007.Human.
- Ladenstein, R. *et al.* (2018) 'Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*, 19(12), pp. 1617–1629. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30578-3.
- Ladenstein, R. *et al.* (2020) 'Investigation of the role of dinutuximab beta-based immunotherapy in the siopen high-risk neuroblastoma 1 trial (HR-NBL1)', *Cancers*, 12(309), pp. 1–19. doi: 10.3390/cancers12020309.

- Laszlo, G. S. *et al.* (2015) 'T-cell ligands modulate the cytolytic activity of the CD33/CD3 BiTE antibody construct, AMG 330', *Blood Cancer Journal*, 5(8), pp. e340–6. doi: 10.1038/bcj.2015.68.
- Lim, A. R., Rathmell, W. K. and Rathmell, J. C. (2020) 'The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy', *eLife*, 9, p. e55185. doi: 10.7554/eLife.55185.
- Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A. (1993) 'The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen', *Annual Review of Immunology*, 11, pp. 191–212. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001203.
- Liu, K. X. and Joshi, S. (2020) " " Re-educating " tumor associated macrophages as a novel immunotherapy strategy for neuroblastoma', *Frontiers in Immunology*, 11(1947). doi: 10.3389/fimmu.2020.01947.
- Lyddane, C. *et al.* (2006) 'Cutting edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization', *The Journal of Immunology*, 176(6), pp. 3306–3310. doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3306.
- Lyons, A. B., Blake, S. J. and Doherty, K. V. (2013) 'Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE related dyes', *Current Protocols in Cytometry*, 9.11(SUPPL.64), pp. 1–12. doi: 10.1002/0471142956.cy0911s64.
- Mackall, C. L. (1999) 'T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review', *The Oncologist*, 4, pp. 370–378. doi: 10.1634/theoncologist.4-5-370.
- Manzke, O. *et al.* (2001) 'Immunotherapeutic strategies in neuroblastoma: antitumoral activity of deglycosylated ricin a conjugated anti-GD2 antibodies and anti-CD3xanti-GD2 bispecific antibodies', *Medical and Pediatric Oncology*, 36(1), pp. 185–189. doi: 10.1002/1096-911X(20010101)36:1<185::AID-MPO1044>3.0.CO;2-J.
- Maris, J. M. (2010) 'Recent advances in neuroblastoma', *New England Journal of Medicine*, 23(362), pp. 2202–2211. doi: 10.1056/NEJMra0804577.Recent.
- Matthay, K. K. *et al.* (2009) 'Long-term results for children with high-risk neuroblastoma

treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: A children's oncology group study', *Journal of Clinical Oncology*, 27(7), pp. 1007–1013. doi: 10.1200/JCO.2007.13.8925.

Mina, M. *et al.* (2015) 'Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma', *Onc Immunology*, 4(9). doi: 10.1080/2162402X.2015.1019981.

Monclair, T. *et al.* (2009) 'The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report', *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), pp. 298–303. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6876.

Motamedi, M., Xu, L. and Elahi, S. (2016) 'Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: the kinetics of expression of T cell activation markers', *Journal of Immunological Methods*. doi: 10.1016/j.jim.2016.08.002.

Mueller, I. *et al.* (2018) 'Tolerability, response and outcome of high-risk neuroblastoma patients treated with long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO', *mAbs*, 10(1), pp. 55–61. doi: 10.1080/19420862.2017.1402997.

Murphy, K. and Weaver, C. (2017) *Janeway's Immunobiology, 9th edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, Milton Park.

Murphy, K. and Weaver, C. (2018) *Janeway Immunologie*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4.

Nassin, M. L. *et al.* (2018) 'Biology of blood and marrow transplantation immune reconstitution following autologous stem cell transplantation in patients with high-risk neuroblastoma at the time of immunotherapy', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(3), pp. 452–459. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.11.012.

Navid, F., Santana, V. M. and Barfield, R. C. (2010) 'Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors', *Current Cancer Drug Targets*, 10(2), pp. 200–209. doi: 10.2174/156800910791054167.

Oh, D. Y. *et al.* (2020) 'Intratumoral CD4+ T cells mediate anti-tumor cytotoxicity in

- human bladder cancer', *Cell*, 181(7), pp. 1612–1625. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.017.
- Otz, T. *et al.* (2009) 'A bispecific single-chain antibody that mediates target cell-restricted, supra-agonistic CD28 stimulation and killing of lymphoma cells', *Leukemia*, 23(1), pp. 71–77. doi: 10.1038/leu.2008.271.
- Ozkaynak, M. F. *et al.* (2018) 'A comprehensive safety trial of chimeric antibody 14.18 with GM-CSF, IL-2, and isotretinoin in high-risk neuroblastoma patients following myeloablative therapy: children's oncology group study ANBL0931', *Frontiers in Immunology*, 9(1355). doi: 10.3389/fimmu.2018.01355.
- Palazón, A. *et al.* (2012) 'Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer', *Clinical Cancer Research*, 18(5), pp. 1207–1213. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1591.
- Pinto, N. R. *et al.* (2015) 'Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(27). doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648.
- Pistoia, V. *et al.* (2013) 'Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma', *Frontiers in Immunology*, 3(167), pp. 1–8. doi: 10.3389/fonc.2013.00167.
- Przepiorka, D. *et al.* (2015) 'FDA approval: blinatumomab', *Clinical Cancer Research*, 21(18), pp. 4035–4039. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0612.
- Pukownik, E. *et al.* (2015) 'Lymphocyte subpopulations in children after allogenic stem cell transplantation', *Medical and Biological Sciences*, 28(4), pp. 43–47. doi: 10.12775/mbs.2014.033.
- Quezada, S. A. *et al.* (2010) 'Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts', *Journal of Experimental Medicine*, 207(3), pp. 637–650. doi: 10.1084/jem.20091918.
- Reusch, U. *et al.* (2004) 'Effect of tetravalent bispecific CD19XCD3 recombinant antibody construct and CD28 costimulation on lysis of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells', *International Journal of Cancer*, 112(3), pp. 509–518. doi: 10.1002/ijc.20417.
- Riddell, S. R. and Greenberg, P. D. (1990) 'The use of anti-CD3 and anti-CD28



monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells', *Journal of Immunological Methods*, 128(2), pp. 189–201. doi: 10.1016/0022-1759(90)90210-M.

Rombi, B. *et al.* (2013) 'Proton radiotherapy for childhood tumors: an overview of early clinical results', *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, 04(04). doi: 10.4172/2155-9619.1000161.

Ross, S. L. *et al.* (2017) 'Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing', *PLoS ONE*, 12(8), p. e0183390. doi: 10.1371/journal.pone.0183390.

Sait, S. and Modak, S. (2017) 'Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma', *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(10), pp. 889–904. doi: 10.1080/14737140.2017.1364995.

Sandor, M. and Lynch, R. G. (1993) 'Lymphocyte Fc receptors: the special case of T cells', *Immunology Today*, 14(5), pp. 227–231. doi: 10.1016/0167-5699(93)90168-K.

Sanford, M. (2015) 'Blinatumomab: first global approval', *Drugs*, 75(3), pp. 321–327. doi: 10.1007/s40265-015-0356-3.

Sapski, S. *et al.* (2020) 'Influence of antigen density and immunosuppressive factors on tumor-targeted costimulation with antibody-fusion proteins and bispecific antibody-mediated T cell response', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(11), pp. 2291–2303. doi: 10.1007/s00262-020-02624-6.

Schmidt, M. *et al.* (2006) 'Is there a benefit of <sup>131</sup>I-MIBG therapy in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? a retrospective evaluation of the german neuroblastoma trial NB97 and implications for the the german neuroblastoma trial NB2004', *NuklearMedizin*, 45(4), pp. 145–151. doi: 10.1055/s-0038-1625111.

Schmidt, M., Hero, B. and Simon, T. (2016) '<sup>131</sup>I-mIBG therapy in neuroblastoma: established role and prospective applications', *Clinical and Translational Imaging*, 4(2), pp. 87–101. doi: 10.1007/s40336-016-0173-z.

Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. (2011) 'Cancer immunoediting : integrating suppression and promotion', *Science*, 331, pp. 1565–1570.

Schumacher-Kuckelkorn, R. *et al.* (2005) 'Lacking immunocytological GD2 expression in neuroblastoma: report of three cases', *Pediatric Blood and Cancer*, 45(2), pp. 195–201. doi: 10.1002/pbc.20301.

Schumacher-Kuckelkorn, R. *et al.* (2017) 'Lack of immunocytological GD2 expression on neuroblastoma cells in bone marrow at diagnosis, during treatment, and at recurrence\*', *Pediatric Blood and Cancer*, 64(1), pp. 46–56. doi: 10.1002/pbc.26184.

Schütt, C. and Bröker, B. (2011) *Grundwissen Immunologie, 2. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Schwartz, R. H. (1992) 'Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy', *Cell*, 71(7), pp. 1065–1068. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80055-8.

Scott, A. M., Allison, J. P. and Wolchok, J. D. (2012) 'Monoclonal antibodies in cancer therapy', *Cancer Immunity*, 12, pp. 14–22.

Scott, A. M., Wolchok, J. D. and Old, L. J. (2012) 'Antibody therapy of cancer', *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp. 278–287. doi: 10.1038/nrc3236.

Sharma, P. *et al.* (2011) 'Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps', *Nature Reviews Cancer*, 11(11), pp. 805–812. doi: 10.1038/nrc3153.Novel.

Simon, T. *et al.* (2019) 'S1-Leitlinie 025-008: Neuroblastom', *AWMF online*.

Siokis, A. *et al.* (2018) 'F-actin-driven CD28-CD80 localization in the immune synapse', *Cell Reports*, 24(5), pp. 1151–1162. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.114.

Skokos, D. *et al.* (2020) 'A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies', *Science Translational Medicine*, 12, p. eaaw7888. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw7888.

Sorkin, L. S. *et al.* (2010) 'Anti-GD2 with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia', *Pain*, 149(1), pp. 135–142. doi: 10.1016/j.pain.2010.01.024.

- Speleman, F., Park, J. R. and Henderson, T. O. (2016) 'Neuroblastoma: a tough nut to crack', *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (36), pp. e548–e557. doi: 10.1200/edbk\_159169.
- Strober, W. (1997) 'Trypan blue exclusion test of cell viability.', *Current protocols in immunology*, A.3B.1-A.3(Supp. 21), pp. 2–3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Suntharalingam, G. *et al.* (2006) 'Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412', *New England Journal of Medicine*, pp. 1018–1028. doi: 10.1056/nejmoa063842.
- Suzuki, M. and Cheung, N.-K. V. (2015) 'Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(3), pp. 349–362. doi: 10.1517/14728222.2014.986459.
- Szanto, C. L. *et al.* (2020) 'Monitoring immune responses in neuroblastoma patients during therapy', *Cancers*, 12(519). doi: 10.3390/cancers12020519.
- Tarazona, R. *et al.* (2017) 'Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(2), pp. 233–245. doi: 10.1007/s00262-016-1882-x.
- Terzic, T. *et al.* (2017) 'Expression of disialoganglioside (GD2) in neuroblastic tumors: a prognostic value for patients treated with anti-GD2 immunotherapy', *Pediatric and Developmental Pathology*, 0(0). doi: 10.1177/1093526617723972.
- Thomas, L. (1982) 'On immunosurveillance in human cancer', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 55, pp. 329–333.
- Trabolsi, A., Arumov, A. and Schatz, J. H. (2019) 'T cell-activating bispecific antibodies in cancer therapy', *The Journal of Immunology*, 203, pp. 585–592. doi: 10.4049/jimmunol.1900496.
- Trickett, A. and Kwan, Y. L. (2003) 'T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads', *Journal of Immunological Methods*, 275, pp. 251–255. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00010-3.
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W. and Workman, C. J. (2008) 'How regulatory T cells

work', *Nature Reviews Immunology*, 8(7), pp. 523–532. doi: 10.1038/nri2343.How.

Waite, J. C. *et al.* (2020) 'Tumor-targeted CD28 bispecific antibodies enhance the antitumor efficacy of PD-1 immunotherapy', *Science Translational Medicine*, 12. doi: 10.1126/scitranslmed.aba2325.

Waldman, A. D., Fritz, J. M. and Lenardo, M. J. (2020) 'A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice', *Nature Reviews Immunology*, 20(11), pp. 651–668. doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.

Wondimu, A. *et al.* (2014) 'Gangliosides drive the tumor infiltration and function of myeloid-derived suppressor cells', *Cancer Research*, 74(19), pp. 5449–57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0927.

Wu, A. A. *et al.* (2015) 'Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells', *Oncot Immunology*, 4(7). doi: 10.1080/2162402X.2015.1016700.

Xu, H. *et al.* (2015) 'Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using bispecific humanized antibody', *Cancer Immunology Research*, 3(3), pp. 266–277. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0230-T.

Yalçın, B., Kremer, L. C. M. and van Dalen, E. C. (2015) 'High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10). doi: 10.1002/14651858.CD006301.pub4.

Yanik, G. A. *et al.* (2013) 'Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the children's oncology group', *Journal of Nuclear Medicine*, 54(4), pp. 541–548. doi: 10.2967/jnumed.112.112334.

Yankelevich, M. *et al.* (2012) 'Anti-CD3 T x anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets', *Pediatric Blood and Cancer*, 59(7). doi: 10.1002/pbc.24237.

Yu, A. L. *et al.* (1998) 'Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and

osteosarcoma', *Journal of Clinical Oncology*, 16(6), pp. 2169–2180. doi: 10.1200/JCO.1998.16.6.2169.

Yu, A. L. *et al.* (2010) 'Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma', *New England Journal of Medicine*, 363(14), pp. 1324–1334. doi: 10.1056/NEJMoa0911123.

Yu, J. *et al.* (2020) 'Targeting glycosphingolipids for cancer immunotherapy', *FEBS Letters*. doi: 10.1002/1873-3468.13917.

Yu, L. and Wang, J. (2019) 'T cell-redirecting bispecific antibodies in cancer immunotherapy: recent advances', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, pp. 941–956. doi: 10.1007/s00432-019-02867-6.

Yvon, E. *et al.* (2009) 'Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells', *Clinical Cancer Research*, 15(18). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3163.

Zenarruzabeitia, O. *et al.* (2017) 'Natural killer cells to the attack: Combination therapy against neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*, 23(3), pp. 615–617. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2478.

Zeng, Y. *et al.* (2005) 'Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice', *Molecular Immunology*, 42, pp. 1311–1319. doi: 10.1016/j.molimm.2004.12.018.

Zhuo, D., Li, X. and Guan, F. (2018) 'Biological roles of aberrantly expressed glycosphingolipids and related enzymes in human cancer development and progression', *Frontiers in Physiology*, 9(466). doi: 10.3389/fphys.2018.00466.

Zobel, M. J. *et al.* (2020) 'Initiation of immunotherapy with activated natural killer cells and anti- -GD2 antibody dinutuximab prior to resection of primary neuroblastoma prolongs survival in mice', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8. doi: 10.1136/jitc-2020-001560.

## 8 Danksagung

Im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation habe ich von vielen Seiten Unterstützung erfahren und möchte mich dafür ganz herzlich bedanken. Zum einen bei meiner Mitdotorandin Nadia Paasburg; nicht nur für früh morgendliche Blutentnahmen und die Übernahme nächtlicher Messungen im Labor. Sondern insbesondere für eine, so denke ich, außergewöhnlich gute, enge und freundschaftliche Zusammenarbeit. Ich hätte mir keine bessere Partnerin im Labor und in der Zeit danach wünschen können. Außerdem bei Laia Pagerols-Raluy, Magda Trochimiuk und Birgit Appl für ihre Geduld mit einer unerfahrenen Medizinstudentin im Labor. Ich habe in dieser Zeit unglaublich viel gelernt, Frustrationstoleranz aufgebaut und doch auch noch Spaß dabeigehabt. Bei Patrick Schlegel für seinen fachlichen Rat, selbst aus größter Ferne. Ohne seine Expertise wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Und bei Michael Böttcher, dem Betreuer meiner Arbeit, für sein beharrliches Nachfragen, wenn wieder Monate ins Land gegangen waren.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freund:innen für ihre emotionale Unterstützung auf diesem (langen) Weg. Insbesondere in Zeiten in denen ich an die Fertigstellung nicht mehr ganz glauben konnte. Besonders außerdem meiner Mutter, Antonia Ibel und Marieke Sander für das teils fachfremde Korrekturlesen dieser Arbeit.

## **9 Lebenslauf**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: .....