

# **Diplomarbeit**

Vorversuche zur Herstellung von CAR-T-Zellen in einem geschlossenen System & Evaluierung des Endprodukts hinsichtlich Zellzahl, immunologischen Parametern und Transduktionseffizienz bei CD19+ ALL

eingereicht von

**Michael Eker**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger**

**Univ.-Ass. Priv.-Doz. Dr. Daniela Ingrid Sperl**

Gießen, den 11.05.2020

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Gießen, den 11.05.2020*

*Michael Eker eh.*



## **Vorwort**

Prof. Schwinger hat das Projekt „Individueller Heilversuch bei einem Kind mit therapierefraktärer akuter lymphoblastischer Leukämie“ bei der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz am 12.06.2017 eingereicht und am 10.07.2017 vorgestellt.

Die Entscheidung der Ethikkommission vom 13.07.2017 lautet: „Es bestehen keine Bedenken gegen die Durchführung des Heilversuchs.“

## Danksagungen

An aller erster Stelle möchte ich meiner Mutter von ganzen Herzen danken, die das Studium in Graz ermöglicht und gefördert hat. Sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite und bin Ihr dafür auf ewig dankbar.

Großer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger für die nette und geduldige Betreuung meiner Diplomarbeit sowie Andrea Raicht für die tatkräftige Unterstützung bei der Datenerfassung bzw. Datendarstellung.

Ich bin dankbar für meine Geschwister Eva Maria und Daniel, die immer an mich geglaubt haben und für mich da waren, wenn ich sie brauchte.

Ich danke auch meinen neu dazugewonnen Freunden Andreas, Dennis, Elisabeth, Feyza und Sebastian, mit denen ich mein Studium bestritten habe und neue Erfahrungen sammeln durfte.

Zu guter Letzt bin ich dankbar für meine Ehefrau Christina, die mich stets fordert und motiviert das Beste aus mir rauszuholen.

## Zusammenfassung

In dieser Thesis wird ein neuer Ansatz für die Therapie der CD19 positiven akuten lymphatischen/lymphoblastischen Leukämie thematisiert. Die CAR -T-Zell Therapie richtet sich an PatientInnen, die therapierefraktäre Rückfälle der Leukämie erlitten haben und bei denen alle erfolgversprechenden therapeutischen Maßnahmen ausgeschöpft sind. Dadurch bietet man mit konventionellen Methoden unheilbaren PatientInnen nicht nur eine neue Therapieoption, sondern vor allem einen kurativen Ansatz an. Voraussetzung für neue Therapien wie die CAR-T-Zell Therapie ist das erweiterte Verständnis über Tumore in Wechselwirkung mit dem Immunsystem. Die Tumorummunologie hat viele Immuntherapien hervorgebracht, darunter die CAR-T-Zell Therapie. Bei CD19 CAR-T-Zellen handelt es sich um chimäre Antigenrezeptor T-Zellen, deren Rezeptoren diejenigen Leukämiezellen erkennen, welche das Antigen CD19 tragen und zerstören. Die T-Zellen werden vom Patienten / von der Patientin durch Leukapherese und Selektion gewonnen. Sie werden mittels eines lentiviralen Vektors in-vitro mit dem Rezeptor ausgestattet. Nachdem die genetisch veränderten T-Zellen den Rezeptor exprimieren, werden sie expandiert und dem Patienten / der Patientin reinfundiert. Bevor diese Therapie angeboten werden kann, müssen entsprechende Vorversuche stattfinden, die mit Hilfe eines geschlossenen Systems in einem GMP-Labor realisiert werden können. Das Endprodukt, also die CAR-T-Zellen, müssen hinsichtlich verschiedener Parameter überprüft werden. Diese Qualitätskontrolle umfasst die durchflusszytometrische Analyse der Zellen, um die Konzentration von CD3 positiven T-Lymphozyten und deren Vitalität zu bestimmen. Die Feststellung der Transduktionseffizienz von CD19 CAR transduzierter T-Zellen, sowie die Kopienanzahl des integrierten lentiviralen Vektors pro transduzierter Zelle werden durch entsprechende Messungen erfasst. Zusätzlich muss die Kontamination durch Mikroorganismen und deren Toxine ausgeschlossen sein, um es als Wirkstoff verabreichen zu können. Die Ergebnisse dieser Thesis erbringen den Beweis für die Durchführbarkeit einer solchen Therapie am Landeskrankenhaus Universitätsklinikum Graz.

## **Abstract**

This thesis is about a new approach for the therapy for CD19+ acute lymphoblastic leukemia. The CAR T cell therapy focusses on patients who suffered from therapy refractory relapses to treatment und whose therapeutic steps have been exhausted. In order to perform new therapies like the CAR T cell therapy, advanced knowledge about the interaction between tumors and the immune system is essential. The tumorimmunity created the foundation for many immuntherapies including the CAR T cell therapy. CAR T cells are chimeric antigen receptor T cells whose receptors recognize leukemic cells which carry the antigen CD19 on their surface and destroy these leukemic cells. T cells are gathered from the patients through leukapheresis and selection. These T cells are equipped with the help of lentiviral vectors in-vitro. After the genetic modified T-cells have expressed the receptor, the T cells are selected and reinfused into the patients' blood. Before such a therapy can be offered, pre-tests with an automated and closed, single-use tubing system have to be performed; these tests should also be possible in a GMP-laboratory. The end product, i.e. the CAR T cells, have to be tested for different parameters. This quality control encompasses flow cytometric analysis of the cells which were selected in order to determine the concentration of CD3+ T lymphocytes and their vibrancy. The measurements of the transduction efficiency of CD19 CAR T cells plus the vector copy number of the integrated lentiviral vector per transduced cell are captured. Additionally, a contamination by microorganisms and their toxins has to be excluded in order to administer these cells as a medical drug.

The results of this thesis render the evidence of the feasibility of a clinically T-cell engineering process at the Landeskrankenhaus Universitätsklinikum Graz.

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	iii
Danksagungen.....	iv
Zusammenfassung.....	v
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis.....	vii
Glossar und Abkürzungen.....	xi
Tabellenverzeichnis.....	xv
Abbildungsverzeichnis.....	xvi
Diagrammverzeichnis.....	xvii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Die Immunantwort.....	2
1.3 Bestandteile des Immunsystems.....	3
1.3.1 Das Knochenmark.....	4
1.3.2 Zellen des angeborenen Immunsystems.....	5
1.3.3 Prinzipien der angeborenen Immunität.....	7
1.3.4 Zellen des adaptiven Immunsystem.....	9
1.3.5 Prinzipien des adaptiven Immunsystems.....	13
1.4 Tumormunität.....	14
1.4.1 Erkennen von Tumorzellen.....	15
1.4.2 Tumorabwehrmechanismen.....	16
1.4.3 Tumorstadium trotz Immunsystem.....	17
1.5 Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	19
1.5.1 Überblick.....	19
1.5.2 Klassifikation.....	20
1.5.3 Diagnostik.....	21
1.5.4 Therapie.....	22
1.6 Immuntherapie.....	23
1.6.1 Zytokine.....	23
1.6.2 Immunadjuvantien.....	24
1.6.3 Von Immunprophylaxe bis Tumorstadium.....	25

1.6.4	Antikörpertherapie .....	26
1.6.5	Knochenmarkstransplantation (KMT) .....	29
1.7	Adaptive T-Zell Therapie .....	30
1.7.1	CAR T-Zellen .....	31
1.7.2	Aufbau & Entwicklung des CAR.....	33
1.7.3	CD19+ CAR.....	35
1.7.4	Nebenwirkungen.....	38
1.7.5	Zukunftsaussichten.....	39
2	Material und Methoden.....	42
2.1	T-Zell Transduktion .....	42
2.1.1	CliniMACS Prodigy®.....	42
2.1.2	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 0.....	43
2.1.3	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 1.....	46
2.1.4	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 2.....	47
2.1.5	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 3.....	47
2.1.6	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 5.....	47
2.1.7	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 9.....	47
2.1.8	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 10.....	47
2.1.9	Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 12.....	48
2.2	Qualitätskontrolle: Durchflusszytometrie .....	49
2.2.1	Vorbereitung der Reagenzien.....	51
2.2.2	Durchführung der Zellpräparation.....	51
2.2.3	Gating Strategie.....	52
2.2.4	Auswertung.....	53
2.3	Qualitätskontrolle: Mikrobiologie .....	53
2.3.1	Inokulation .....	54
2.3.2	Inkubation .....	54
2.4	Qualitätskontrolle: Endotoxin-Testung.....	54
2.5	Qualitätskontrolle: Mykoplasmen-Nachweis.....	55
2.5.1	DNA-Extraktion .....	57
2.5.2	PCR .....	57
2.5.3	Auswertung.....	58
2.6	Qualitätskontrolle: Vector Copy Number (VCN) .....	59
2.6.1	DNA-Extraktion .....	59

2.6.2	PCR.....	60
2.6.3	Auswertung.....	62
3	Ergebnisse .....	63
3.1	Zellzahl, Vitalität, zelluläre Zusammensetzung und Transduktionseffizienz 64	
3.1.1	Etablierung .....	65
3.1.2	Zellzahl .....	67
3.1.3	Vitalität.....	68
3.1.4	Zelluläre Zusammensetzung .....	69
3.1.5	Transduktionseffizienz .....	73
3.2	Qualitätskontrolle: Mikrobiologische Analyse .....	74
3.3	Qualitätskontrolle: Endotoxintestung.....	75
3.4	Qualitätskontrolle: Mycoplasmen-Nachweis.....	76
3.5	Qualitätskontrolle: VCN (Vektor Copy Number) .....	78
4	Diskussion.....	80
5	Literaturverzeichnis .....	82



## Glossar und Abkürzungen

7-AAD	7 Amino Actinomycin D
A.dest	Destilliertes Wasser
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AIRE	Autoimmun-Regulator
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APC- Vio770	Allophycocyanin-Vio770 tandem fluorochrome conjugate
APZ	Antigenpräsentierenden Zellen
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BCR	B-Zell Rezeptor
BiTE	Bi-specific T-cell engagers
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BHQ	Black Hole Quencher
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
CHOP	<u>C</u> yclophosphamid, <u>H</u> ydroxydaunorubicin, <u>O</u> ncovin®, <u>P</u> rednisolon
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoALL	Co-operative study group for childhood acute lymphoblastic leukemia
CP	Crossing Point
CFU	colony forming unit
CRES	CAR-T cell-related encephalopathy syndrome
CRS	Cytokine Releasing Syndrome
CSF	colony stimulating factors
CTC	cytotoxic T cell
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DIN	Donor Identification Number

DLI	Donorlymphozyteninfusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EST	Esterase
EU	Endotoxin units
FAB	French American British
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fas	factor receptor superfamily
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward scatter
gag	Group-specific antigen (Name eines retroviralen Gens)
GMP	Good Manufacturing Practice
GUI	Graphical User Interface
GVHD	Graft-versus-host- disease
GVL	Graft-versus -Leukämie
HA	Humanalbumin
HEC	Heat Exchange Cartridge
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPV	Humanen Papillomvirus
HSA	Humanes Serumalbumin
HSC	haematopoietic stem cell
ID	Identität
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPC	In-process control
JOE	6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'dimethoxy fluorescein
KK/HO	Univ. Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Abteilung für Pädiatrische Hämato/Onkologie
KMT	Knochenmarkstransplantation
L/N	Lot number
LAF	Laminar Air Flow
LAK	Lymphokin-aktivierten Killerzellen
LDH	Laktat-Dehydrogenase

mAb	monoclonal antibody
MAC	Membrane Attack Complex
MACS	Magnetic Cell Separation
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	major histocompatibility complex
MRD	minimal residual disease
N/A	Not applicable
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	No Template Control
P/N	Part number
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PE	Phycoerythrin
PEB	1X PBS / 1 mM EDTA / 0,5 % BSA
PE-Vio770	Phycoerythrin-Vio770 tandem fluorochrome conjugate
pLTG	Plasmid Nomenklatur von Lentigen Technology Inc.
POX	Peroxidase
PTBP2	Polypyrimidine tract binding protein 2 (Name eines humanen Gens)
QC	Quality Control
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RBC	Red Blood Cells
Rec	Recombinant
Reg.	regulatorisch
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
Rxn	Reactions
sog.	sogenannt
SOP	Standard Operating Procedure

SP	Saure Phosphatase
SSC	Side scatter
TCR	T-cell receptor
TCT	T Cell Transduction
Th <sub>2</sub>	T-Helferzelle
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TRUCK	T cell redirected for universal cytokine-mediated killing
TS	Tubing Set
TSCD	Terumo Sterile Connecting Device
u.a.	Unter anderem
UBT	Univ. Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin
UCART	universelle CAR T-Zellen
v.a.	vor allem
VCN	Vector Copy Number
VGEF	Vascular endothelial growth factor
WBC	White Blood Cells
z.B.	Zum Beispiel
ZMF	Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Med Uni Graz
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der aeroben Blutkulturen.....	75
Tabelle 2: Ergebnisse der anaeroben Blutkulturen.....	75
Tabelle 3: Ergebnisse der Endotoxinanalysen .....	76
Tabelle 4: Beispiel für die Bewertung der Mycoplasmen-RealTime PCR der T-Zell Transduktion Nr. 2 anhand der Akzeptanzkriterien des Herstellers Roche. ....	77
Tabelle 5: Mykoplasmen .....	78
Tabelle 6: Beispiel für die Bewertung der RealTime PCR für die Vector Copy Number der T-Zell Transduktion Nr. 3 anhand der Akzeptanzkriterien der Fa. Miltenyi Biotec GmbH.....	79
Tabelle 7:Ergebnisse der Vector Copy Number-Analysen .....	79

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Krebs bei Kindern .....	20
Abbildung 2 Neuerkrankung ALL.....	20
Abbildung 3: CAR-T-Zell Therapie .....	32
Abbildung 4: CAR Generationen .....	35
Abbildung 5: CliniMACS Prodigy™ mit Tubing Set .....	43
Abbildung 6: Tubing Set für den CliniMACS Prodigy™ .....	45
Abbildung 7: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 1) .....	63
Abbildung 8: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 2) .....	64
Abbildung 9: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 3) .....	64
Abbildung 10: Scatter Plot aller CD45+Leukozyten am Tag 12.....	68
Abbildung 11: Beispiel für die RealTime PCR für Mycoplasmen .....	76
Abbildung 12: Beispiel für die RealTime PCR für die Recovery Control.....	77

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Vergleich der Ergebnisse von 3 Proben nach Messung und Analyse mit zwei Durchflusszytometern.....	65
Diagramm 2: Vergleich der Ergebnisse von 3 Proben nach Dual Platform Analyse und Single Platform Analyse.....	66
Diagramm 3: Leukozytenanzahl (CD45+ Zellen) im Apheresat, im Selektionat, an Tag 0, 5 und 12. ....	67
Diagramm 4: Vitalität der Zellen im Apheresat, während des Prozesses und im Endprodukt gemessen mit 7-AAD .....	68
Diagramm 5: Absolute Anzahl an CD3+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur .....	69
Diagramm 6: Absolute Anzahl an CD3+/4+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur .....	70
Diagramm 7: Absolute Anzahl an CD3+/8+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur .....	70
Diagramm 8: : CD3+/56+ NKT-Zellen im Ausgangsmaterial, während des Prozesses und im Endprodukt.....	71
Diagramm 9: Absolute Anzahl an CD19+ B-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur .....	71
Diagramm 10: Absolute Anzahl an CD14+ Monozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur .....	72
Diagramm 11: Absolute Anzahl an CD19 CAR+/CD3+ T-Lymphozyten im Verlauf der Kultur.....	72
Diagramm 12: Scatter Plots zur Analyse der Transduktionseffizienz .....	73
Diagramm 13: Transduktionseffizienz an Tag 5 und 12 der Expansionskultur .....	74

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Abwehr von Parasiten, krankheitsauslösenden Mikroorganismen und spezifisch genetisch veränderten Zellen (virusinfiziert oder Tumorzellen), indem es eigene Zellen bzw. Moleküle (Antigene) von fremden unterscheiden kann. Daraus resultiert die Elimination von fremden und die Toleranz eigener Zellen. Das Immunsystem besteht aus Immunzellen und dem lymphatischen Gewebe, beide Systeme sind im gesamten Organismus verteilt zu finden und unterliegen somit im Gegensatz zu anderen Organen keinen anatomischen Grenzen. Dieses System ist geprägt von großer Dynamik, in der Zellteilung und Zelltod, Migration von Immunzellen in und aus dem Gewebe stattfindet, damit fremde/entartete Zellen und Mikroorganismen vom Wachsen bzw. Eindringen in den menschlichen Körper abgehalten werden können. So wird die Integrität des Körpers aufrechterhalten. Es ergibt sich ein komplexes Gebilde, da es einerseits von der Kommunikation der Immunzellen untereinander und andererseits auch vom Zusammenspiel mit dem Hormon- und Nervensystem geprägt ist.

Das lymphatische Gewebe wird in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilt. In den primären lymphatischen Organen, Knochenmark und Thymusdrüse werden aus den Vorläuferzellen - den Stammzellen - die reifen Immunzellen gebildet. Hier finden also die Bildung und Reifung der immunologisch kompetenten Zellen statt. In den sekundären lymphatischen Organen, den Lymphknoten mit Lymphgefäßen, der Milz und mukosaassoziiertem lymphatischem Gewebe (mucosa-associated lymphatic tissue, kurz MALT) siedeln sich die Immunzellen an. Sie zirkulieren im Blut und wandern in jegliches Gewebe ein. Lymphozyten werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) in der Peripherie über Antigenkontakte informiert und können so auf potentielle Gefahren reagieren (Ferencík, Rovensky et al. 2006 S. 15-19, Schütt, Bröker 2011 S. 2).

## **1.2 Die Immunantwort**

Als Immunantwort bezeichnet man die Reaktion des Immunsystems auf Antigene. Das Immunsystem wird in ein angeborenes, unspezifisches bzw. natürliches und in ein erworbenes bzw. adaptives Immunsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem wirkt unspezifisch, d.h. es wirkt generell gegen jegliche fremden Antigene. Die Immunantwort des adaptiven Immunsystems richtet sich dagegen spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen. Die Immunantwort kann sich auf zwei Wegen manifestieren, zum einen humoral z.B. in Form von Antikörperbildung und Freisetzung von Zytokinen und zum anderen zellulär durch direkte zytotoxische Reaktion der beteiligten Lymphozyten.

Pathologisch ist eine Immunantwort, wenn sie gegen körpereigene Oberflächenantigene (Autoantigene) gerichtet ist, wodurch eine Verletzung des eigenen Gewebes entsteht. Die immunologische Überwachung, die sogenannte immunologische Surveillance, dient dem Schutz der Verbreitung von funktionslosen oder geschädigten bis hin zu malignen Zellen. Immunität entsteht bei erfolgreicher Abwehr von Viren, Bakterien und Parasiten. Das Ergebnis einer Immunantwort ist das immunologische Gedächtnis. Es ist dadurch charakterisiert, dass Antigene, mit denen Immunzellen bereits in Kontakt gekommen sind, von diesen in einem immunologischen Gedächtnis behalten werden, um bei erneutem Kontakt mit solchen Antigenen mit einer rascheren und präziseren Immunantwort reagieren zu können. Eine weitere Eigenschaft des Immunsystems ist seine Spezifität. Das bedeutet, dass die Immunantwort nur gegen einen kleinen Teil, nämlich gegen das Epitop/ Hapten des Antigens hervorgerufen wird. Der Antikörper reagiert also nur spezifisch gegen das Epitop. Die Diversität spiegelt die Anpassungsfähigkeit des Immunsystems wider und hat die Eigenschaft, dass es gegen viele Millionen verschiedene Antigene eine Immunantwort auslösen kann (Ferencík, Rovensky et al. 2006 S. 43-44).

Um eigene Antigene von fremden zu unterscheiden, gibt es Hauptgewebeverträglichkeitskomplexe (engl. MHC – Major Histocompatibility Complex), die sich auf der Oberfläche der Zellen befinden. MHC-Moleküle sind Glykoproteine und sind spezifisch für jede Art von vielzelligen Lebewesen. Darüber hinaus sind sie individuell, d.h. der Komplex ist von Mensch zu Mensch

verschieden zusammengesetzt und somit einzigartig. Beim Menschen werden sie auch humane Leukozytenantigene (HLA) genannt. Es gibt hierbei verschiedene Klassen von HLA/MHC, aber alle besitzen eine Peptidbindungsfurche auf denen Peptide präsentiert werden. MHC-Klasse-I Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden und besitzen eine Bindungsstelle für den CD8-Rezeptor auf CD8+ T-Zellen. Das MHC-I-Molekül bindet zytoplasmatische, also eigene/endogene, Antigene oder im Falle einer virusinfizierten Zelle, virale Antigene und präsentiert diese. Auch wenn eine Zelle entartet, können Peptide aus dem Abbau von mutierten, neu gebildeten Tumorproteinen (Tumorantigene) von MHC-I-Molekül gebunden werden. Mit diesen Komplexen weisen sich also die Zellen aus und bestätigen ihre Herkunft, damit das Immunsystem diese Zellen nicht angreift, sofern sie nicht infiziert oder entartet sind. Zusätzlich gibt es noch die MHC-Klasse-II Moleküle, die sich auf den Zellen des Immunsystems befinden, vor allem auf den antigenpräsentierenden Zellen. Diese besitzen eine Bindungsstelle für den CD4-Rezeptor auf T-Helferzellen. Die APZs verarbeiten exogen aufgenommene, aber auch fremde Antigene (z.B. von Bakterien) und bereiten sie den CD4+ T-Zellen auf, damit diese im Bedarf eine Immunantwort auslösen können. Eine dritte Variante wird hauptsächlich bei dendritischen Zellen beobachtet und ist unter dem Begriff „Kreuzpräsentation“ bekannt. Dabei werden exogene Antigene, die normalerweise auf MHC-Klasse-II Molekülen präsentiert werden, auf MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert, damit CD8+ T-Zellen aktiviert und rekrutiert werden können (Ferencík, Rovensky et al. 2006 S. 37-42, Neumann 2008 S. 72-78, Schütt, Bröker 2011 S. 24-27).

### **1.3 Bestandteile des Immunsystems**

Die Zellen des Immunsystems entwickeln sich aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle. Diese verfügt über die Eigenschaften sich selbst zu erneuern, also eine symmetrische Teilung durchzuführen oder sich asymmetrisch zu teilen und eine Vorläuferzelle zu werden. Die hämatopoetische Stammzelle differenziert sich unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie Zytokinen und Interleukinen in zwei oligopotente Linien, der myeloischen Stamm- oder Vorläuferzelle und der lymphatischen Stamm-/Vorläuferzelle.

Aus der myeloischen Stammzelle entstehen unter Einfluss von Koloniestimulierenden Faktoren (engl. CSF – colony stimulating factor) über jeweilige Zwischenstufen, sogenannten Kolonie-bildenden Einheiten (engl. CFU - colony forming unit), Erythrozyten und Thrombozyten, die beide nicht zum Immunsystem gezählt werden, aber eine unterstützende Funktion haben. Daneben entstehen aus der myeloischen Vorläuferzelle die weitere Subpopulationen aufweisenden Granulozyten, die Monozyten, die sich sobald sie ins Gewebe eingewandert sind zu Gewebsmakrophagen differenzieren und die durch ihre Zellfortsätze charakteristischen dendritischen Zellen.

Aus der lymphatischen Linie gehen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Lymphozyten hervor. Wie ihr Name bereits verrät, können die NK-Zellen andere Zellen in die Apoptose zwingen. Die Lymphozyten werden in B- und T-Zellen unterteilt, die wiederum Subpopulationen aufweisen. Sie spielen eine große Rolle bei der adaptiven Immunabwehr. Auch aus der lymphatischen Vorläuferzelle entstehen dendritische Zellen.

Immunzellen exprimieren je nach Aktivierungs- oder Differenzierungszustand Oberflächenmoleküle, die für jede Immunzelle charakteristisch sind. Diese CD- (Cluster of differentiation) Moleküle trennen sogar Subpopulationen einer Art voneinander. So kann z.B. die CD4+ T-Helferzelle von der CD8+ zytotoxischen T-Zelle unterschieden werden. Das erlaubt die diagnostische Differenzierung bei klinisch relevanten Fragestellungen (Schütt, Bröker 2011 S. 4).

### **1.3.1 Das Knochenmark**

Die Bildung der Leukozyten geht von der hämatopoetischen Stammzelle (engl. hematopoietic stem cell – HSC) aus und wird Hämatopoese genannt. Das rote Knochenmark besteht aus einem schwammartigen retikulären Gerüst innerhalb der Knochen trabekel. Das Gerüst wird von sinusoiden Blutgefäßen eingenommen. Anliegend an die Blutgefäße befinden sich Progenitorzellen verschiedener Stadien und Fettzellen. Die Vorläuferzellen differenzieren sich und migrieren durch die Sinuside in den Blutkreislauf. Die HSC ist multipotent und fähig sich in alle

Leukozyten zu entwickeln. Die bereits erwähnte Eigenschaft, dass sich die HSC selbst erneuern kann, indem sie sich teilt, lässt es zu, dass zumindest eine Zelle die Multipotenz behält, während die andere sich weiter differenziert. Die HSC ist durch Oberflächenmarker, Proteine wie CD34 und c-kit gekennzeichnet. HSCs befinden sich in Stammzellnischen, wo sie von Stromazellen durch kontakt-abhängige Signale und Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine (CSF) zum Teilen angeregt werden. Stromazellen stellen auch sicher, dass das lokale Milieu für die Hämatopoese optimal ist. Neben den Stromazellen können auch aktivierte T-Lymphozyten die Hämatopoese stimulieren, damit Leukozyten ersetzt werden, die bei einer Abwehrreaktion untergegangen sind (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 28).

### **1.3.2 Zellen des angeborenen Immunsystems**

#### **1.3.2.1 Monozyten und Makrophagen**

Aus der myeloischen Vorläuferzelle entsteht unter Einfluss von GM-CSF und M-CSF (Granulozyten-Makrophagen CSF und Monozyten CSF) die CFU-GM (CFU - Granulozyten und Monozyten), woraus sich im Rahmen der Monozytopoese die Monozyten bilden, die vom Knochenmark ins Blut gelangen. Diese zirkulieren im Blut bevor sie über Chemotaxis ins Gewebe migrieren. Dort differenzieren sie je nach Gewebe in bestimmte Makrophagen und können sich amöboid fortbewegen. Monozyten differenzieren in der Leber zu Kupffer'schen Sternzellen, im Gehirn zu Mikrogliazellen, in der Lunge zu Alveolarmakrophagen usw. Ebenfalls migrieren sie auch in entzündetes Gewebe, indem Endothelzellen die Migration durch Adhäsion an Oberflächenmoleküle begünstigen bzw. den Monozyten so angezeigt wird, an welchem Ort eine Entzündung stattfindet. Über bestimmte Rezeptoren erkennen und nehmen Makrophagen Krankheitserreger in Phagosomen auf (Phagozytose). Die Fusion von Phagosomen mit dem Lysosom zum Phagolysosom ermöglicht die Abtötung der Erreger, welche dann über MHC-Komplexe auf der Oberfläche präsentiert werden können. Neben dieser Art der Rekrutierung von Lymphozyten können auch über die Ausschüttung von Zytokinen andere Leukozyten angelockt werden, um die Immunreaktion zu verstärken. Außerdem können Makrophagen Stickstoffmonoxid (NO) herstellen, welches zytotoxisch wirkt und so Krankheitserreger abtötet, aber auch Schaden am

umliegenden Gewebe verursacht. Makrophagen spielen somit eine initiale Rolle bei der Immunabwehr (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 15-17).

### **1.3.2.2 Dendritische Zellen**

Auch dendritische Zellen gliedern sich in Untergruppen. Die interdigitierende dendritische Zelle wandert aus dem Blut in sämtliche Gewebe und bildet im Gewebe angekommen erst ihre charakteristischen Zellfortsätze aus. Mit Hilfe dieser Verästelungen bildet sich ein Netzwerk, mit dem dendritische Zellen Substanzen über Mikropinozytose aufnehmen und so die Umgebung überwachen können. Sobald eine fremde Substanz (Proteine oder Mikroorganismen) aufgenommen wird, wandert die dendritische Zelle wieder aus dem Gewebe über das Lymphgefäß in den nächsten Lymphknoten ein und präsentiert den Lymphozyten über den MHC-Komplex das fremde Antigen. Sie bilden somit die Brücke zwischen angeborenem Immunsystem und erworbener Immunität. Die folliculären dendritischen Zellen befinden sich direkt im Lymphknoten und nehmen hier als Netzwerk im Lymphstrom fremde Antigene auf, die sie den Lymphozyten präsentieren. Es handelt sich hierbei also um fremde Proteine oder Mikroorganismen, die es bereits geschafft haben, vom Gewebe in die Lymphbahn zu gelangen (Schütt, Bröker 2011 S. 3).

### **1.3.2.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

NK-Zellen erkennen Tumorzellen, virusinfizierte Zellen und durch Antikörper markierte Zellen und lösen einen kontrollierten Zelltod aus (Apoptose). Sobald diese Zellen durch Rezeptoren erkannt worden sind, wird die Effektor Funktion mediiert. Es können aktivierende und hemmende Signale wahrgenommen werden. Sobald neben dem aktivierenden Rezeptor auch der inhibierende Rezeptor gebunden wird, löst die NK-Zelle keine Apoptose aus, weil auf dem MHC-1-Komplex körpereigene Antigene präsentiert werden, die inhibierend wirken. Wenn jedoch der MHC-Komplex gänzlich fehlt, wie es häufig bei virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen der Fall ist, wird die Zelle zerstört. Ebenso geschieht es bei gestressten Zellen, die mehr aktivierende Liganden auf der Oberfläche exprimieren als inhibierende MHC-1-Komplexe. So können gesunde von kranken Zellen unterschieden werden (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 27).

### 1.3.3 Prinzipien der angeborenen Immunität

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Mechanismen, die von physischen (Haut und Schleimhaut) und chemischen (antimikrobielle Moleküle wie z.B. Defensine) Barrieren über Blutproteine (u.a. Komplementsystem) bis hin zur zellulären Abwehrmechanismen (Phagozyten, NK-Zellen etc.) reichen. Die Haut und die Schleimhaut verhindern das Eintreten von Mikroorganismen, indem die Zellen starke Verbindungen zueinander aufbauen, sog. tight junctions.

Keratozyten bauen die äußerste Schicht der Epidermis auf, welche verhindert, dass Mikroorganismen tiefere Schichten der Haut erreichen können. Unter chemischen Barrieren versteht man z.B. Muzine (Glycoproteine) und Defensine (kleine Peptide). Muzine fangen auf der Schleimhaut im Atem-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt verschiedene Mikroorganismen auf, bevor sie die Epithelien erreichen. Defensine werden von Epithelzellen produziert und töten die Mikroorganismen ab. Andere antimikrobielle Substanzen, die unter anderem von kommensalen Keimen produziert werden, unterstützen die Abwehr von pathogenen Keimen. So kann man auch Mikroorganismen, die ständig auf unserer Haut leben, als eine Art Abwehrmechanismus bezeichnen. Wenn diese Abwehrmechanismen jedoch überwunden werden, sind im Gewebe bereits Phagozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und NK-Zellen vorhanden, die sofortige Abwehr initiieren.

Die Immunantwort kann schnell erfolgen, weil die Rezeptoren der Immunzellen zwar nicht spezifisch auf einen bestimmten Krankheitserreger reagieren, aber geeignete Strukturen erkennen, die Gruppen von Krankheitserreger gemein haben. Diese Strukturen nennt man pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Verschiedene Mikroorganismen exprimieren unterschiedliche PAMPs, sodass die Immunzellen Viren, Bakterien (Gram-positiv oder -negativ) und Pilze erkennen können. Ein Beispiel hierfür sind Lipopolysaccharide, die Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien sind. Das angeborene Immunsystem erkennt auch fremde Moleküle, die von Mikroorganismen selbst produziert werden oder von geschädigten bzw. zerstörten Zellen freigesetzt werden. Diese Moleküle nennt man damage-associated molecular patterns (DAMPs). Diese Moleküle lösen eine Immunantwort aus. Sowohl DAMPs als auch PAMPs werden von pattern

recognition receptors (PRRs) auf Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Ein Beispiel für PRRs sind die Toll-like receptors (TLRs), von denen es mehrere gibt. Sobald DAMPs oder PAMPs von PRRs gebunden worden sind, wird eine Signaltransduktion in der Zelle in Gang gesetzt, die das Portfolio der jeweiligen Zelle an antimikrobieller und proinflammatorischer Funktion hochfährt.

In erster Linie kommen Phagozyten, also Makrophagen, aber vor allem auch neutrophile Granulozyten zur Verteidigung gegen eingedrungene Krankheitserreger zum Einsatz. Makrophagen, die auch Wächterzellen genannt werden, sind stets im Gewebe präsent, während Neutrophile durch Signale von Makrophagen zu infiziertem Gewebe gerufen werden. Die Zytokine TNF, IL-1, IL-6 und Chemokine wirken auf unterschiedlichen Arten. Durch ihre Wirkung auf Endothelzellen wird die Migration von Neutrophilen durch Ausbildung von Adhäsionsmolekülen erleichtert (Diapedese). Des Weiteren wird das Knochenmark stimuliert mehr Immunzellen zu produzieren. Makrophagen und Neutrophile haben als Hauptaufgabe Krankheitserreger über PRRs zu phagozytieren und somit unschädlich zu machen. Die Vesikel, die Mikroben beinhalten, verschmelzen mit Lysosomen, in denen ROS und proteolytische Enzyme gespeichert sind, welche die Mikroben abtöten. NK-Zellen töten infizierte (intrazelluläre Bakterien oder Viren) bzw. geschädigte Zellen und produzieren IFN- $\gamma$ , wodurch Makrophagen aktiviert werden, Mikroben zu töten. Daneben sekretieren sie Enzyme wie Perforin, um die Zellmembran der Zielzelle zu öffnen, damit proteolytische Enzyme in das Zytoplasma hineinströmen können. Dadurch wird eine Apoptose der Zielzelle ausgelöst. Dendritische Zellen erkennen durch ihre zahlreichen PRRs effektiv und schnell Mikroben und lösen durch Sekretion von Zytokinen eine Entzündungsreaktion aus, um weitere Immunzellen, v.a. Neutrophile, anzulocken. Darüber hinaus wandern Dendritische Zellen in Lymphknoten ein und präsentieren den T-Lymphozyten die Mikroben, wodurch eine adaptive Immunantwort hervorgerufen wird. Hier entsteht der Übergang vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem (Murphy, Weaver 2016 S. 42-44, Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 2-4, 59-63, 72-76).

Neben den Zellrezeptoren gibt es im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten auch lösliche Bestandteile, die DAMPs und PAMPs erkennen, dazu gehört u.a. das

Komplementsystem, der Teil des humoralen Astes des angeborenen Immunsystems. Es besteht aus Plasmaproteinen, die gemeinsam Krankheitserreger für das Immunsystem erkennbar machen, die sog. Opsonierung. Es handelt sich um eine proteolytische Kaskade, wobei inaktivierte Vorläuferenzyme, die ein Krankheitserreger gebunden hat, aktiviert werden, indem ein Teil abgespalten wird, welches das nächste Komplement-Protein aktiviert, das wiederum ein Teil abspaltet, usw. Die opsonierten Mikroben werden von Phagozyten erkannt und abgetötet. Außerdem kann das Komplementsystem einen MAC (membrane attack complex) bilden, welcher sich in die Zellmembran der Mikroben setzt und so die Lyse (Zerfall einer Zelle durch Schädigung der Zellmembran) initiiert (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 79-80).

#### **1.3.4 Zellen des adaptiven Immunsystem**

Die T- und B-Lymphozyten zeichnen sich durch klonale Rezeptoren für spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche aus. Die Rezeptoren auf den einzelnen Zellen unterscheiden sich, sodass viele unterschiedliche Rezeptoren möglichst alle Antigene erkennen können. Sobald ein Rezeptor auf einer Zelle aktiviert worden ist, kommt es zur klonalen Expansion derselben, d.h. es entstehen Klone aus jener Zelle. Diese Vielfalt kommt durch somatische Rekombination zustande, also Umlagerung von Genen während der Entwicklung von T-Zellen im Thymus und B-Zellen im Knochenmark (Schütt, Bröker 2011 S. 3).

##### **1.3.4.1 B-Lymphozyten**

B-Zellen werden im Knochenmark gebildet und wandern, sobald sie ausgereift sind in den Lymphknoten ein. Ist ein spezifisches Antigen durch den B-Zell-Rezeptor (BCR) von einer B-Zelle erkannt worden, kommt es zur klonalen Expansion und zur Differenzierung zu Plasmazellen. Plasmazellen sind die Effektorzellen der B-Zellen und bilden Antikörper, auch Immunglobuline genannt, gegen das von ihnen erkannte Antigen und spiegeln so den humoralen Schenkel des adaptiven Immunsystems wider (Murphy, Weaver 2016 S. 12).

### 1.3.4.2 T-Lymphozyten und T-Zellreifung

Die Produktion der T-Zellen findet im Knochenmark statt. In der Thymusdrüse reifen die T-Lymphozyten heran, wandern wie die B-Lymphozyten in den Lymphknoten ein und liegen dort als naive T-Lymphozyten vor. Sie werden naive genannt, weil sie noch keine Reaktion mit fremden Antigenen eingegangen sind. Es gibt verschiedene Subpopulationen. Eine davon ist die T-Helferzelle, welche die Immunantwort unterstützt, indem sie B-Lymphozyten rekrutiert Antikörper zu produzieren oder Makrophagen hilft phagozytierte Krankheitserreger zu eliminieren. Die zytotoxische T-Zelle tötet virusinfizierte und Tumorzellen ab. Eine besondere Rolle spielt die regulatorische T-Zelle, welche die Aktivität anderer Lymphozyten supprimiert und so eine Immunantwort eindämmen kann, wodurch der Schaden am Gewebe begrenzt und Angriffe auf körpereigene Zellen unterbunden werden (Murphy, Weaver 2016 S. 13, 42-44). Jedoch wurde herausgefunden, dass diese Untergruppe an regulatorischen T-Zellen auch die Tumorabwehr behindern kann. In unmittelbarer Nähe des Tumors werden die reg. T-Zellen vom Tumor beeinflusst. Tumorzellen sekretieren Zytokine oder steuern über Zellkontakte die regulatorischen T-Zellen, so dass die Tumorabwehr eingedämmt wird oder sogar das Tumorstadium unterstützt wird, indem die  $T_{Reg}$  die zytotoxischen T-Zellen hemmen. Das hat man unter anderem bei Tierversuchen nachgewiesen, bei denen die reg. T-Zellen ausgeschaltet worden sind (Yu, P., Fu 2006).

Allgemein werden während der T-Zellreifung im Thymus zunächst T-Vorläuferzellen aussortiert, die keine oder nur einen der zwei Ketten des Antigenrezeptors bilden. Diese funktionslosen Zellen werden durch Apoptose eliminiert. Erst wenn ein ganzer Rezeptor gebildet wurde, wird dieser im Thymus auf die spezifische Funktionalität getestet. T-Zellen, die MHC-Komplexe erkennen, überleben und reifen weiter heran (Positive Selektion). Außerdem müssen die Co-Rezeptoren die richtigen MHC-Moleküle binden. Der Co-Rezeptor CD4 muss MHC-Klasse II und CD8 MHC-Klasse I Moleküle erkennen. Negative Selektion entsteht, wenn Antigenrezeptoren zu stark an eigene Antigene binden. So wird gewährleistet, dass die reifen T-Lymphozyten die eigenen Zellen tolerieren (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 181-183).

### **1.3.4.3 Die Rolle des Thymus in der T-Zellreifung**

T-Lymphozyten stammen von Vorläuferzellen des Knochenmarks ab und siedeln sich über den Blutstrom im Thymus an. Heranreifende T-Zellen im Thymus werden Thymozyten genannt. Die Reifung fängt in der äußeren kortikalen Region an und schreitet weiter bis ins Mark, indem die Thymozyten durch den Kortex migrieren. Einige exprimieren als Erstes einen  $\gamma\delta$ , andere einen  $\alpha\beta$  T-Zell Rezeptor (TCR) aus. Die  $\alpha\beta$  Thymozyten reifen, sobald sie das Mark erreichen, entweder zu CD4+ und MHC-Klasse II restriktiven oder CD8+ und MHC-Klasse I restriktiven T-Zellen heran. Das bedeutet, dass sie nur aktiviert werden können, wenn sie fremde Antigene auf diesen MHC Proteinen präsentiert bekommen. Der Thymus bietet das geeignete Milieu zur Reifung von T-Zellen. Kortikale Epithelzellen bilden ein Netzwerk, durch das die T-Zellen ins Mark gelangen, wo medulläre Epithelzellen ausgebildet sind, um durch die Präsentation von eigenen Antigenen eine negative Selektion zu ermöglichen. Sowohl Epithelzellen als auch dendritische Zellen exprimieren MHC-Klasse 1 und 2 Moleküle, die essenziell für die Reifung der Thymozyten sind. Die Bewegung durch den Thymus (von Cortex bis Mark) ist durch Chemokine gesteuert, die vom CCR9 oder CCR7 Rezeptor erkannt werden, ohne die auch keine T-Vorläuferzelle ihren Weg zum Thymus gefunden hätte. Zum Verlassen der Thymusdrüse wird ein neu exprimierter (sphingosine-1-p-) Rezeptor benötigt. (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 199-200).

### **1.3.4.4 Stadien der T- Zellreifung und somatische Rekombination**

Während der T-Zellreifung liegt eine präzise Reihenfolge vor, in der die TCR Gene rekombiniert und Co-Rezeptoren exprimiert werden. Es fängt mit den unreifsten Thymozyten an, die weder CD4 noch CD8 exprimieren. Diese werden auch Doppelt-negative Thymozyten genannt und gehören zum pro-T-Zell Stadium. Aus diesen entstehen zu 90% die  $\alpha\beta$ -exprimierenden Thymozyten, aber auch  $\gamma\delta$  exprimierende Thymozyten. Rag-1 und -2 Proteine werden bei den Doppelt-negativen Thymozyten für die Rekombination der TCR-Gene gebraucht. Bei  $\alpha\beta$ -T-Zellen wird im Bereich des  $\beta$ -Ketten Locus als erstes eine D- (Diversity) und J- (Joining) Anteil des späteren Rezeptors rekombiniert. Beim Übergang vom pro- zum pre-T-Zell Stadium kommt zu der DJ Kombination noch der V- (Variable) Anteil dazu, sodass aus dem  $\beta$ -Ketten Protein (V-D-J), nach Transkription,

Splicing und Translation, der TCR entsteht. Im pre-T-Zell Stadium mit einem halben Rezeptor angekommen, werden weitere Gene (pre-T $\alpha$ , CD3 und  $\zeta$ -Protein) benötigt, um den ganzen pre-TCR Komplex zu bilden. Der pre-TCR Komplex sichert das Überleben, leitet die Rekombination des  $\alpha$ -Ketten Locus (bestehend aus V und J Segment) ein (weitere RAG-Gene werden exprimiert) und führt zum Stadium der Doppelt-positiven Thymozyten. Außerdem verhindern die genetischen Signale eine weitere Rekombination des  $\beta$ -Ketten Locus, aber nicht des  $\alpha$ -Ketten Locus, sodass in etwa 30% der reifen T-Zellen zwei verschiedene TCR auf der Oberfläche exprimieren. Die doppelt-positiven Thymozyten exprimieren sowohl CD4 als auch CD8, das pre-T-Zell Stadium ist somit verlassen und die  $\alpha$ -Kette verbindet sich mit der  $\beta$ -Kette zu V-D-J-C. Wichtig für den TCR sind der CD3-Rezeptor und das  $\zeta$ -Protein. Thymozyten der  $\alpha\beta$ -T-Zelllinie, die keine Rekombination der  $\alpha\beta$ -TCR Gene etablieren, sterben durch Apoptose. Die nun Doppelt-positiven (CD4+/CD8+) Thymozyten reifen entweder zu CD4+ oder CD8+, also einzel-positiven, Thymozyten heran. Diese phänotypische Entwicklung hat Auswirkungen auf die spätere Funktion in den sekundären Lymphorganen. Für CD4+ T-Zellen ist es wichtig, dass sie die Fähigkeit erlangen bei Antigenkontakt verschiedene Zytokine zu produzieren und einen CD40-Liganden zu exprimieren, der B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen aktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Aufgabe der CD8+ T-Zellen die Fähigkeit zu erlangen Moleküle freizusetzen, die andere Zellen tötet (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 200-203).

#### **1.3.4.5 Selektionsprozess der $\alpha\beta$ -T-Zellen**

Um nützliche Zellen von potenziell gefährlichen Zellen zu unterscheiden, müssen die potenziell gefährlichen Zellen noch im Thymus aussortiert und zur Apoptose gebracht werden. Die Rezeptoren der unreifen T-Zellen können jedes Peptid auf MHC-Molekülen erkennen, unabhängig davon ob das Peptid auf dem MHC-Molekül oder das MHC-Molekül selbst eigen oder fremd ist. Die einzigen nützlichen T-Zellen sind jene, die spezifisch fremde Antigene nur auf eigenen MHC-Molekülen erkennen. Da nur eigene Peptide eigener MHC-Moleküle auf der Oberfläche von epithelialen Thymuszellen präsentiert werden können, dürfen die Doppelt-positiven T-Zellen nur eine leichte Bindung eingehen, damit sie nicht aussortiert werden (Positive Selektion). T-Zellen, deren Rezeptoren die MHC-

Moleküle nicht erkennen, sterben durch Apoptose (death by neglect). Die T-Zellen, die MHC-I-Moleküle erkennen, entwickeln sich zu CD8+ (und CD4-). CD4+ (und CD8-) T-Zellen entstehen, wenn MHC-II-Moleküle erkannt worden sind. Wie genau oder durch welche Reize, ist noch nicht gänzlich geklärt. Die nun Einzel-positiven T-Zellen bekommen in peripheren Lymphorganen unter anderem auch eigene Antigene präsentiert und dürfen nicht darauf reagieren, sodass sie weiter ruhen, bis ein ihnen fremdes Antigen präsentiert wird. Wenn die Rezeptoren der unreifen T-Zellen mit den eigenen Peptiden auf den MHC-Molekülen eine starke Bindung eingehen, sterben sie ebenfalls durch Apoptose. So schließt das Immunsystem aus, dass es körpereigene Zellen angreift (Selbsttoleranz) bzw. als schädlich erachtet (Negative Selektion). Die negative Selektion findet sowohl im Kortex als auch im Mark an einzel-positiven T-Zellen statt. Die medullären Thymuszellen exprimieren das Protein AIRE (autoimmune Regulator), welches induziert, dass verschiedene Antigene peripherer Organe präsentiert werden, um noch weiter potenziell reaktive T-Zellen auszusortieren. Eine Subpopulation der CD4+ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, die durch das Erkennen eigener Peptide entstehen, aber wie genau ist noch nicht ganz geklärt (Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 203-205).

### **1.3.5 Prinzipien des adaptiven Immunsystems**

In den meisten Fällen kann das angeborene Immunsystem mit seinen oben genannten Mechanismen die eingedrungenen Mikroben erfolgreich abwehren. Wenn dies nicht ausreicht, wird es vom adaptiven Immunsystem unterstützt. Dabei spielt die dendritische Zelle eine zentrale Rolle, denn sie bildet die Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, indem sie durch Mikropinozytose kontinuierlich Material aus dem Extrazellulärraum aufnehmen und so den Antigenstatus der Umgebung überprüfen kann. Sobald über ein PRR ein Mikroorganismus erkannt worden ist, verändert sich ihr Phänotyp (Zelle rundet sich ab), sie stellt die Mikropinozytose ein, reguliert die PRRs herunter und prozessiert das fremde Material auf dem Weg über die Lymphgefäße zum Lymphknoten. Nach der Prozessierung exprimiert sie das fremde Antigen auf ihren MHC-II-Molekülen. Neben der hohen Dichte an MHC-Molekülen exprimieren sie des Weiteren stimulierende Moleküle wie CD80 und CD86. Auf dem Weg zum

Lymphknoten differenziert sich die dendritische Zelle zu einer professionellen APZ aus und ist nun in der Lage den naiven CD4+ T-Lymphozyten das Antigen zu präsentieren. Die T-Lymphozyten suchen mit ihren TCRs die Oberfläche der dendritischen Zelle ab und sobald ein TCR das Antigen erkannt hat, intensiviert es die Bindung, jedoch brauchen die naiven T-Zellen neben dem MHC/Peptid-Komplex noch ein weiteres Signal, um aktiviert zu werden. CD28 auf naiven T-Zellen kann dabei von CD80 oder CD86 von aktivierten dendritischen Zellen kostimuliert werden, damit es zur IL-2 Sekretion kommt. Durch die autokrine Stimulation von IL-2 kommt es zur klonalen Expansion und Differenzierung der T-Helferzellen, wovon sich einige später zu Gedächtniszellen entwickeln. Durch die T-Helferzellen werden auch antigenspezifisch die B-Lymphozyten aktiviert, welche ebenfalls klonal expandieren und sich zu Plasmazellen differenzieren. CD4+ T-Zellen sezernieren auch Zytokine wie INF- $\gamma$ , welches Gewebemakrophagen stimuliert, damit phagozytierte Erreger effizienter getötet werden. Auch IL-17 wird von T-Helferzellen sezerniert, welches weitere Neutrophile Granulozyten rekrutiert. Daneben entstehen aus den CD8+ T-Zellen zytotoxische T-Lymphozyten, die virusinfizierte Zellen eliminieren können, indem sie den Lymphknoten verlassen und ins periphere Gewebe, also dem Infektionsort, einwandern. Nach effektiver Immunabwehr entstehen Memoryzellen, die bei der sekundären Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Bei erneutem Kontakt mit bereits erfolgreich bekämpftem Krankheitserregern entsteht meistens keine neue Infektion, also treten auch keine neuerlichen Symptome auf, denn bei erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen mit den Memoryzellen kommt es zu einer sehr effizienten sekundären Immunantwort. Was bei der primären Immunantwort mehrere Tage bis Wochen gedauert hat, wird nun innerhalb von Stunden hochgefahren. Die Antikörper stehen direkt zur Verfügung und auch die Mechanismen der T-Effektorzellen kommen zum Tragen (Schütt, Bröker 2011 S. 63-70).

#### **1.4 Tumorimmunität**

Maligne Tumore sind wegen ihres unkontrollierten Wachstums und des Schadens, den sie an gesundem Gewebe verursachen, eine schwierige Aufgabe für das Immunsystem. Tumorzellen sind dadurch charakterisiert, dass die Regulation der Zellproliferation fehlt oder eingeschränkt ist. Das Metastasieren verbreitet

Tumorzellen im gesamten Organismus und erschwert die Tumorabwehr zusätzlich. Das Immunsystem verfügt über Mechanismen, um die Bildung von Metastasen zu verhindern, allerdings sind Tumorzellen in der Lage, einige der Mechanismen zu umgehen. Die histopathologische Aufarbeitung von Tumorgewebe hat ergeben, dass viele Tumore von T-Zellen, besonders CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten, umgeben sind, was darauf hinweist, dass sie eine besondere Rolle bei der Tumorabwehr spielen. Außerdem müssen sich Tumorzellen, obwohl sie von eigenen Zellen abstammen, von ihnen unterscheiden, um vom Immunsystem erkannt zu werden (Rink, Kruse et al. 2012 S. 201-202, Abbas, Lichtman et al. 2014 S.397-398).

#### **1.4.1 Erkennen von Tumorzellen**

Durch Mutationen und Demethylierungen im Genom produzieren Tumorzellen neue Antigene, sogenannte Neoantigene, die auf ihrer Oberfläche präsentiert werden, und vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Dies ruft eine Immunantwort hervor, sobald der MHC-Komplex samt Neoantigen von einer T-Zelle erkannt worden ist oder durch eine dendritische Zelle präsentiert wird. Es besteht eine große Diversität an Neoantigenen in verschiedenen Tumorentitäten. Solche Mutationen, die Neoantigene hervorrufen, stehen meist nicht in Verbindung zu der Mutation, die die Zelle entarten lässt. Die Identifizierung der Neoantigene könnte bei der Entwicklung von Tumorimpfstoffen hilfreich sein. Es wird aber dadurch erschwert, dass sogar innerhalb eines Tumors durch weitere Mutationen verschiedene Neoantigene auf unterschiedlichen Zellen präsentiert werden. Durch onkogene Viren ausgelöste Tumore werden durch die Produkte der Viren, die auf der Oberfläche präsentiert werden, auffällig und dienen als Tumorantigene, welche eine T-Zell vermittelte Immunantwort hervorruft. Andere Tumorantigene stammen von Genen, die in normalen Zellen nicht oder nur vermindert exprimiert werden oder normale Proteine, die in Tumorzellen überexprimiert werden, wie z.B. der epidermale Wachstumsfaktor Her2/Neu. Obwohl diese Proteine nicht fremd sind, triggern sie eine Immunantwort, weil manche dieser Proteine nur zu gewissen Zeiten (z.B. im Embryonalstadium) oder an gewissen Orten (auf den Keimzellen) exprimiert und toleriert werden. Viele dieser Antigene sind Ziele für Immuntherapeutika. In der Onkologie sind auch normale differenzierte Antigene

wichtig, da sie sowohl bei der Diagnose als auch bei der Therapie hilfreich sein können. Bei Leukämien oder Lymphomen, die der B-Zell Linie entstammen, wird CD20 exprimiert. Dazu gibt es bereits Antikörpertherapien wie Rituximab (Rink, Kruse et al. 2012 S. 202, Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 399-402).

#### **1.4.2 Tumorabwehrmechanismen**

Die Hauptaufgabe der Tumorabwehr wird durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten (engl. CTL) erfüllt. Die Fähigkeit der CTLs wurde in Tierversuchen bestätigt und wird durch die Funktion der immunologischen Überwachung wahrgenommen. CTLs erkennen und töten potenziell maligne Zellen, die Tumorantigene auf MHC-I Molekülen präsentieren. Die meisten Tumorzellen exprimieren keine Ko-Stimulatoren, die T-Lymphozyten brauchen, um eine Antwort zu initiieren. Daneben exprimieren Tumorzellen auch keine MHC-II Moleküle, die T-Helferzellen anregen CD8+ T-Zellen bei der Differenzierung zu unterstützen. Wahrscheinlich wird die Immunantwort durch Kreuzpräsentation der APZs vermittelt, indem sie Tumorzellen verdauen, in die Lymphknoten einwandern und die Tumorantigene auf MHC-I Molekülen mit Ko-Stimulatoren präsentieren. Naive T-Zellen erkennen die MHC-I Moleküle und differenzieren sich dann mit Hilfe der T-Helferzellen in tumor-spezifische CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten. Sobald diese ausdifferenziert sind, wandern sie ins Tumorgewebe ein, wo sie unabhängig von weiteren Ko-Stimulatoren Tumorzellen erkennen und attackieren. Die CD4+ T-Helferzellen können die Aktivität der Immunantwort der CTLs verstärken, indem sie TNF und INF- $\gamma$  freisetzen. INF- $\gamma$  bewirkt, dass die Tumorzellen mehr MHC-I Moleküle präsentieren und leichter durch den Angriff der CTLs lysiert werden können. Zusätzlich werden Makrophagen rekrutiert und helfen beim Eliminieren der Tumorzellen durch Freisetzung von NO. NK-Zellen verstärken die Abwehr vor Tumorzellen, sobald Tumorzellen ihre MHC-I Moleküle herunterregulieren. Der inhibierende Rezeptor der NK-Zelle bindet kein MHC Molekül, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Tumorzellen bilden vermehrt aktivierende Liganden auf ihrer Oberfläche (wie z.B. MIC-A, MIC-B und ULG, die vom NKG2D-Rezeptor der NK-Zelle wahrgenommen werden), die zum Zelltod durch die NK-Zellen führen. Selbst wenn ein MHC-Molekül anwesend ist, überwiegt die Aktivierung der NK-Zelle durch die vielen Liganden der Tumorzelle,

sodass die Inhibierung durch das MHC-Molekül zweitrangig ist. Die Aktivität der NK-Zellen wird durch Zytokine wie IL-2, IL-5 und IL-12 erhöht. T-Helferzellen aktivieren auch B-Lymphozyten, die Immunglobuline gegen den Tumor bilden, die so durch Makrophagen und NK-Zellen erkannt und eliminiert werden. Dieser Mechanismus nennt sich antikörperabhängige Zytotoxizität (engl. ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity) bei der der Fc-Rezeptor der Immunzellen an die Fc-Domäne des Antikörpers bindet (Rink, Kruse et al. 2012 S. 202-203, Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 402-404).

### **1.4.3 Tumorwachstum trotz Immunsystem**

In Tumoren haben sich viele Mechanismen etabliert, um das Immunsystem zu umgehen. Außerdem kann das Immunsystem ungewollt zur Förderung des Tumorwachstums beitragen. Ein Risikofaktor für die Ausbildung von Tumoren ist die chronische Entzündung, wie z.B. eine Barrett Ösophagitis, die ein erhöhtes Risiko zur Entstehung eines Adenokarzinoms im Ösophagus darstellt. Daneben können auch Infektionen durch Bakterien oder Viren die chronische Inflammation auslösen und die Basis für ein Karzinom schaffen. Zwei Beispiele dafür sind zum einen ein durch *Helicobacter pylori* hervorgerufenes Magenkarzinom und zum anderen ein durch Hepatitis B/ C Viren ausgelöstes Hepatozelluläres Karzinom. Wie trägt also das Immunsystem dazu bei, dass sich Tumore bilden, statt sie zu bekämpfen? Verdächtig wird vor allem das angeborene Immunsystem. Makrophagen schütten Wachstumsfaktoren wie VEGF aus, welches die Angiogenese fördert und Metalloproteasen aktiviert, die das extrazelluläre Gewebe modifizieren und auflockern, wodurch sich der Tumor vergrößert und besser durchblutet werden kann. Durch die bessere Durchblutung können maligne Zellen auch in die Blutbahn migrieren, sich im Körper ausbreiten und Tochtergeschwülste an anderen Stellen des Körpers bilden. Die Bildung von freien Radikalen als Abwehrstoff verursacht DNA-Schäden in gesunden Zellen, die zum Ausfall von Tumorsuppressorgenen und/oder Aktivierung von Onkogenen führen kann. Die Entartung einer Zelle könnte sich somit direkt vom Immunsystem selbst ableiten. Ein Mechanismus einiger Tumore ist auf die erhöhte Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zurückzuführen, welches den Abbau der Aminosäure Tryptophan katalysiert. Der Mangel an Tryptophan in der

Tumorumgebung hemmt die T-Zellen in ihrer Funktion. Dies führt zur immunologischen Toleranz dem Tumor gegenüber. Dazu kommt, dass sich Tumorzellen schnell teilen, weil Mutationen an Tumorsuppressor- und Onkogenen den Zellzyklus nicht verlangsamen bzw. diesen sogar beschleunigen. Dadurch können Reparaturmechanismen an der neu gebildeten DNA nicht eingreifen, sodass sich in einem Tumor nicht einheitliche Zellen befinden, sondern ein Gemisch an verschiedenen mutierten Zellen parallel bestehen, die unterschiedliche Eigenschaften haben. Das Immunsystem muss sich so immer wieder auf veränderte Tumorzellen einstellen. Obwohl NK-Zellen für die Abwehr von Tumorzellen ohne MHC-Molekül zuständig sind, werden diese nicht immer erkannt, vor allem dann nicht, wenn sich in dem Tumor Zellen mit und ohne MHC-Molekül befinden. Zu guter Letzt können Tumore aktiv T-Zellen angreifen. Der Fas-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Effektorzellen ist normalerweise dafür vorgesehen, dass nach erfolgreicher Immunabwehr die Zahl der T-Zellen reduziert und über Liganden für Fas die Apoptose ausgelöst wird. Tumore, die Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren, können so CTLs zur Apoptose zwingen (Rink, Kruse et al. 2012 S. 203-206, Abbas, Lichtman et al. 2014 S. 404-407).

Außerdem stehen die DCs im Verdacht zum Tumorwachstum beizutragen, weil sie eine zentrale Rolle in der Präsentation und Aktivierung der T-Zellen einnehmen. Das Tumorgewebe und das darin bestehende Mikromillieu beeinflusst die dendritische Zelle u.a. über Zytokine wie TGF- $\beta$  oder IL-10. Die dendritischen Zellen wiederum unterstützen die T-Zellen sich zu antiinflammatorischen T-Zellen zu differenzieren und das präsentierte Tumorantigen zu tolerieren. Dazu gehören die regulatorische T-Zelle und die TH2-Zelle. Beide sorgen dafür, dass die Immunantwort gegen den Tumor unterbunden wird. Myeloide Suppressorzellen werden durch das vom Tumor erschaffene Mikromillieu dazu angeregt CTLs und Th1-Zellen beim Tumorangriff zu unterdrücken. Die Komplexität des ganzen Mechanismus muss noch genauer erforscht werden (Tran Janco, Lamichhane et al. 2015).

Am Beispiel eines Malignen Melanoms hat man TILs gefunden, die durch überexprimierte PD-1 Rezeptoren auf der Oberfläche aufgefallen sind. PD-1 spielt bei der Regulation der T-Zellen eine Rolle. Es vermittelt die Inaktivierung durch Inhibierung der TCR-vermittelten Proliferation und verhindert die Zytokinproduktion

nach abgeschlossener Immunantwort. Außerdem zeigt sich bei Überexpression des PD-1 Rezeptors eine verminderte Effektor Aktivität. Das lässt vermuten, dass der Tumor es schafft bei T-Zellen den PD-1 Rezeptor hochzuregulieren und zu inaktivieren (Ahmadzadeh, Johnson et al. 2009).

## **1.5 Akute lymphatische Leukämie (ALL)**

### **1.5.1 Überblick**

Maligne Tumoren stehen nach Unfällen an zweiter Stelle bei kindlichen Todesursachen. Die Wahrscheinlichkeit an einem Malignom zu erkranken beträgt bis zum 15. Lebensjahr 0,2%. Die häufigsten Tumoren im Kindesalter sind mit knapp 33% Leukämien (Abbildung 1 Krebs bei Kindern). Sie machen also ein Drittel aller Krebserkrankungen aus. Mit etwa 25% stellt die Akute lymphatische Leukämie die häufigste Einzeldiagnose dar. Sie ist charakterisiert durch unkontrolliertes Wachstum von unreifen lymphatischen Zellen, also der neoplastischen Entartung von Lymphozyten bzw. deren Vorläuferzellen (Blasten). Die Inzidenz, also die Neuerkrankungsrate bezogen auf 100.000 Kindern liegt bei unter 15-jährigen bei 4,4%, wobei die Neuerkrankung bei 2-3 Jahren ihren Höchststand erreicht und danach allmählich abflacht (Abbildung 2 Neuerkrankung ALL). Weil in den letzten 30 Jahren die Diagnostik differenzierter geworden ist und sich die Therapie multimodaler Konzepte bedient, beträgt die Überlebenschance nach 5/10/15 Jahren 92/91/90%. Die Ätiologie, also die Gründe wieso ein Individuum erkrankt, ist nicht eindeutig geklärt. Im Verdacht stehen Umwelteinflüsse wie ionisierende Strahlung, Pestizide und anderen Karzinogene, sowie Infektionserreger (Kaatsch, Spix et al. 2015 S. 133-136).

### Krebs bei Kindern (ermittelt aus den Jahren 2004–2015)

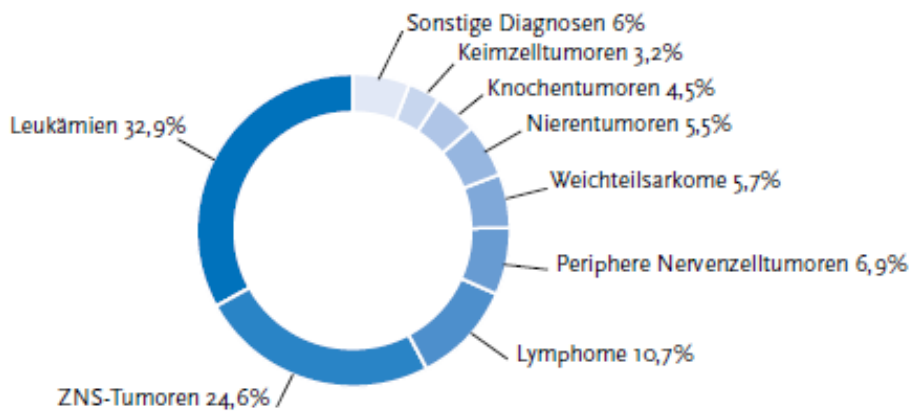


Abbildung 1 Krebs bei Kindern (Kaatsch, Spix et al. 2015 S. 133-136)

### Neuerkrankungsrate nach Alter und Geschlecht, akute lymphatische Leukämie (ALL) im Kindesalter Erkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen, ermittelt aus den Jahren 2004–2015

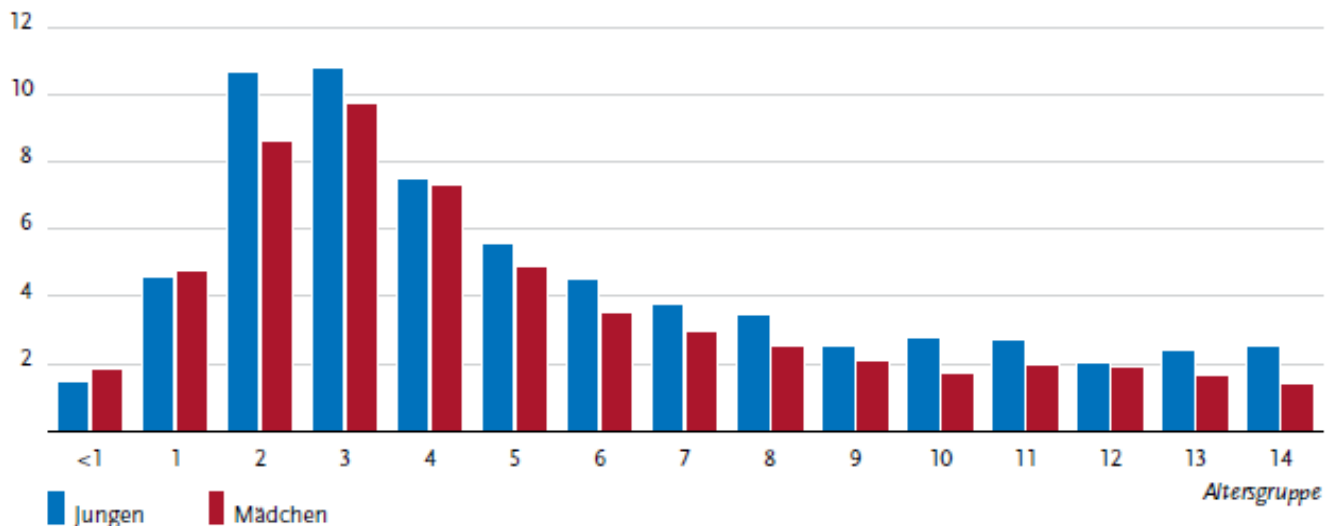


Abbildung 2 Neuerkrankung ALL (Kaatsch, Spix et al. 2015 S. 133-136)

Man nimmt an, dass die spontane somatische Mutation der wahrscheinlichste Auslöser für die ALL ist, so jedenfalls die Resultate aus genomweiten Assoziationsstudien. Dabei wurden Allele identifiziert, welche die Empfänglichkeit begünstigen und die Prognose beeinflussen. Abgesehen davon ist bei chromosomalen Anomalien wie Trisomie 21 das Risiko erhöht an einer ALL zu erkranken (Niemeyer, Eggert 2017 S. 269).

### 1.5.2 Klassifikation

ALL lässt sich anhand der FAB (French American British) -Klassifikation zytomorphologisch einteilen. FAB richtet sich nach Zellgröße, Zellkernform, Dichte des Kerns (Kernchromatin), Kern-Plasma-Relation, Färbeverhalten des Plasmas

und Zellinhalt wie Vakuolen oder Granula. Es wird in die Subtypen L1-L3 unterteilt, wobei es sich bei L1 um kleine, bei L2 um mittelgroße und bei L3 um große Zellen handelt. Zytochemisch kann man die Leukämien anhand des Färbeverhaltens unterteilen. ALL lässt sich von anderen Leukämien durch positive PAS- (Perjodazid-Schiff) bzw. SP- (saure Phosphatase) und negativer POX- (Peroxidase) bzw. EST- (Esterase) Färbung unterscheiden. Die immunologische Zuordnung ist ein wichtiger Parameter und gliedert die ALL in B-Vorläufer ALL (84% aller ALL), B-ALL (3%), T-ALL (14%) und einem minimalen Anteil von unklassifizierbaren akuten Leukämien, sowie solche mit Koexpression von myeloischen Markern (Sitzmann 2007 S. 473-474, 477).

Um herauszufinden, um welche Zellen es sich handelt, wird die Immunophänotypisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt, wobei die Zellen bzw. deren Oberflächenproteine mit Antikörpern markiert werden, damit die Leukämie in Subtypen eingeteilt werden kann. Die Leukämie der B-Zell Linie trägt die Oberflächenmarker CD19, CD79a und/oder CD22. Dabei werden CD19 und CD22 fast zu 100% exprimiert und bieten so Ansatz bei neuen Therapieformen, wie zum Beispiel der bereits bekannte monoklonale Antikörper gegen CD20 – Rituximab oder Immunotoxine wie SAR3419, welches von B-Zellen über den CD19 Rezeptor aufgenommen wird und im Inneren der Zelle für den Zelluntergang sorgt (Niemeyer, Eggert 2017 S. 270, 292).

### **1.5.3 Diagnostik**

Wenn durch die Symptomatik ein Verdacht auf ALL besteht, muss diese Diagnosestellung eindeutig sein, damit eine angepasste Therapie gestartet werden kann. Um das Ausmaß der Erkrankung und den Befall einzelner Organe festzustellen, wird eine Reihe von klinischen Untersuchungen angeordnet, die auch dabei helfen Komplikationen abzuschätzen. Dazu gehören die Überprüfung der Milz und Lebergröße, Hoden und der Lymphknotenstationen. Eine erste Zuordnung erfolgt durch einen Blutausschrieb, bei dem ALL von AML unterschieden werden kann. Im Blutbild kann man meistens eine hämatopoetische Insuffizienz feststellen, d.h. ein erniedrigter Hämoglobin-Wert und verminderte Thrombozytenzahl und eine Neutrozytopenie, aber nicht immer eine erhöhte Lymphozytenzahl. Um die Diagnose ALL zu beweisen, führt man eine

Knochenmarkspunktion durch. Man erkennt ALL daran, dass das Knochenmark von metaplastischen Leukämiezellen und einer nahezu sistierenden Hämatopoese charakterisiert ist. Die anschließende Immunphänotypisierung dient der Identifizierung des genauen Subtyps der ALL, damit die Therapie dem Subtyp entsprechend initiiert werden kann. Translokationen im Genom und daraus resultierende Fusionsgene können durch zyto- bzw. molekulargenetische Verfahren erkannt werden. Bei manchen dieser chromosomalen Aberrationen kann man auf eine Prognose schließen und so risikoadaptiert vorgehen. Bei der Therapieplanung ist eine Liquorpunktion indiziert, weil dadurch eine präventive ZNS Bestrahlung vermieden werden kann, wenn keine Blasten (weniger als 5) im Liquor gefunden werden. (Speer, Gahr 2013 S. 641 - 642, Niemeyer, Eggert 2017 S. 273 - 274)

#### **1.5.4 Therapie**

Die Therapie der ALL orientiert sich nach den Studiengruppen von ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) und der Hamburger CoALL. Die Therapie beinhaltet eine Induktions-, Konsolidierungs-, Reintensivierungs- und Erhaltungstherapie mit Polychemotherapie und einer Prophylaxe des Zentralnervensystems. Dabei werden die PatientInnen nach dem jeweiligen Risiko in Gruppen unterteilt. Man orientiert man sich an der initialen Leukozytenlast, dem Alter des Patienten/ der Patientin sowie den jeweiligen Subtypen. Der wichtigste Faktor, um die PatientInnen adäquat zu therapieren, ist jedoch das Ansprechen auf die Therapie. Durch repetitive Verlaufskontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten kann man anhand der MRD- ( Minimale Resterkrankung) Bestimmung festhalten wie die Therapie anspricht und dementsprechend die Therapie adaptieren (Speer, Gahr 2013 S. 642, Niemeyer, Eggert 2017 S. 275- 276).

Der wichtigste prognostische Faktor für akute lymphatische Leukämien ist die MRD-Bestimmung am 33. und 78. Tag nach dem Beginn der Therapie (Bartram, Schrauder et al. 2012).

Bei PatientInnen, die ein hohes Risiko aufweisen bzw. bei einem zu erwartenden ereignisfreien Überleben unter 50% liegen, wie z.B. beim Ausbleiben einer Remission nach der Induktionstherapie oder mehreren Rezidiven, kann eine Stammzelltransplantation geplant werden. Die Graft-versus-Leukämie Reaktion

bei der allogenen Stammzelltransplantation bewirkt einen Angriff, der von den transplantierten Immunzellen gegen die fremden Leukämiezellen ausgeht, was mit einer verbesserten Rezidivfreiheit assoziiert ist (Niemeyer, Eggert 2017 S. 278, 290).

## **1.6 Immuntherapie**

Neben der konventionellen Chemotherapie kommen bei vielerlei Krebserkrankungen Immuntherapien zum Einsatz. Durch das erweiterte Verständnis der oben genannten Tumorabwehrmechanismen in Wechselwirkung mit dem Immunsystem wird vermehrt nach spezifischen bzw. gezielten Therapieformen gesucht. Zusätzlich versucht man so die toxischen Nebenwirkungen von herkömmlichen Chemotherapeutika zu umgehen. Immuntherapien zielen auf Tumorabwehrmechanismen, indem sie exogen das Immunsystem stimulieren und aktivieren und so die Immuntoleranz des Tumors überwinden (Dougan, Dranoff 2009).

### **1.6.1 Zytokine**

Zytokine dienen der Signalübertragung von Zelle zu Zelle und kommen v.a. bei Immunzellen vor. Zytokine haben verschiedene Aufgaben, die auch bei der Tumorabwehr eine Rolle spielen. IL-2 ist ein potenter Wachstumsfaktor für T-Zellen und Interferon-alpha hat u.a. die Aufgabe die Antigenpräsentation der MHC-Klasse I Komplexe zu verbessern, damit eine potentere Immunantwort entstehen kann. Diese Zytokine können auch systemisch verabreicht werden, um eine anhaltende Immunantwort aufrecht zu erhalten, die vom Tumorgewebe unterdrückt wird. Die Applikation dieser Medikamente ist aber wegen der Nebenwirkungen, die einer systemischen Infektion ähneln (Fieber, Blutdruckabfall, Erbrechen und Diarrhoe), limitiert (Dougan, Dranoff 2009). Neben der systemischen Gabe ist es auch möglich von PatientInnen zuvor gewonnene TILs bzw. NK-Zellen in-vitro mit Zytokinen (IL-2) zu aktivieren und den PatientInnen zu reinfundieren. Die so entstandenen Lymphokin-aktivierten Killerzellen (kurz LAK) und TILs wurden u.a. bei fortgeschrittenen Mamma- und Ovarialkarzinomen eingesetzt und zeigten zwar eine kurzfristige Verbesserung, aber nach Absetzen der Therapie ging die Zytotoxizität wieder zurück, lediglich bei 3 Patientinnen

wurde eine Komplettremission beobachtet (Mallmann, Krebs 1995). Vielversprechender war die regionale Applikation, da intravenös verabreichte LAK-Zellen das periphere Tumorgewebe schlecht erreichen. Dabei erreichte man Remissionsraten von 35% beim Malignem Melanom (Keilholz, Bergmann et al. 2006). Typ-I-Interferone hemmen das Tumorstadium. IFN-I verstärken die Tumorüberwachung und die Funktion der Zytotoxischen T-Zelle (CTL) bzw. Tumor infiltrierenden T-Zellen (TILs). Im Gewebe von Menschen mit Kolorektalem Karzinom wurde herausgefunden, dass die Signalübertragung von IFN-I mangelhaft ist, da das Tumorgewebe den Rezeptor der CTLs herunterreguliert und so der Immunüberwachung entgeht. Durch Knockout-Mäuse, die den Rezeptor nicht exprimiert haben, wurde diese Annahme erhärtet, da die Knockout-Mäuse häufiger und größere Tumoren ausbildeten (Lu, Klement et al. 2019).

### **1.6.2 Immunadjuvantien**

Manchmal können immunologische Hilfsstoffe dazu beitragen, dass sich eine inkompetente Immunantwort in eine kompetente entwickelt. So kann eine Tumorregression erreicht werden, sofern diese Adjuvantien in einem frühen Stadium des Tumors verabreicht werden. Das positive an dieser Therapieform sind die geringeren Nebenwirkungen (Dougan, Dranoff 2009). Obwohl der genaue Wirkmechanismus unbekannt ist, wird beim oberflächlichen Blasenkarzinom BCG (Bacille Calmette-Guérin) in die Harnblase instilliert. Das reduziert das Risiko eines Rückfalls bzw. das Risiko eines Wiederauftretens des Tumors mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu dem gängig verwendeten Zytostatikum Mitomycin C (Schulster 2019). Da Mikroben über die Toll-like Rezeptoren erkannt werden und so eine Immunantwort auslösen, war es vielversprechend einen Liganden herzustellen, der an diesen Rezeptor bindet, um Immunantworten zu verstärken. Der Ligand TLR7, der unter dem Namen Imiquimod bekannt ist, wird bei epithelialen Tumoren wie der Aktinischen Keratose, Basalzellkarzinom oder durch HPV induzierte Warzen oder Tumoren eingesetzt (Dougan, Dranoff 2009). Bei einer rezenten Studie wurde Imiquimod auch bei Lentigo Maligna erfolgreich eingesetzt und kann so eine Operation oder Strahlentherapie ersetzen (Tio, van Montfrans et al. 2019).

Das Immunadjuvans  $\alpha$ -Galactosylceramid ist ein Lipid, welches natürliche Killer-T-Zellen aktiviert und eine rasche Immunantwort auslöst, indem es Zytokine wie IFN- $\gamma$  ausschüttet, welches u.a. die Tumorbekämpfung unterstützt. Dabei ist es sogar effektiver, wenn man APZs mit dem Lipid belädt und den PatientInnen infundiert, um eine verstärkte Antitumor Aktivität zu initiieren (Bae, Seo et al. 2019).

### **1.6.3 Von Immunprophylaxe bis Tumorimpfung**

Wie oben beschrieben können Mikroorganismen selbst oder durch Mikroorganismen ausgelöste chronische Entzündungen Tumore auslösen. Die Prophylaxe in Form von Impfungen verhindert eine potenziell kanzerogene Entartung durch Bakterien oder Viren. Die Leberzellen können durch die Hepatitis B Viren hervorgerufene chronische Infektion entarten (Hepatozelluläres Karzinom). Um das zu umgehen, wird dem Immunsystem ein nicht pathogenes Protein dieses Virus‘ präsentiert und eine Immunreaktion hervorgerufen. So wird der Erreger effektiv bekämpft sobald der Körper damit in Kontakt kommt, bevor dieser die Leber angreift und dort sein onkogenes Potential hervorruft (Dougan, Dranoff 2009). Gleiches trifft auf HPV zu. Das Humane Papilloma Virus löst nicht nur anogenitale, v.a. das Cervixkarzinom aus, sondern auch Kopf-Hals bzw. Oropharyngeal Tumore. Durch Impfung lassen sich anogenitale Tumore verhindern und man nimmt an, dass die Inzidenz für Kopf-Hals Tumore dadurch rückläufig sein wird (D'Souza, Dempsey 2011).

Das nichtmutierte, also auch bei gesunden Zellen vorkommende Antigen Her-2/neu, welches häufig bei Brust- und Ovarialkrebs überexprimiert wird, kann als Ziel für einen Impfstoff dienen. Da es ein körpereigenes Antigen ist und auch auf gesunden Zellen exprimiert wird, muss das Immunsystem so stimuliert werden, dass es trotzdem eine Immunreaktion gegen das Antigen hervorruft. Dafür hat man ein Adjuvans, also einen Hilfsstoff (GM-CSF) hinzugefügt, sodass APZs angelockt werden, die den T-Zellen vermitteln, dass das Antigen Her-2/neu als schädlich eingestuft wird (Disis, Gooley et al. 2002).

Da dendritische Zellen anderen Immunzellen einschließlich T-Zellen Antigene präsentieren und damit aktivieren, bildet diese Achse einen interessanten Ansatz, um Krebs zu bekämpfen, indem DCs mit Tumorantigenen geimpft werden. Die Manipulation von DCs ist durch die Komplexität der verschiedenen Untergruppen

von DCs jedoch erschwert (Banchereau, Palucka 2005). Bei PatientInnen mit metastasiertem Melanom wurde in einer Phase III Studie die Wirksamkeit von geimpften DCs untersucht, welche aber abgebrochen wurde, da der erhoffte Erfolg nicht erzielt wurde. Jedoch haben PatientInnen, die einen relativ guten Allgemeinzustand (Karnofsky Score = 100) zu Beginn der Therapie und einen bestimmten HLA-Haplotypen aufwiesen, signifikant länger überlebt (Schadendorf, Ugurel et al. 2006). Hier bedarf es noch weiterer Forschung, um eine effektive Therapie zu etablieren.

Ein weiterer Ansatz der Tumorimpfung wurde in einer Phase I/II Studie untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass durch Addition von TLR9 Agonisten mit Tumorantigenen gegen ein B-Zell-Lymphom eine effektive Immunantwort ausgelöst werden kann (Brody, Ai et al. 2010).

#### **1.6.4 Antikörpertherapie**

Die von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildeten Antikörper spielen eine essenzielle Rolle in der Immunabwehr. Synthetisch hergestellte Antikörper, besser bekannt als monoklonale Antikörper (engl.: monoclonal antibody kurz: MAB), können so hergestellt werden, dass sie ein spezifisches Ziel haben und eine hochgradige Affinität aufweisen. Das Besondere an monoklonalen Antikörpern ist, dass sie den normalen Immunablauf umgehen und nicht erst durch Antigenkontakt mit B-Lymphozyten entstehen. MAB können so hergestellt werden, dass sie sogar eigene Antigene erkennen können, die vom Immunsystem normalerweise toleriert werden, weil manche Tumore Proteine präsentieren, die auch bei normalem Gewebe vorkommen. Das birgt aber die Gefahr, dass Nebenwirkungen auftreten, da auch normales Gewebe bzw. Zellen angegriffen werden. Jedoch sind die Nebenwirkungen meist nicht so stark wie bei konventionellen Chemotherapien. Das Risiko für allergische Reaktionen liegt daran, dass MAB initial in Tieren hergestellt werden. Durch Einfügen einer humanen IgG1 Sequenz an der Bindedomäne kann das Risiko gesenkt werden. Sobald Antikörper am Zielprotein gebunden haben, üben sie unterschiedliche Effekte aus. Sie opsonieren und aktivieren das Komplementsystem, inhibieren Rezeptoren, fangen Mediatoren ab oder aktivieren die antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC) durch Effektorzellen. So spielt auch das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der

Tumorabwehr (Dougan, Dranoff 2009). Beim diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) wurde die Wirksamkeit von Rituximab (Antikörper gegen CD20) nachgewiesen. Im Vergleich zur Standardtherapie (CHOP) wurde zusätzlich Rituximab hinzugefügt. Es wurde ein signifikant höheres Überleben beobachtet und ist deshalb in die Standardtherapie integriert (R-CHOP) (Coiffier, Lepage et al. 2002). Ähnliches wurde bei metastasierendem Brustkrebs herausgefunden, welches den Rezeptor HER2/neu ausbildet. Wenn man Trastuzumab (Antikörper gegen HER2/neu) zur Chemotherapie hinzugefügt, wird ein verlangsamtes Fortschreiten der Krankheit, ein höheres und längeres Ansprechen auf die Therapie, eine geringere Sterberate um 20%, sowie längeres Überleben beobachtet (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001). Mit Alemtuzumab, ein MAB gegen das Oberflächenmerkmal CD52, welcher bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) eingesetzt wird, kann eine Remission der CLL erzielt werden. Auch ein längeres und therapiefreies Überleben wurde beobachtet (Moreton, Kennedy et al. 2005). Alemtuzumab hat sich in Vergleich zu Chlorambucil bei CLL als überlegen in Hinsicht auf Progressionsfreies Überleben und Remissionserfolg erwiesen (Hillmen, Skotnicki et al. 2007). Bei CLL mit TP53 Mutation, welche generell eine schlechte Prognose aufweist, hat sich mit Hilfe von Alemtuzumab in Kombination zu Methylprednisolon eine hoch effektive Induktionstherapie etabliert (Pettitt, Jackson et al. 2012). Ein MAB gegen CD33, Gemtuzumab, wurde erfolgreich bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) eingesetzt. In einer groß angelegten randomisierten Studie wurde bei Kombination von Gemtuzumab mit Chemotherapie herausgefunden, dass vor allem junge PatientInnen davon profitieren und bei etwa 70% der PatientInnen ein besseres Outcome in Bezug auf das 5-Jahres Überleben erzielt werden konnte (Burnett, Hills et al. 2010). Cetuximab zielt auf den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (engl. EGFR) und wird bei Kolorektal- und Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals Bereichs eingesetzt, da bei diesen Tumoren dieser Rezeptor häufig überexprimiert bzw. dysreguliert ist. Selbst bei PatientInnen, die zuvor andere Therapien erhielten, verbessert Cetuximab das Überleben, verlangsamt das Fortschreiten der Krankheit und erhöht die Lebensqualität bei Kolorektalem Karzinom (Jonker, O'Callaghan et al. 2007). Bei der Therapie von locoregional fortgeschrittenen Kopf- bzw. Halstumoren reduziert Cetuximab in Kombination mit Radiotherapie die Mortalität ohne erhöhte Nebenwirkungen im Vergleich zu Radiotherapie allein.

(Bonner, Harari et al. 2006). Im Unterschied zu den oben genannten MAB greift Bevacizumab nicht direkt Krebszellen an, sondern hemmt die Angiogenese des Tumors, indem es verhindert, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl.: VEGF) am Rezeptor andockt. Damit wird seine Wirkung aufgehoben. Da es keinen Rezeptor angreift, kommt es bei einer Vielzahl von Tumoren zum Einsatz. (Sandler, Gray et al. 2006). Durch Zugabe von Bevacizumab zu Paclitaxel und Carboplatin bei nicht kleinzelligem Lungenkrebs wurde zwar ein signifikant höheres Überleben beobachtet, jedoch mit dem Risiko von ungefähr 4% höherem therapiebedingtem Tod (Sandler, Gray et al. 2006). Des Weiteren werden Antikörper entwickelt, die eine immunmodulierende Aktivität aufweisen, also hemmende Einflüsse auf Immunzellen blockiert oder fördernde aktiviert. Ipilimumab bindet am CTLA-4 Rezeptor der T-Zellen. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen Immuncheckpoint. Immuncheckpoint Rezeptoren fördern oder dämpfen eine Immunantwort. CTLA-4 hemmt die Immunantwort von T-Zellen und damit die Antitumoraktivität. Ipilimumab blockiert diesen Rezeptor, dadurch wird die Antitumoraktivität nicht aufgehoben. Ipilimumab wurde bei metastasierendem Melanom in Kombination mit Immunvaccin Gp100, ein Tumorantigen, welches überwiegend auf Melanomzellen ausgebildet wird, eingesetzt. Im Vergleich zu Gp100 allein kam es bei der Kombination beider Wirkstoffe und sogar bei Gabe von Ipilimumab allein zum längeren Überleben (10 vs. 6,4 Monate) (Hodi, O'Day et al. 2010). In einer weiteren Studie zum fortgeschrittenen Malignem Melanom wurde Ipilimumab mit einem weiteren Immuncheckpoint Inhibitor, Nivolumab, kombiniert. Nivolumab blockiert den PD-1 Rezeptor. PD-1 hemmt auch die Immunantwort der T-Zellen. Durch die Blockade der Hemmung durch Nivolumab wird die Antitumor Aktivität verstärkt. Bei dieser Studie handelt es sich um ProbandInnen, die vorher keine Therapie bekommen hatten. Durch Kombination der beiden Immuncheckpoint Inhibitoren wurde eine Ansprechrate von 61% erreicht. Im Vergleich dazu wurde bei Ipilimumab allein nur eine Ansprechrate von 11% erreicht (Wolchok, Kluger et al. 2013). Ein weiterer Immuncheckpoint Inhibitor, Pembrolizumab, der auch am PD-1 Rezeptor bindet, verlängert im Vergleich zu Ipilimumab das Überleben, verkürzt das Fortschreiten der Krankheit und hat weniger schwere Nebenwirkungen bei fortgeschrittenen Malignem Melanom (Robert, Schachter et al. 2015).

### **1.6.5 Knochenmarkstransplantation (KMT)**

Bei Hämatologischen Krebserkrankungen kann auch die Transplantation von allogenen Stammzellen (Knochenmark, periphere Stammzellen oder Nabelschnurblut) eine Therapieoption darstellen. Vor der KMT wird das Knochenmark des Empfängers/ der Empfängerin mittels Ganzkörperbestrahlung und oder Hochdosis Chemotherapie entfernt (myeloablative Konditionierung), um eine Transplantatabstoßung zu verhindern und bei malignen Erkrankungen die Tumorzellen zu reduzieren. Die Behandlung und die darauffolgende allogene, also fremde, Knochenmarksspende ist nicht ohne Nebenwirkungen. Abgesehen von der hohen Infektionsanfälligkeit, die durch die Knochenmarksablation verursacht wird, kann es durch Spenderzellen zur sog. Graft-versus-Host-Disease (GVHD) kommen. Bei der GVHD kommt es zum Angriff von T-Zellen des Spenders / der Spenderin auf verschiedene Organsysteme des Empfängers / der Empfängerin, die dann wiederum mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden müssen. T-Zellen des fremden Spenders / der fremden Spenderin erkennen die Oberflächenmerkmale (HLA) des Empfängers / der Empfängerin als fremd an und greifen diese an. Dabei sind die überlebenden APZs im Gewebe des Empfängers dafür verantwortlich, dass die Oberflächenmerkmale präsentiert werden (Shlomchik 2007). Dabei wird aber genau dieser Effekt bei Hämatologischen Erkrankungen ausgenutzt, um die verbliebenen Tumorzellen des Empfängers / der Empfängerin zu eliminieren. Dieser Effekt, der durch T-Zellen vermittelt ist, nennt sich Graft-versus-Leukemia (GVL), wird aber durch den Schweregrad einer gleichzeitigen GVHD limitiert (Ferrara, Levine et al. 2009). Auch bei fortgeschrittener Krankheit oder Rezidiv bildet die allogene Stammzelltransplantation mit GVL einen kurativen Ansatz. Die Herausforderung dieses Verfahrens besteht darin die GVHD gering zu halten, aber den GVL Effekt nicht zu unterdrücken, damit u.a. kein Rezidiv entsteht. Da aber die Radio- und Chemotherapie bei der Konditionierung vor allem älteren oder schwer kranken PatientInnen sehr schadet, hat man versucht eine nicht myeloablative, sondern nur immunsuppressive Konditionierung durchzuführen, um die Morbidität und Mortalität geringer zu halten. Um den gewünschten GVL Effekt dennoch zu erreichen, hat man versucht nur die notwendigen T-Zellen in ausreichender Anzahl zu transplantieren. Die nicht-myeloablative Konditionierung weist weniger Nebenwirkungen auf und die Heilungsraten sind mit über 66% sehr hoch (Storb,

Champlin et al. 2001). Da die Donor Lymphozyten Infusion (DLI) potente Immunzellen mit Antitumoraktivität bereitstellt, kann ein erneut ausbreitender Tumor wieder unter immunologische Kontrolle gebracht werden. Wenn bei erneutem Rezidiv ohne vorheriger Immunsuppression DLI verabreicht wird, ist der Effekt des GVL stärker, aber es kommt auch häufiger zu GVHD bzw. der Schweregrad fällt höher aus (Miller, Weisdorf et al. 2007). Die Kurzzeitbehandlung mit Immunsuppressiva zur Vermeidung von schweren Formen der GVHD durch DLI, wurde hinsichtlich eines GVL-Effektes evaluiert. Dabei wurde beobachtet, dass die zur Prophylaxe eingesetzte immunsuppressive Therapie den GVL-Effekt in Bezug auf Rezidiv und Überleben nicht beeinträchtigt und den Schweregrad der GVHD herabsetzt (Huang, Wang et al. 2009).

### **1.7 Adaptive T-Zell Therapie**

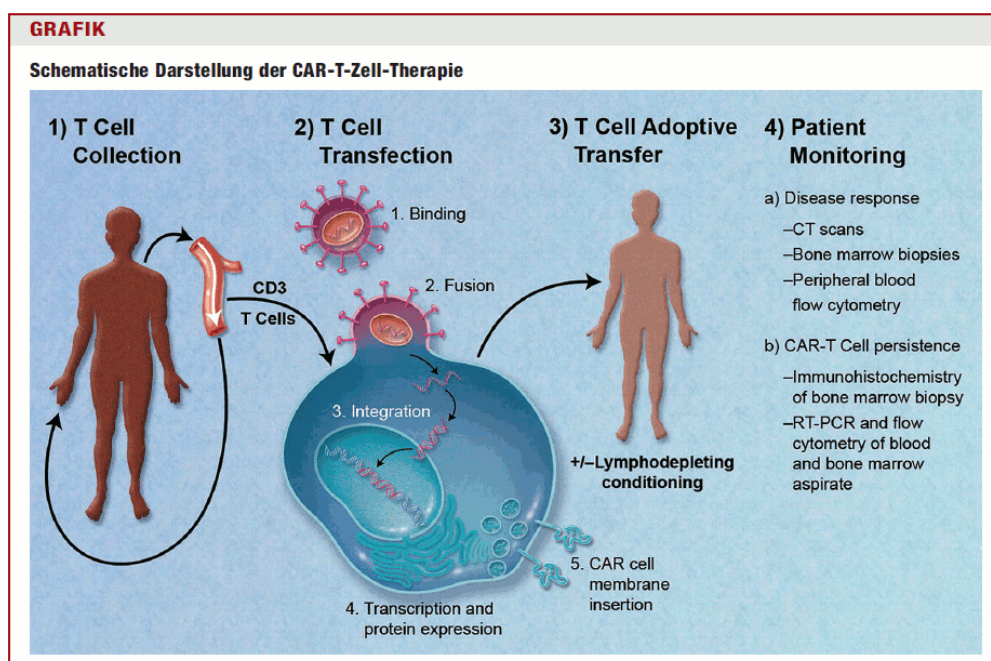
Bei dieser Art der Immuntherapie werden T-Zellen von PatientInnen, die eine Antitumor Aktivität aufweisen, also überwiegend CD8+ T-Zellen, aus dem Blut des Patienten / der Patientin gewonnen oder natürlich vorkommende TILs aus der zu bekämpfenden Tumormasse isoliert. Diese werden dann kultiviert und so behandelt, dass sie sich vermehren und die Antitumor Aktivität verstärken. Die dann vermehrten und aktivierten T-Zellen werden dem Patienten / der Patientin reinfundiert und entfalten ihren Effekt am Tumor mit dem Ziel den Tumor zu bekämpfen und ein Rezidiv zu verhindern (June 2007). Bei den TILs handelt es sich nicht nur um reine T-Zellen, sondern auch um NK-Zellen. Diese TILs sind in der Lage mittels ihrer TCRs Tumorantigene zu erkennen. Die aus einem Tumor gewonnenen TILs reichen aber für eine adäquate adaptive T-Zelltherapie nicht aus. Deswegen behandelt man sie mit IL-2, einem Wachstumsfaktor mit dessen Hilfe die Expansion von TILs ex-vivo gelingt (Met, Jensen et al. 2019). Die adaptive T-Zell Therapie wurde 1988 zuerst beim metastasierenden Melanom eingesetzt. Dabei wurden TILs aus einem Tumor isoliert, mit IL-2 verabreicht und vor der Verabreichung wurde der Patient / die Patientin mit Cyclophosphamid präkonditioniert. Dabei kam es bei 60% der PatientInnen zu einem Ansprechen der Therapie und Rückgang der Metastasen. Ein Patient erlangte komplette Remission (Rosenberg, Packard et al. 1988). Die nächste erfolgreiche Errungenschaft wurde bei immunsupprimierten KnochenmarksempfängerInnen

erreicht. Zytomegalie (CMV)- oder Epstein-Barr Virus (EBV) sind Viren, die durch Inkompetenz des Immunsystems Zellen infizieren und entarten lassen können, weil die PatientInnen durch die Konditionierung bzw. Immunsuppression an schwerwiegender T-Zell Mangelfunktion leiden. Um diese Infektionen nicht ausbrechen zu lassen und die Möglichkeit einer malignen Transformation zu verhindern, wurden die Virus spezifischen T-Zellen von KnochenmarksspenderInnen isoliert und expandiert. CD8+ T-Zellen, die in dieser Studie gegen EBV gerichtet sind, verhindern durch die prophylaktische Gabe die Entstehung des B-Zell Tumors. (Riddell 2004). Ein anderer Ansatz versucht mittels autologen dendritischen Zellen Zytotoxische T-Zellen zu generieren. Die Oberflächenproteine Mart-1 und gp100, welche beim Malignem Melanom auf den Melanozyten überexprimiert werden, können durch die dendritischen Zellen präsentiert werden. Diese mit Mart-1 oder gp100 beladenen dendritischen Zellen werden zu den aus dem Blut der PatientInnen gewonnenen PBMC, also im Blut befindliche Immunzellen, hinzugefügt, um zu den Tumorantigenen spezifische Zytotoxische T-Zellen (CTC) herzustellen. Nach mehreren Zyklen der Stimulation, werden die T-Zellen klonal expandiert und in-vitro auf die Tumorantigene getestet. Die Zytotoxischen T-Zell Klone sind dann in der Lage Zellen mit den Tumorantigenen anzugreifen und zu lysieren. Die mit dem richtigen Rezeptor ausgestatteten T-Zellen werden dann dem Patienten / der Patientin verabreicht. In vivo wurde noch zusätzlich IL-2 verabreicht, um die CTC zu vermehren und den Antitumor Effekt zu erhöhen. Dabei wurden keine schweren Nebenwirkungen festgestellt und einzelne Metastasen bildeten sich zurück, was das Therapieansprechen beweist und die Ansprechrate hat sogar bis zu 21 Monaten gehalten (Yee, Thompson et al. 2002).

### **1.7.1 CAR T-Zellen**

Der größte Erfolg der T-Zell Therapie wurde bis dato mit der CAR T-Zell Therapie erreicht. Dabei handelt es sich um autologe ex-vivo gentechnisch modifizierte T-Zellen. CAR steht für chimärer Antigenrezeptor und wird so ausgewählt, dass er gegen das Antigen gerichtet ist, welches möglichst nur auf den Krebszellen exprimiert wird. Aus dem Blut des Patienten / der Patientin werden mittels Leukaphrese die T-Zellen gewonnen. Der Gentransfer für den Rezeptor wird

synthetisch über einen retroviralen oder lentiviralen Vektor gewährleistet. Dabei wird die genetische Information für den Rezeptor über ein inaktives Virus, das das genetische Material beinhaltet, in die T-Zelle geschleust und dann in das Genom der T-Zelle integriert. So wird bei der darauffolgenden klonalen Expansion dieser T-Zellen auch die genetische Information an die Tochterzellen weitergegeben. Diese werden dann zur Tumorbekämpfung dem Patienten / der Patientin reinfundiert. Vor der Verabreichung der T-Zellen werden die PatientInnen meist in Form von Lymphozyten depletierender Chemotherapie konditioniert. Dafür wird meistens Fludarabin und Cyclophosphamid eingesetzt. Das dient der Reduzierung körpereigener Immunzellen, sodass sich für die infundierten Immunzellen günstige Bedingungen für die Expansion vorfinden. Durch die Aktivierung in vivo nach Kontakt des Tumorantigens werden die T-Zellen zu Zytotoxischen T-Zellen und vermehren sich klonal. Der Vorteil gegenüber normalen T-Zellen ist, dass die Aktivierung der CAR-T-Zellen nicht von Antigenen abhängig ist, die an einem MHC Molekül gebunden sind. Der CAR aktiviert unabhängig von der Präsentation von Antigenen durch andere Immunzellen die T-Zelle, sobald das Antigen mit dem CAR in Kontakt kommt. Nach erfolgreichem Bekämpfen des Tumors können sich T-Zellen in Memoryzellen umwandeln und im Falle eines Rückfalls erneut aktiviert werden (Buchholz, Hartmann et al. 2018).



Nach der Isolierung von T-Zellen aus dem Blut des Patienten werden die Zellen vermehrt und genetisch verändert, sodass sie einen krebszell-spezifischen CAR auf ihrer Oberfläche bilden. Anschließend werden die CAR-T-Zellen expandiert, zum Arzneimittel formuliert und dem Patienten rückinfundiert.

Abbildung 3: CAR-T-Zell Therapie (Buchholz, Hartmann et al. 2018)

## 1.7.2 Aufbau & Entwicklung des CAR

Der CAR ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Bindedomäne, die wie ein Antikörper konstruiert ist und das spezifische korrelierende Antigen der Tumorzelle erkennt, sowie einer intrazellulären Signalsequenz. Die Transmembrandomäne dient der Verankerung in der Zellmembran der T-Zelle und der Präsentation des Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die intrazelluläre Signalsequenz ist für die Therapie entscheidend, denn nur durch die Weiterleitung des Signals durch das gebundene Antigen, erfolgt eine Aktivierung der T-Zelle (Buchholz, Hartmann et al. 2018). Im Laufe der Entwicklung von CAR T-Zellen wurde sowohl die extrazelluläre Domäne verändert, um verschiedene Tumorantigene und somit verschiedene Tumore zu bekämpfen, als auch die intrazelluläre Signalkaskade verstärkt. Der Prototyp und damit der CAR der ersten Generation ähnelt dem TCR mit dem typischen intrazellulären CD3zeta Molekül, welches die T-Zelle aktiviert und den Tumorangriff initiiert. Im Unterschied zum TCR erkennt der scFv-Antikörper auf der Oberfläche unabhängig vom MHC das Tumorantigen und leitet das Signal in die Zelle weiter (Xu, Jin et al. 2018). Der CAR der zweiten Generation mit einem zusätzlichen intrazytoplasmatischen Liganden CD28 verlängert das Überleben der transduzierten Zelle, weil CD28 die klonale Expansion unterstützt und somit die Effizienz der CAR-T-Zellen bei akuter myeloischer Leukämie (AML) verstärkt (Ritchie, Neeson et al. 2013). Die Ko-Stimulation durch CD137 (oder 4-1BB), die mit dem Langzeitüberleben der T-Zellen in Verbindung gebracht wird, hat bei B-Zell Leukämien eine potente Antitumor Aktivität demonstriert (Srivastava, Riddell 2015). Da bei soliden Tumoren weniger Erfolg mit den CAR T-Zellen erreicht wurde und das auf die inhibierenden Tumorantigene wie PD-1 zurückgeführt wurde, hat man zu dem CAR einen weiteren Rezeptor hinzugefügt. Der sog. Switch Rezeptor, der zwar PD-1 bindet, aber in der intrazellulären Domäne ein Aktivierungssignal weiter gibt, hat die Effektivität bei soliden Tumoren erhöht (Liu, Ranganathan et al. 2016). Da bei einigen soliden Tumoren der EGFR oder Her2/neu überexprimiert ist, wurde eine Studie durchgeführt bei der CAR-T-Zellen gegen diese Rezeptoren gerichtet sind. Diese Rezeptoren befinden sich unter anderem auf Lungen-, Pankreas-, Kolorektal- und Brustkrebszellen. Ihre Überexpression geht mit einer schlechten Prognose einher. In-vitro und in-vivo wurden in präklinischen Studien positive Ergebnisse dokumentiert, die nun klinisch bewiesen werden müssen (Yu, S., Li et

al. 2017). Die dritte Generation der CAR-T-Zellen enthält zusätzlich zum CD3zeta Molekül noch zwei weitere Ko-Stimulantien wie CD28, 4-1BB oder OX40 (CD134). In präklinischen Studien beweist die dritte Generation einen Vorteil hinsichtlich der Antitumor Aktivität gegenüber der zweiten Generation (Jackson, Rafiq et al. 2016). Durch die Kombination von CD28 und OX40 mit CD3zeta wurde eine signifikante Verbesserung der antileukämischen Aktivität festgestellt, die bei CD33+ AML eingesetzt worden ist (Marin, Pizzitola et al. 2010). Die gleiche Kombination an intrazellulären Ko-Stimuli der dritten CAR Generation hat ergeben, dass der nach Aktivierung eintretende Zelltod der T-Zellen häufiger verhindert wurde und mehr Memory T-Zellen überlebten. Außerdem wurde beobachtet, dass der dritten Generation im Gegensatz zur zweiten Generation mehr Zytokine gebildet werden, die der Tumorabwehr dienen. Da aber Diskrepanzen zwischen präklinischen und klinischen Studien mit anderen Kombinationen beobachtet wurden, kann nicht allgemein angenommen werden, dass mehr als ein Ko-Stimulus Vorteile bringt. Aus diesem Grund sollte die Anwendung individuell entschieden werden (Heiblig, Elhamri et al. 2015). Die vierte Generation der CAR wird auch TRUCK (engl.: T cell redirected for universal cytokine-mediated killing) genannt und charakterisiert sich dadurch, dass diese CAR T-Zellen Zytokine ausschütten können, wenn sie aktiviert werden. Durch die Ausschüttung dieser Zytokine können TRUCKS das Milieu um den Tumor zu ihrem Vorteil verändern. TRUCKS, die IL-12 ausschütten, verstärken die Aktivierung und locken weitere Immunzellen an, um die Tumorzellen zu eliminieren, die nicht das Tumorantigen tragen, wogegen sich der CAR richtet. Auch Tumorzellen, die ihre Antigene unterdrücken bzw. keine tragen, können so durch NK-Zellen getötet werden, da diese Tumorzellen für die T-Zellen unsichtbar sind und somit ihrem Angriff entgehen. Die TRUCK brauchen zwei Genmodifikationen, einen für den CAR und einen für das Zytokin, das ausgeschüttet werden soll (Chmielewski, Abken 2015). TRUCK sind in der Lage das immunsuppressive Mikromilieu, das sich der Tumor geschaffen hat, zu durchbrechen und es zu einem für Immunzellen zugänglichen Milieu zu verändern. Zusätzlich unterdrückt IL-12 die regulatorischen T-Zellen. In präklinischen Studien wurde so mit TRUCK eine bemerkenswerte Effizienz festgestellt. Da aber schwere Nebenwirkungen beim Einsatz gegen das metastasierende Melanom beobachtet wurden, müssen weitere Studien für die Sicherheit durchgeführt werden oder die Freisetzung anderer Zytokine getestet werden. Weitere Studien mit TRUCK, die

IL-18 ausschütten, wurden durchgeführt und haben ergeben, dass ein ähnlicher Effekt wie mit IL-12 ohne schwere Nebenwirkungen zustande kommt (Tokarew, Ogonek et al. 2018).

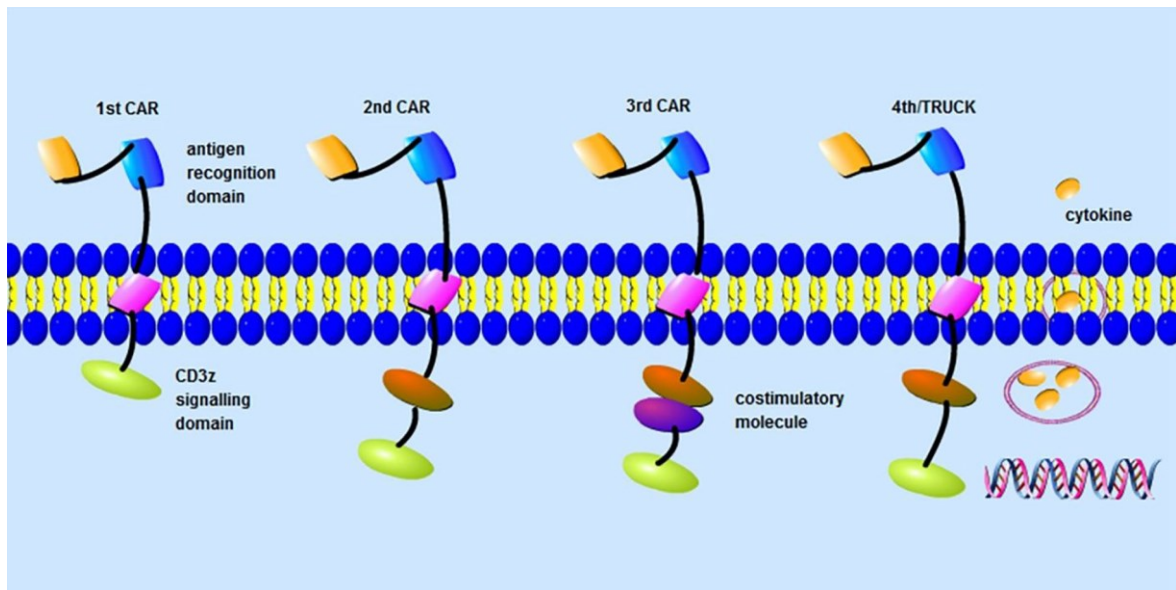


Abbildung 4: CAR Generationen (Buchholz, Hartmann et al. 2018)

### 1.7.3 CD19+ CAR

Das Glykoprotein CD19, welches spezifisch für die B-Zell Linie ist, eignet sich hervorragend als Target der CAR Therapie für maligne Entartungen der B-Zellen und deren Vorläufer. Es ist auch deswegen gut gewählt, weil es fast ausschließlich auf der B-Zell Linie zu finden ist und nicht auf normalen gesunden Gewebezellen vorkommt, vor allem nicht auf der hämatopoetischen Stammzelle. CD19 ist auf Zellen von Lymphomen, manchmal Multiplem Myelom und besonders bei Akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zu finden. Da das CD19 Antigen sich so gut eignet, ist es auch das am intensivsten untersuchte CAR-Konstrukt (Sadelain 2015). Zwischen CD19 und anderen Proteinen besteht keine strukturelle Ähnlichkeit. So kann es zu keiner Kreuzreaktion an anderen Proteinen kommen (Wang, Wei et al. 2012).

Da mittels CAR T-Zellen der ersten Generation nur moderate Erfolge erreicht wurden, weil die klonale Expansion in vivo zu gering ausfiel, wurde mit der zweiten Generation CAR-T-Zellen gegen CD19 bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) eine Pilotstudie gestartet. Der CAR trägt neben CD3zeta noch CD137 als ko-stimulierenden Faktor. Dieser erwies sich in der klinischen Phase als potent und bei zwei von drei PatientInnen mit therapierefraktärer CLL (vortherapiert mit

Rituximab) wurde nach 3 Wochen eine komplette Remission über 10 Monate hinaus erreicht (Porter, Levine et al. 2011). Eine kleine Studie mit zwei Kindern mit ALL ergab eine 100%ige Remission, wobei aber eines der Kinder einen Rückfall erlitt. Die Blasten exprimierten beim Rückfall nicht CD19 und konnten aus diesem Grund nicht von den CD19-CAR-T-Zellen erkannt werden. Weil die Patientenzahl zu gering war, konnte hieraus kein valider Schluss gezogen werden (Grupp, Kalos et al. 2013). Wegen der präliminären Erfolge dieser Pilotstudien wurden weitere Studien mit Erwachsenen und Kindern initiiert. Dabei wurden drei PatientInnen, die mit Blinatumomab vortherapiert wurden und 18 PatientInnen, die einer Stammzelltransplantation unterzogen worden waren und rezidierten eingeschlossen. 27 dieser 30 PatientInnen (90%) haben nach nur einen Monat eine komplette Remission erreicht, darunter zwei mit Blinatumomab und 15 mit Stammzelltransplantation vortherapierte PatientInnen. Bei zwei PatientInnen, deren Liquor mit Blasten befallen waren, wurden CAR-T-Zellen detektiert und nach sechs Monaten waren diese PatientInnen blastenfrei bzw. erlitten keinen Rückfall (Maude, Shannon L., Frey et al. 2014). Auch beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) hat die CAR-T-Zelltherapie selbst bei fortgeschrittener und chemotherapierefraktärer Krankheit Wirkung gezeigt. Von 15 PatientInnen erreichten acht eine komplette und vier eine partielle Remission. Bis dahin war es das erste Mal, dass DLBCL erfolgreich mit der CAR-T-Zelltherapie behandelt wurde. Dieses Resultat zeigt, wie effektiv diese Therapieform gegen B-Zell Malignitäten ist (Kochenderfer, Dudley et al. 2015). Um herauszufinden, mit welcher Medikamentenkombination eine Konditionierung am effektivsten ist, hat man bei non-Hodgkin Lymphomen PatientInnen mit Cyclophosphamid allein und einmal mit Zugabe von Fludarabin vorbehandelt. Man hat herausgefunden, dass die Kombination beider Medikamente einen deutlichen Vorteil gegenüber Cyclophosphamid allein aufweist. Die CAR-T-Zellen vermehrten sich besser, hatten eine längere Lebensdauer und hatten eine höhere Ansprechrate (64% komplette Remission) (Turtle, Hanafi et al. 2016). Es erweist sich als schwer bei stark vortherapierten PatientInnen ein effektives therapeutisches Produkt aus eigenen T-Zellen zu bilden. Deshalb wurde ein Versuch gestartet T-Zellen von SpenderInnen zu benutzen, sog. universelle CAR T-Zellen gegen CD19 (UCART19). Die Schwierigkeit dabei liegt zum Einen an der Umgehung des Immunsystems, welches die fremden Zellen angreift und zum Anderen an einer

effizienten antileukämischen Aktivität der infundierten T-Zellen ohne eine graft-versus-host-disease auszulösen. Diese Problematik löst man einerseits durch Immunsuppression, u.a. mit Alemtuzumab (Anti-CD52, das ausdifferenzierte B- und T-Zellen lysiert), damit das Risiko einer Abstoßung dieser Zellen vermindert wird. Andererseits wird durch eine Endonuklease (TALEN) verhindert, dass die fremden infundierten T-Zellen von Alemtuzumab gehemmt werden, da sie das Gen für CD52 zerschneidet. Eine weitere Endonuklease verhindert die Expression des T-Zell-Rezeptors, womit das Risiko einer GVHD reduziert wird. Diese UCART19 wurden bei zwei Kindern mit Rezidiv einer Hoch-Risiko ALL bzw. einer Leukämie gemischter Linienzugehörigkeit erfolgreich eingesetzt und beide Kinder waren noch ein Jahr nach der Therapie krankheitsfrei (Qasim, Zhan et al. 2017). Über einen Zeitraum von sechs Jahren (2010-2016) wurden in einer Langzeitstudie 53 erwachsene PatientInnen mit Rezidiv oder therapierefraktärer B-Zell ALL nachverfolgt, die mit der CAR Therapie behandelt wurden. Zu einer kompletten Remission kam es bei 83% der PatientInnen. Dabei kam außerdem heraus, dass PatientInnen mit einer geringeren Krankheitslast (kleinere Tumormasse bzw. weniger Blasten) auch weniger schwere Nebenwirkungen wie das Zytokin Release Syndrom (CRS) aufwiesen als PatientInnen mit hoher Krankheitslast. Das mediane Überleben beträgt dabei 12,9 Monate, bei denen mit geringer Krankheitslast sogar 20,1 Monate (Park, Rivière et al. 2018). 43 Kinder und junge Erwachsene wurden hinsichtlich Phänotyps, Funktion und Vermehrung der CAR-T-Zellen in Bezug zum therapeutischen Erfolg untersucht. Dabei hat man herausgefunden, dass initiale Fehler auf die mangelhafte Vermehrung und schnelle Abnahme der CAR-T-Zellen zurückzuführen sind. Die Dauer der Remission korrelierte dabei mit einer erhöhten Anzahl von TNF-alpha sekretierenden CAR-T-Zellen, ist aber auch von einer hohen Präsenz des CD19 Antigen im Körper des Patienten / der Patientin abhängig, weil die Aktivierung und Vermehrung der CAR-T-Zellen sonst darunter litten und der Antitumoreffekt nicht zur Geltung kommen konnte (Finney, Brakke et al. 2019). Die Modifikation von T-Zellen im Rahmen dieser Therapieform ist bis vor kurzem nur für wenige spezielle Zentren mit der entsprechenden Infrastruktur und notwendigen Expertise vorbehalten gewesen. Um diese Therapieform zugänglicher zu machen und die vielen Teilprozesse zu vereinfachen, hat Miltenyi Biotec den CliniMACS Prodigy entwickelt, der die Schritte von der Isolation der T-Zellen aus dem Leukapheresat

über die Transduktion des Gens bis hin zur Vermehrung der CAR-T-Zellen in einem geschlossenen System durchführt. Zu mehreren Zeitpunkten vor, während und nach dem Herstellungsprozess wird mit geeigneten Kontrollen die Qualität der Zellen überprüft. Die Transduktion, Vermehrung und Funktion der generierten T-Zellen sind mit den existierenden Verfahren nach (Mock, Nickolay et al.) vergleichbar.

#### **1.7.4 Nebenwirkungen**

Generell kommen Nebenwirkungen wie Schüttelfrost, Fieber, Hypotension und Leukopenie vor, welche aber keine große Gefahr darstellen und einfach zu therapieren sind. Die häufigste und potenziell schwerwiegendste Nebenwirkung bei der CAR-T-Zelltherapie ist das Zytokin Release Syndrom (CRS). Es handelt sich dabei um eine übermäßig hohe Ausschüttung von Zytokinen und ihre Auswirkung auf den Körper, die sich als systemische Entzündungsreaktion manifestiert, so wie sie bei einer schweren Infektion stattfinden kann. Eine große Anzahl an T-Zellen wird aktiviert und eine Immunantwort initiiert, die zu einer exzessiven Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, sowie einer Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Immunzellen führt. Das kann so weit führen, dass viszerale und vaskuläre Endothelschäden, Herzstillstand, Lungenödem und Lungenversagen entstehen können. Klinisch zeigt es sich unter anderem an Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen, Hypotension und im Labor zeigt sich eine Erhöhung der Serum Aminotransferase bzw. Bilirubin (Wei, Ding et al. 2017). IFN-gamma, TNF-alpha und IL-6 sind die Zytokine, die bei den meisten PatientInnen mit CRS erhöht sind, wobei vor und nach der Infusion der CAR-T-Zellen normalerweise IFN-c, TNF-a, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, GM-CSF und MIP-1 monitorisiert werden, um das CRS frühzeitig zu erkennen und zu therapieren. Wenn vor der Therapie die Zytokine bereits erhöht sind, kann es früher und stärker zum Ausbruch des CRS kommen, aber in der Regel ist vom 6.-22. Tag nach der Infusion der CAR-T-Zellen mit dem CRS zu rechnen (Wei, Ding et al. 2017). Therapeutisch kommen hier zum einen Kortikosteroide und zum anderen Zytokinantagonisten zum Einsatz. Durch die Steroidbehandlung hofft man die notwendige Entzündungsreaktion der T-Zellen zu unterbinden. Kurzwirksame Steroide erweisen sich als Mittel der Wahl, weil sich

die Symptome bessern, ohne die Proliferation und Effektivität der CAR-T-Zellen zu minimieren. Zytokine direkt als Ziel zu verwenden und an der Entfaltung ihrer Wirkung zu hindern, wird durch Zytokinantagonisten erreicht. IL-6 ist an vielen proinflammatorischen Prozessen beteiligt und kann direkt durch Tocilizumab inhibiert werden, sowohl isoliert als auch an Zellen gebunden. Tocilizumab setzt die Wirkung von IL-6 schnell und effektiv herab und hebt die Symptome des CRS auf (Maude, S. L., Barrett et al. 2014). In einem Dosisescalationsversuch hat man vorgeschlagen die Dosis für die CAR-T-Zell Infusion auf  $1 \times 10^6$  Zellen/kg Körpergewicht festzulegen, um die Sicherheit des Medikaments zu gewährleisten und weil mit einer Dosis von  $3 \times 10^6$  häufiger dosislimitierende Nebenwirkungen wie CRS Grad 3 und 4 auftraten (Lee, Kochenderfer et al. 2015).

Eine weitere potenzielle schwere Nebenwirkung ist das CAR-T Zell verbundene Enzephalopathie Syndrom (CRES), welches meist innerhalb der ersten 28 Tage nach Infusion auftritt. Es ist zwar noch nicht gänzlich erklärt wie es zu der Enzephalopathie kommt, aber CAR-T-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke übertreten. Zu den Symptomen zählen u.a. Verwirrung, Desorientierung, Wortfindungsstörung, Aphasie, Schläfrigkeit, Hirnödem und Krampfanfälle, die allesamt durch therapeutische Maßnahmen reversibel sind. Es ist mit dem CAR-T-Zell Peak im Blut oder mit zu hoher Dosis assoziiert und kann nur durch Blut-Hirn-Schranke-gängige Medikamente wie Dexamethason behandelt werden (Hopfinger, Jäger et al. 2019).

Da B-Zellen und ihre Vorläufer das CD19 Antigen tragen, ist zu erwarten, dass es zur B-Zell Aplasie kommt. Da B-Zellen aber für die Antikörperbildung zuständig sind, kann es bei längerer Abwesenheit zu häufigeren Infektionen kommen. Die Aplasie dauert nur so lange, wie die CAR-T-Zellen aktiv sind, was in der Regel bis zu einem halben Jahr dauern kann. Weil die Stammzellen nicht betroffen sind, können die B-Zellen wiederhergestellt werden. Therapiert wird die Aplasie zwischenzeitlich mit Antibiotikagabe oder Infusionen mit Immunglobulinen. (Davila, Sadelain 2016)

### **1.7.5 Zukunftsaussichten**

Die Studien zu gentechnisch veränderten T-Zellen haben gezeigt, dass selbst bei therapierefraktärem Krebs ein Therapieansprechen möglich ist. Diese zuvor

chancenlosen PatientInnen haben dadurch eine neue Perspektive. Der Prozess ist durch die Verbesserung des CAR-Konstrukts weiter fortgeschritten, darunter das am besten untersuchte CD19-CAR. Da man aber noch nicht zur Gänze alle Parameter bestimmt hat und das Verfahren noch nicht optimal wirkt, bedarf es noch weiterer Forschung. In B-Zell Malignitäten wie Leukämien und Lymphomen hat sich die CAR-Therapie als äußerst wirksam erwiesen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass andere hämatologische Malignitäten in Zukunft auch mit dem Verfahren therapiert werden können. Eine wichtige Aufgabe ist das Auffinden eines geeigneten Tumorantigens. Aber auch neue Schwierigkeiten entstehen, wie der Verlust des Antigens CD19 während der Therapie, was zur Folge hat, dass die CD19 CAR-T-Zellen nicht mehr wirken (Sadelain, Rivière et al. 2017). Das Problem an CD19 ist, dass es nicht für das Überleben der B-Zell-Linie von Bedeutung ist bzw. nicht davon abhängt, sodass das Risiko für einen Rückfall mit CD19 negativer ALL steigt (Weiland, Pal et al. 2016). Es wurde schon mit CAR-T-Zellen, die das Antigen CD22 erkennen, eine Studie durchgeführt, weil der Verlust des CD19 Antigens oder das fehlende Ansprechen der CD19+ CAR-T-Zellen wiederkehrend aufgetreten ist bzw. der Tumor resistent geworden ist. Weil CD22 in den meisten Fällen auch von B-ALL exprimiert wird, lag der Gedanke nahe dagegen ein CAR zu entwickeln. Es wurde an 21 Kindern und Erwachsenen (17 mit CD19-CAR vorbehandelt) angewendet. Dabei kam es zu einer kompletten Remission bei 73% der PatientInnen (Fry, Shah et al. 2018). Einen weiteren Lösungsansatz gegen CD19 negative hämatologische Malignitäten stellt ein sog. CD19 Fusionsprotein dar, das neben CD19 auch andere Oberflächenmerkmale wie das HER2 erkennt. So erkennt das Fusionsprotein maligne Zellen, die CD19+ und CD19-/Her2+ sind (Klesmith, Su et al. 2019).

Auch bezüglich der next-Generation CAR-T-Zellen gibt es Innovationen unter dem Gesichtspunkt solider Tumore. Um mehrere Tumorklone zu erkennen und um Antigen-negative Rezidive in der Therapie zu verhindern, werden zunehmend multiple Antigene angezielt. Um dann noch gesunde Körperzellen auszuschließen, die eins der Antigene auf sich tragen, hat man Konzepte entwickelt, die nur dann die Antitumoraktivität induzieren, wenn beide Antigene gebunden sind. Oder diese CAR-T-Zellen werden nicht aktiviert, wenn eine bekannte Antigenkombination auf gesunden Zellen erkannt wird. Die Erkenntnis, dass mit stärkerer Antitumoraktivität auch die starken Nebenwirkungen steigen, hat dazu geführt,

dass das Einschleusen von einem Suizidschaltergen, das wie ein Schalter für die Aktivität zuständig ist, sinnvoll erscheint. Die CAR-T-Zellen sind nur so lange aktiv bis man ein Medikament, welches kontinuierlich während der Therapie verabreicht wird, absetzt. Suizidschalterproteine beenden dann die Immunreaktion nach abgeschlossener Tumorbekämpfung, indem die Apoptose dieser Zellen ausgelöst wird, sobald kein Medikament mehr an ihnen gebunden ist. Solide Tumore haben Oberflächenproteine oder sekretieren Zytokine, die an inhibitorischen Rezeptoren von T-Zellen binden, sodass die Antitumoraktivität unterdrückt wird. Nukleasen, die unerwünschte Gene für inhibitorische Rezeptoren zerstören, bilden einen neuen Ansatz für solide Tumore, die Zytokine in ihre Umgebung abgeben. In Zukunft muss aber auch die Verfügbarkeit dieser Therapie weiterverbreitet und die Kosten minimiert werden. Das geschlossene System CliniMACS Prodigy von Miltenyi Biotec ist ein Schritt in die richtige Richtung (Charrot, Hallam 2019).

## **2 Material und Methoden**

T-Zell Transduktionen wurden mit Apheresaten von freiwilligen SpenderInnen in einem S2 Reinraumlabor in der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin (UBT) Graz mit dem CliniMACS Prodigy® durchgeführt. Die Qualitätskontrollen wurden im S2- und S1-Bereich der UBT durchgeführt.

Die erforderliche Anmeldung von erstmaligen Arbeiten mit GVM in der Sicherheitsstufe 2, gemäß § 19 Z 2 Gentechnikgesetz (GTG, BGBl. Nr. 510/1994, idF BGBl. I Nr. 126/2015) wurde beim Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (BmWF) durchgeführt und zur Kenntnis genommen. Leukapheresate wurden von freiwilligen SpenderInnen an der UBT gewonnen.

### **2.1 T-Zell Transduktion**

Für die Herstellung der gentechnisch veränderten T-Zellen werden diese aus den Blutzellen (Leukapheresat, Buffy Coat oder Gesamtblut) mittels magnetischer Separation isoliert und dann mit einem lentiviralen Vektor transduziert, der das anti-CD19 CAR Konstrukt enthält. Die transduzierten T-Zellen werden anschließend in-vitro expandiert. Alle Schritte der Generierung der genetisch veränderten T-Zellen (Isolierung der T-Zellen mittels magnetischer Antikörperseparation, Transduktion der T-Zellen mit lentiviralem Vektor und Expansion der T-Zellen) werden in einem geschlossenen, automatisierten System, dem CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen der Etablierung des Herstellprozesses werden die CAR T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression und ihres Phänotyps mittels Durchflusszytometrie und PCR analysiert.

#### **2.1.1 CliniMACS Prodigy®**

Der von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) entwickelte CliniMACS Prodigy® ermöglicht diverse Manipulationen von Zellen in einem geschlossenen System. Dies beinhaltet Zellpräparationen, Zellseparationen, Zellkultur, Zentrifugation, Mikroskopie, Fotografie und Dokumentation.



Abbildung 5: CliniMACS Prodigy™ (<https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/cell-manufacturing-platform/clinimacs-prodigy/clinimacs-prodigy-instrument/clinimacs-prodigy-r.html>) mit Tubing Set

Die einzelnen Komponenten des Gerätes sind:

- Quetschventile
- Flüssigkeitssensoren
- Peristaltische Pumpe
- Magneteinheit (zur Selektion von markiertem Zellmaterial)
- CentriCult Unit (Zentrifugation, Volumenreduktion, Gradientenseparation, Zellkultur, Flüssigkeitsaustausch)
- Kameras
- Mikroskop mit Autofokus-Funktion
- Peltier-basiertes Heiz-/Kühlsystem
- Gas Mix Unit (Intervallmäßige Mischung von Druckluft und CO<sub>2</sub>)
- Touch Screen mit Graphic User Interface (GUI)
- Schlauchschweißgerät
- Barcode Reader

## 2.1.2 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 0

### 2.1.2.1 Vorbereitungen

Die vorbereitenden Arbeiten für die Herstellung von CAR-T-Zellen finden in einer Laminar Air Flow der Klasse A im Reinraum der Klasse B statt. Es handelt sich um den Prozesspuffer (CliniMACS PBS/EDTA; 0,5 % HSA) für die magnetische

Separation der T-Lymphozyten und um das Prozessmedium (TexMACS™ GMP Medium; MACS GMP Recombinant Human IL-7; MACS GMP Recombinant Human IL-15) für die Kultivierung der T-Lymphozyten nach Anreicherung und Qualitätskontrolle.

Der sich im S2-Labor der Reinraumklasse B befindliche CliniMACS Prodigy™ initialisiert sich nach Einschalten automatisch. Mit der Auswahl des Prozesses wird die Installation des Tubing Sets gestartet. Hier führt das GUI (graphical user interface) Schritt für Schritt durch die Installation des Tubing Sets.

Dieses beinhaltet:

- Schläuche
- Filter
- Waste Bag
- Non-Target Cell Bag
- Target Cell Bag
- Separationssäule
- Vorsäule
- Reapplication Bag mit QC Bag
- QC-Beutel
- Filtration Bag
- Application Bag
- Heat Exchange Cartridge (HEC)
- Pump Tubing
- CentriCult Unit

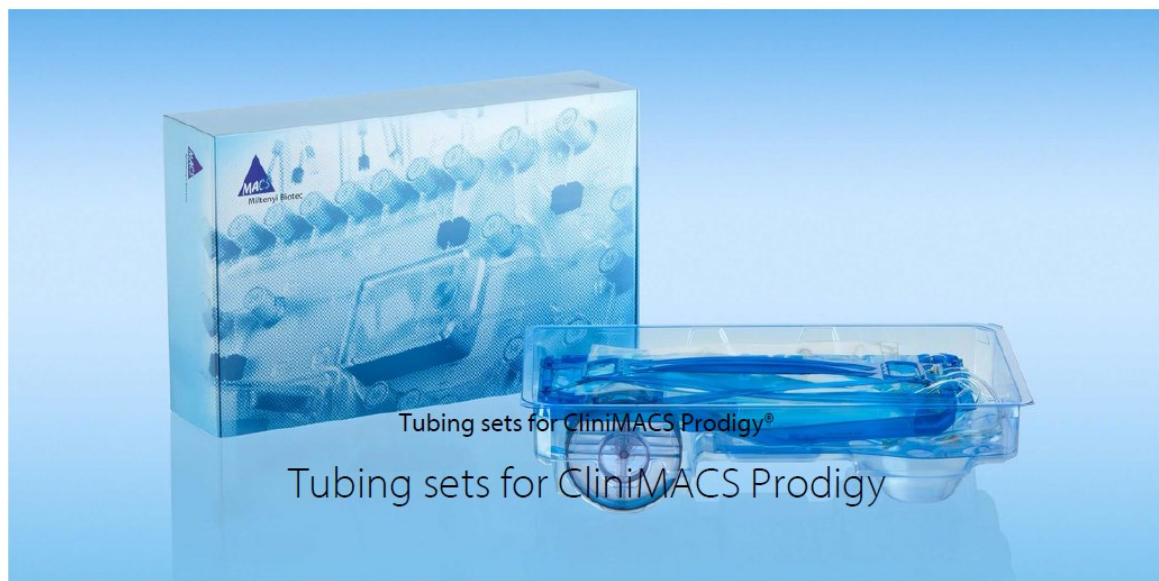


Abbildung 6: Tubing Set für den CliniMACS Prodigy™ (<https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/cell-manufacturing-platform/clinimacs-prodigy/tubing-sets-for-the-clinimacs-prodigy-instrument.html>)

Nach Kontrolle der installierten Komponenten des Sets (Kammer, HEC, Tubingkanäle, Halterungen für die Beutel, Klemmen der QC Bags, Ventile, Flüssigkeitssensoren) werden Integritätstestungen zur Sicherstellung der korrekten Installation durchgeführt.

Mittels Sterilkonnection werden Prozessmedium und Prozesspuffer an das Tubing Set angeschlossen. Durch „Priming“ werden alle Schläuche gespült. Auch hierbei wird die korrekte Installation des Tubing Sets überprüft.

### **2.1.2.2 Anreicherung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Das Ausgangsmaterial (Apheresat) wird nach Leukapherese und Qualitätskontrolle (Zellzahl und Zellcharakterisierung) steril an den „Application Bag“ konnektiert und in diesen überführt. Das Probenmaterial wird im Beutel filtriert, um eventuell vorhandene Agglomerate zu entfernen. Das Volumen des Apheresats darf 50 ml nicht unter- und 280 ml nicht überschreiten. Die maximale CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl ist  $3 \times 10^9$ .

Nach Überführung des Ausgangsmaterials in die Kammer der CentriCult Unit wird eine Erythrozytenreduktion durchgeführt. Die Zellen werden gewaschen und zur Anreicherung vorbereitet.

Die Anreicherung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten erfolgt über die Markierung der Zielzellen durch Antikörper, die an Beads gebunden sind. Nach Inkubation werden die Zellen erst durch eine Vorsäule, dann durch die Hauptsäule geführt. Ein Magnet wird aktiviert, der alle an diese Antikörperbeads gebundenen Zellen in der Säule fixiert, während alle ungebundenen Zellen in den Non-Target-Beutel entsorgt werden. Die Säule wird mit Puffer gewaschen. Danach wird der Magnet inaktiviert, die Zellen werden von der Säule getrennt und in einen Reapplication Bag gepumpt.

### **2.1.2.3 Start der Kultur und Aktivierung der Zellen**

Am Ende der Anreicherung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten und vor Beginn der Kultivierung wird eine Probe zur Qualitätskontrolle (Zellzahl, Zellcharakterisierung) aus dem Reapplikationsbeutel entnommen. Die Parameter „Konzentration von CD3<sup>+</sup> Zellen“ und „Gesamtzellzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen für die Kultivierung“ sind für den Start der Kultur nötig. Die empfohlene Gesamtzellzahl an CD3<sup>+</sup> Zellen für die Kultivierung liegt zwischen  $30 \times 10^6$  und  $100 \times 10^6$ . Das Probenvolumen wird nach Eingabe der gewünschten Parameter automatisch berechnet.

Die Aktivierung der T Lymphozyten erfolgt über CD3/CD28 Antikörper (MACS GMP T-Cell TransAct™), die an eine 100nm Polymer-Nanomatrix gebunden sind (Interaktion des TCR/CD3 Komplexes mit MHC Molekülen von antigen-präsentierenden Zellen und Ko-Stimulation über CD28).

Anhand einer Activity Matrix werden die vom Gerät durchzuführenden Aktivitäten (Transduktion, kompletter Mediumwechsel, Aktivierung des Schüttlers, Teilmediumwechsel) für den gesamten Verlauf der Kultur festgelegt. Die Kultivierung der Zellen findet mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C statt.

### **2.1.3 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 1**

Am Tag 1 nach Kulturstart werden zur Kontrolle und Beurteilung der Zellen mikroskopische Fotos angefertigt.

Danach wird die T-Zell Transduktion durchgeführt, indem der lentivirale Vektor nach Auftauen steril an das Tubing Set angeschlossen wird.

#### **2.1.4 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 2**

Am Tag 2 nach Kulturstart werden zur Kontrolle und Beurteilung der Zellen mikroskopische Fotos angefertigt.

Der Waste Bag wird entfernt und gemäß S2-Richtlinien entsorgt und durch einen neuen Beutel ersetzt.

#### **2.1.5 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 3**

Am Tag 3 nach Kulturstart werden zur Kontrolle und Beurteilung der Zellen mikroskopische Fotos angefertigt.

Beim „Culture Wash“ wird das gesamte Medium durch frisches Medium ersetzt.

Dies dient vor allem der Abreicherung des lentiviralen Vektors.

#### **2.1.6 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 5**

Zur Durchführung einer Intraprozess Kontrolle (IPC) wird eine Probe aus der Zellkultur für die Kontrolle von Zellzahl, Zellcharakterisierung, Transduktionseffizienz und Endotoxin entnommen.

Weiters wird ein neues Prozessmedium hergestellt und steril an das Tubing Set angeschlossen. Der Waste Bag wird ausgetauscht.

#### **2.1.7 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 9**

Am Tag 9 wird der Waste Bag ausgetauscht.

#### **2.1.8 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 10**

Zur Durchführung einer Intraprozess Kontrolle (IPC) wird eine Probe aus der Zellkultur entnommen. Die Probe dient der mikrobiologischen Kontrolle.

## **2.1.9 Herstellung von CAR-T-Zellen – Tag 12**

Die Herstellung des Formulierungspuffers zur Ernte der kultivierten Zellen (Composol PS; 2,5 % HSA), des Formulierungspuffers zur Herstellung des Arzneimittels (Composol PS; 2,5 % HSA) und des Formulierungspuffers zur Kryokonservierung von Rückstellproben (Composol PS; 10 % HSA; 10 % DMSO) erfolgt unter einem Laminar Air Flow der Klasse A im Reinraum der Klasse B.

### **2.1.9.1 Ernte der Zellen**

Nach Ende der Kultivierung wird der Formulierungspuffer zur Ernte der kultivierten Zellen an das Tubing Set angeschlossen. Der Waste Bag wird ausgetauscht. Die Ernte wird gestartet. Der CliniMACS Prodigy™ wäscht die Zellen und reichert sie an, so dass am Ende 100 ml Zellsuspension übrigbleiben.

Proben für die Qualitätskontrolle (QC) werden aus dem Target Cell Bag entnommen und für Zellzahl, Zellcharakterisierung, Transduktionseffizienz, Endotoxin-Testung, Mykoplasmen-Testung, Analyse der Vector Copy Number (VCN) und Mikrobiologie verwendet.

### **2.1.9.2 Ende des Prozesses am CliniMACS Prodigy™**

Das Tubing Set wird vom Gerät entfernt, alle restlichen Beutel werden abgeschweißt, das Schlauchsystem aus den Ventilen und der Pumpe entfernt. Alle Teile werden gemäß den Bestimmungen für Arbeiten im S2-Labor entsorgt. Der Prozess mit allen Daten und Fotos wird mittels USB-Sticks vom CliniMACS Prodigy™ transferiert.

Nach Ausschalten des Gerätes wird es gereinigt und desinfiziert.

### **2.1.9.3 Formulierung des Wirkstoffs**

Voraussetzungen für die patientInnenspezifische Formulierung des Wirkstoffs sind die durchflusszytometrische Analyse (Zellzahl, Zellcharakteristik, Transduktionseffizienz), das Gewicht des Empfängers / der Empfängerin und die gewünschte Zellzahl/kg Körpergewicht. Die Berechnung von Konzentration und Volumen des Arzneimittels erfolgt im Vier-Augen-Prinzip gemeinsam mit dem

verantwortlichen Arzt/der verantwortlichen Ärztin. Der Beutel mit dem Zellprodukt wird mit Herstellungsinformation, -datum und Unterschrift gekennzeichnet. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter einem Laminar Air Flow der Klasse A im Reinraum der Klasse B.

#### **2.1.9.4 Rückstellproben**

Rückstellproben werden mit dem Formulierungspuffer zur Kryokonservierung lt. Vorgaben der ärztlichen Leitung hergestellt, kontrolliert mittels Einfriergerätes (Icecube) tiefgefroren und anschließend in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2 Qualitätskontrolle: Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen dient der Bestimmung der Konzentration CD3 positiver T-Lymphozyten und deren Vitalität, sowie der Feststellung der Transduktionseffizienz und Identität von CD19 CAR transduzierten T-Zellen. Die Transduktionseffizienz wird bestimmt durch die Messung von CD19 CAR+ Zellen pro CD3+ T-Zellen.

Zusätzlich wird die Zellzusammensetzung durch Identifikation und Zählung von humanen Leukozyten (CD45+ Zellen), Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, B-Zellen und CD56+CD16+ Zellen, sowie CD4+, CD8+ und CD56+/CD3+ T-Zell Subpopulationen bestimmt.

Die Analyse erfolgt durch die Single Platform Methode mit dem Beckman Coulter CytoFLEX Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) nach Lyse der Erythrozyten. Absolute Zellzahlen werden volumetrisch bestimmt, automatisch berechnet und als Counts/ $\mu$ l für jede Population angegeben.

Die Vitalität der Zellen wird durch die 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) -Färbung von nicht-vitalen Zellen bestimmt.

Eine durchflusszytometrische Analyse dient der Charakterisierung von Zellen anhand spezifischer Merkmale. Antikörper, die mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, werden gemeinsam mit dem Untersuchungsmaterial inkubiert. In einem Durchflusszytometer werden die Zellen

durch hydrodynamische Fokussierung in einen Einzelzellstrom gebracht und passieren einen Laserstrahl. Dabei entstehen Streulicht und Fluoreszenzsignale, die von einem Detektor ausgewertet werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) hängt von der Granularität der Zelle ab. Fluoreszenzsignale entstehen durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels Lasers. Durch Filter werden die Signale auf die Detektoren aufgeteilt.

Die Optischen Komponenten des CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) sind

- die optische Bank mit Laser, Lichtstrahlkombination, Durchflusszelle
- Detektoren (WDM = Wavelength division multiplexer): Jede WDM gehört zu einem Laser und enthält optische Filter.
- Glasfaserleiter, welche emittierte Fluoreszenz übertragen.

Akquisition und Auswertung der Signale erfolgen mit der Software CytExpert Version 2.0.0.153 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien).

Die Probenaufbereitung für die Analyse erfolgt je nach Sicherheitsstufe der Probe im S2- bzw. S1-Labor.

Die Bestimmung wird mit folgenden Proben durchgeführt:

- Mit dem Ausgangsmaterial (Leukapheresat) am Tag 0
- Mit Zellen nach Anreicherung durch den CliniMACS Prodigy™ (CD4+ und CD8+ T-Zellen) am Tag 0
- Als Intra-Process-Control während der Expansionsphase der Zellen am Tag 5
- Mit dem genetisch modifizierten T-Zell Produkt am Tag 12

Alle Reagenzien und Einmalartikel für die durchflusszytometrische Analyse von CAR-T-Zellen mit dem CytoFLEX Durchflusszytometer werden von Miltenyi Biotec GmbH bezogen.

### 2.2.1 Vorbereitung der Reagenzien

Für die Probenpräparation werden folgende Reagenzien vorbereitet:

- PEB (1X PBS/1 mM EDTA/0,5 % BSA)
- RBCL (1X Red Blood Lysis Solution)
  
- Antikörper-Stockmix für die Analyse der zellulären Zusammensetzung (anti-CD3 FITC, anti-CD16 PE, anti-CD56 PE, 7-AAD, anti-CD19 PE Vio770, anti-CD14 APC, anti-CD8 APC Vio770, anti-CD45 VioBlue, anti-CD4 VioGreen)
- Antikörper-Stockmix für die Feststellung der Transduktionseffizienz (anti-CD3 FITC, 7-AAD, anti-CD14 APC, anti-CD8 APC Vio770, anti-CD45 VioBlue, anti-CD4 VioGreen)

### 2.2.2 Durchführung der Zellpräparation

Für die Analyse der zellulären Zusammensetzung werden 100 µl Probenmaterial (max.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) mit 100 µl Antikörper-Stockmix gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach der Färbung wird 1X Red Blood Cell Lysis Solution zugefügt und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Als Kontrolle dient eine ungefärbte Zellprobe.

Für die Analyse der Transduktionseffizienz werden 100 µl Probenmaterial (max.  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) mit 10 µl CD19 CAR Detection Reagent-Biotin gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach der Färbung werden die Zellen zweimal mit PEB gewaschen (1000 µl PEB hinzufügen, 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 300 x g zentrifugieren, Überstand dekantieren). Das Zellpellet wird mit 2 µl anti-Biotin und 98 µl Antikörper-Stockmix resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (dunkel) werden die Zellen einmal mit PEB gewaschen und das Zellpellet in 2000 µl 1x Red Blood Cell Lysis Solution resuspendiert.

Zur Kontrolle der Spezifität wird zusätzlich eine FMO-Färbung (Fluorescence Minus One) durchgeführt, in dem eine Zellprobe mit allen Antikörpern außer anti-CAR-Biotin gefärbt wird.

Die Proben am Tag 5 des Herstellungsprozesses werden modifiziert präpariert, da der lentivirale Vektor noch nicht gänzlich abgereichert ist. Abweichend von den vorher beschriebenen Protokollen wird bei diesen Proben Inside Fix (3,7 % Formaldehyd) als Fixativ anstelle von 1X Red Blood Cell Lysis Solution eingesetzt.

Bis zur Messung werden die Proben bei 2 – 8°C gelagert. Die Messung am Durchflusszytometer muss innerhalb einer Stunde erfolgen.

### 2.2.3 Gating Strategie

Zelluläre Zusammensetzung:

Plot	X-Achse	Y-Achse	Gating auf	Region
1	FSC-H	SSC-H	All Events	Debris exclusion
2	CD45-VioBlue-H	SSC-H	Debris exclusion	CD45+ cells
3	CD56 PE/CD16 PE-A	7-AAD-A	CD45+ cells	Viable cells
4	FSC-A	CD3 FITC-A	Viable Cells	CD3+ cells CD3- cells
5	CD56 PE/CD16 PE-A	CD3 FITC-A	CD3+ cells	T cells NKT cells
6	CD4 VioGreen-A	CD8 APC-Vio770-A	T cells	CD4+ cells CD4-/ CD8- cells CD8+ cells CD4+/ CD8+ cells
7	CD19 PE-Vio770-A	CD14 APC-A	CD3- cells	Monocytes CD14-/ CD19- cells B cells
8	CD56 PE/CD16 PE-A	SSC-A	CD14-/ CD19- cells	CD56+/ CD16+ cells Neutrophils Eosinophils
9	FSC-A	CD 3 FITC-A	CD45+ cells	All CD3+ cells linked to CD3+ cells
10	CD56 PE/CD16 PE-A vs.	7-AAD	CD3+ cells	All viable CD3+ cells linked to viable cells
11	Time		All events	

Transduktionseffizienz:

Plot	X-Achse	Y-Achse	Gating auf	Region
1	FSC-H	SSC-H	All events	Debris exclusion
2	CD45-VioBlue-H	SSC-H	Debris exclusion	CD45+ cells
3	CAR PE-A	7-AAD-A	CD45+ Zellen	Viable cells
4	FSC-A	CD3 FITC-A	Viable Cells	CD3+ cells CD3- cells
5	CAR PE-A	CD3 FITC-A	CD3+ cells	CAR- cells CAR+ cells
6	CD4 VioGreen-A	CD8 APC-Vio770-A	CAR+ cells	CD4+ cells CD4-/ CD8- cells CD8+ cells CD4+/ CD8+ cells
7	CD4 VioGreen-A	CD8 APC-Vio770-A	CAR- cells	CD4+ cells CD4-/ CD8- cells CD8+ cells CD4+/ CD8+ cells
8	PE-Vio770-A	CD14 APC-A	CD3- cells	Monocytes
9	Time		All events	

Die mit Microsoft Excel erstellten Berechnungen enthalten Zellen/ $\mu\text{l}$  und prozentuelle Verteilung.

#### **2.2.4 Auswertung**

Berechnet wird der prozentuelle Anteil an Subpopulationen bezogen auf alle CD45+ Leukozyten und die Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$ . Der Verdünnungsfaktor, der durch die Aufbereitung der Probe entsteht (Verdünnungsfaktor), wird einberechnet. Wird das Zellmaterial vor Durchführung der Färbung verdünnt, wird auch dieser Vorverdünnungsfaktor mitberechnet. Alle Berechnungen erfolgen mit Microsoft Excel nach Export der Datentabelle.

##### Berechnungen:

- Verdünnungsfaktor = Vorverdünnungsfaktor x ( $2000\mu\text{l}$  Färbevolumen/ $100\mu\text{l}$  Probenvolumen)  
D.h. ohne Vorverdünnung des Zellmaterials entsteht durch die Färbung ein Verdünnungsfaktor von 20, mit dem die Zellzahl/ $\mu\text{l}$  multipliziert werden muss.
- Kalkulation der Zellkonzentration/ml:  
 $\text{Zellen/ml} = \text{Zellen}/\mu\text{l} * 1000$
- Gesamt-CD3<sup>+</sup> Gehalt =  $\text{CD3}^+ /\text{ml} * \text{Gesamtvolumen}$
- CAR<sup>+</sup> Konzentration (Zellen/ml) =  $\text{vitale CD3}^+/\text{ml} * (\text{Frequenz CAR}^+ \text{ pro vitale CD3}^+/100)$
- Gesamt-CAR<sup>+</sup> Gehalt =  $\text{CAR}^+ /\text{ml} * \text{Gesamtvolumen}$

### **2.3 Qualitätskontrolle: Mikrobiologie**

Die mikrobiologische Kontrolle der transduzierten Zellen mit BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials und BACTEC™ Plus Anerobic/F Culture Vials (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) wird am Tag 10 der Kultur und am Ende der Kultur (Tag 12) durchgeführt.

Proben werden hierfür in die Kulturflaschen injiziert und 7 Tage im BD BACTEC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) Blutkultursystem inkubiert.

Sind Mikroorganismen im Blut vorhanden, setzen sie Nährstoffe aus dem Kulturmedium um und geben  $\text{CO}_2$  als Stoffwechselprodukt ab. Ein Farbstoff im

Sensor reagiert mit CO<sub>2</sub> und verändert die Lichtmenge, die vom Fluoreszenzmaterial im Sensor aufgenommen wird. Die Fotodioden des Gerätes messen die Fluoreszenzkonzentration, die der von den Erregern abgegebenen Menge an CO<sub>2</sub> entspricht. Diese Messung wird anschließend vom Gerät entsprechend der voreingestellten Parameter für einen positiven Befund interpretiert. Die Analyse dient der qualitativen Feststellung von An- bzw. Abwesenheit aerober bzw. anaerober Mikroorganismen und als Quality Control (QC).

### **2.3.1 Inokulation**

Die Beimpfung der Kulturflaschen erfolgt unter dem Laminar Air Flow der Klasse A in einem Reinraum der Klasse B.

4 ml Probe werden in einem 50 ml Probengefäß mit 12 ml PBS leicht schwenkend vermischt. Je 8 ml Probe werden mit einer Einmalspritze in die aerobe und in die anaerobe Kulturflasche injiziert.

### **2.3.2 Inkubation**

Die beiden Kulturflaschen werden mittels Barcodes in das Gerät BD BACTEC eingelesen und in die vom Gerät vorgegebenen Positionen gelegt. Die Inkubation beginnt und dauert 7 Tage. Ist eine Probe positiv, wird das sofort vom Gerät angezeigt. Die Probe kann entnommen und zur Klassifizierung an das Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz gesandt werden. Wird die Probe bis zum 7. Inkubationstag nicht positiv, kann sie negativ gewertet und ausgelesen werden.

## **2.4 Qualitätskontrolle: Endotoxin-Testung**

Endotoxine von gramnegativen Bakterien (Lipopolysacchariden) verursachen toxische Reaktionen und werden von Kontaminationen pharmazeutischer Produkte mit Pyrogenen verursacht. Ihre pyrogene Aktivität ist wesentlich höher als jene anderer pygener Substanzen. Der Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) Test basiert auf der Aktivierung von Koagulase in Blutzellen (Amöbozyten) der Pfeilschwanzkrebse in Anwesenheit von Endotoxin.

Durchgeführt wird die Testung von der Core Facility Imaging des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMF) Graz an den Tagen 5 und 12 des Herstellungsprozesses von CAR-T-Zellen zur Qualitätskontrolle. Als Probenmaterial wird Zellkulturüberstand verwendet.

Verwendet wurde der Clot-gel Assay, da es bei photometrischen (turbidmetrischen und chromogenen) Methoden zu Interferenzen mit Zellsuspensionen kommen kann. Mittels serieller Verdünnungen der Proben kann der Test zusätzlich zur qualitativen Auswertung auch quantitativ ausgewertet werden.

Prinzip: Gram-negatives bakterielles Endotoxin katalysiert die Aktivierung eines Proenzym im Limulus Amöbozyten Lysat. Die Aktivierungsrate wird bestimmt durch die Konzentration vorhandenen Endotoxins. Das aktivierte Enzym (Koagulase) hydrolysiert spezifisch gebundene Brücken in einem geronnenen Protein, welches auch im Limulus Amöbozyten Lysat vorhanden ist. Daraus bildet sich ein gelatinartiges Koagulat.

Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, kurz vor der Analyse aufgetaut und 5 Minuten mit 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und verdünnt (1:10, 1:20, 1:30, 1:40). Alle Proben wurden zum Vergleich auch mit 0,25 EU/ml Endotoxin versetzt.

Positivkontrollen, Negativkontrollen und Proben wurden mit dem Limulus Amöbozyten Lysat gemischt und 1 Stunde ( $\pm 2$  Minuten) bei  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) im Wasserbad inkubiert. Eine positive Reaktion ist charakterisiert durch die Bildung eines Gels, das beim Kippen des Teströhrchens intakt bleibt.

Akzeptanzkriterien:

Die niedrigste Standardverdünnung (0,03 EU/ml) muss negativ sein. Koagulierte Standards sollten im Bereich 0,06 bis 0,5 EU/ml zu finden sein.

## **2.5 Qualitätskontrolle: Mykoplasmen-Nachweis**

Mykoplasmen kontaminieren Zellkulturen und induzieren zelluläre Veränderungen wie Chromosomenaberrationen, metabolische Veränderungen und

Wachstumsänderungen. Es handelt sich um sehr kleine, selbständig vermehrungsfähige Bakterien aus der Klasse der Mollicutes. Sie sind parasitär lebende Bakterien und Ursache für zahlreiche Krankheiten.

Lichtmikroskopisch sind Mykoplasmen nicht nachweisbar; die PCR ist die rascheste Methode zum Nachweis. Die Analyse dient der Feststellung der An- bzw. Abwesenheit von Mykoplasmen und als Quality Control (QC) bei der Herstellung von CAR-T-Zellen. Proben werden am Tag 12 entnommen, präpariert und analysiert.

Bei der Durchführung der Analyse ist darauf zu achten, dass DNA-Präparation und PCR-Ansatz in separaten Laminar Air Flows durchgeführt werden. DNA-Präparation und Amplifikation werden mit dem LightCycler 480 II RealTime PCR Gerät mit dem QC Sample Preparation Kit und dem MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (alle Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt.

Der MycoTOOL Mycoplasma RealTime PCR Kit erfüllt die Anforderungen für Spezifität und Sensitivität der Europäischen Pharmacopoeia, Kapitel 2.6.7.

Primer und Sonden des PCR-Kits sind spezifisch für hoch konservierte Regionen in der Mycoplasma DNA. Die Primer erlauben die Detektion von mehr als 150 Mollicutes Spezies wie *A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae*, *M. arginini*, *M. hominis*, *M. salivarium* und *M. gallisepticum*.

Hydrolyse-Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und können von RealTime PCR Geräten detektiert werden.

Die DNA Polymerase ist chemisch so modifiziert, dass sie während des PCR Setups inaktiv bleibt und erst durch einen initialen Aktivierungsschritt bei hoher Temperatur irreversibel aktiviert wird.

Um falsch negative Ergebnisse zu verhindern sind Kontrollen inkludiert. Zum einen handelt es sich um eine Positivkontrolle (Plasmid DNA) zur Kontrolle der PCR, zum anderen um eine schon der Zellsuspension zugefügte Recovery Kontrolle (ein weiteres Plasmid), welche bereits die Effizienz der Probenpräparation vor der PCR kontrolliert.

Um Amplifikat-Kontaminationen und –Verschleppungen zu vermeiden, wird Uracil-DNA Glycosylase (UNG) verwendet. Durch die Inkorporation von Deoxyuridin Triphosphat (dUTP) bei der Amplifikation entstehen dUTP-haltige Amplikons,

welche mit UNG verdaut werden. UNG entfernt Uracil von DNA Molekülen. Nach dieser Vorbehandlung der PCR-Reaktion wird UNG durch die erste Denaturierung der PCR inaktiviert. Native DNA enthält kein Uracil und kann dadurch von UNG auch nicht denaturiert werden, die eigentliche Probe bleibt intakt und kann ohne Kontamination analysiert werden.

### 2.5.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA wird mit dem QC Sample Preparation Kit von Roche (Basel, Schweiz) lt. Protokoll durchgeführt und die transduzierten Zellen auf Abwesenheit von Mykoplasmen getestet.

Die Proben werden erst mit Proteinase K lysiert. Nach Präzipitation der Nukleinsäuren und einem Waschschrift werden die Nukleinsäuren in einem Puffer gelöst und sind fertig für die Detektion mit einer RealTime PCR.

### 2.5.2 PCR

Verwendet wird der MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (Roche, Basel, Schweiz). Alle Reagenzien müssen vor Verwendung für ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Der Laminar Air Flow muss vor Verwendung mit einer DNA-Exitus Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gereinigt und danach desinfiziert werden.

Die Mastermixes für die Mycoplasma- und die Recovery Control PCR werden lt. Gebrauchsinformation hergestellt und in die entsprechenden Wells einer 96 well PCR-Platte pipettiert (Mycoplasma-Ansatz: blau; Recovery Control-Ansatz: grün):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	Probe 1	Probe 2									Pos. Co.
B	NTC	Probe 1	Probe 2									Pos. Co.
C		Probe 1	Probe 2									Pos. Co.
D		Probe 1	Probe 2									Pos. Co.

E	NTC	Probe 1	Probe 2									
F	NTC	Probe 1	Probe 2									
G		Probe 1	Probe 2									
H		Probe 1	Probe 2									

Die entsprechenden Proben (DNA-Extrakte, Positivkontrolle, Negativkontrolle nukleasefreies Wasser) werden zugefügt und die Platte mit einer Folie verschlossen.

Die Amplifikation wird am LightCycler 480 II mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Anzahl an Cycles
UNG	40	10:00	4,40	none			1
Denaturation	95	10:00	4,40	none			1
Pre-Amplification	95	00:15	4,40	none			2
	70	00:15	2,20	none			
	72	00:20	4,40	none			
Amplification	95	00:15	4,40	none			48
	69	00:15	2,20	none	60	0,5	
	72	00:20	4,40	single			
Cooling	40	00:30	2,20	none			1

Die Amplifikation beginnt mit der UNG-Behandlung bei 40°C für 10 Minuten, gefolgt von der initialen Denaturierung der DNA bei 95°C für 10 Minuten. Danach folgt eine sogenannte Touch-Down Amplifikation, bei der mit einer Annealing-Temperatur von 70°C gestartet wird. Diese Annealing-Temperatur wird schrittweise gesenkt, bis sie nach 50 Amplifikationszyklen bei 60°C liegt. Ein abschließender Abkühlschritt auf 40°C beendet die PCR.

### 2.5.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt unter Verwendung einer Farbkompensation für FAM (510 nm) und VIC/HEX/YELLOW555 (580 nm). Für Mykoplasmen wird der Filter FAM

verwendet, für die Recovery Control zur Kontrolle der PCR-Reaktion wird der Filter VIC/HEX/YELLOW555 verwendet.

Akzeptanzkriterien:

Eine Probe ist negativ, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Mykoplasmen-PCR

- NTC: alle NTCs (2/2) müssen negativ sein
- Positive Control: alle Proben (4/4) müssen positiv sein
- Proben: alle Proben (4/4) müssen negativ sein

Recovery Control-PCR

- NTC: alle NTCs (2/2) müssen negativ sein
- Proben: alle Proben (4/4) müssen positiv sein

Valid Options:

- Alle Proben mit einem CP  $\geq$  43,0 werden als negativ gewertet

## **2.6 Qualitätskontrolle: Vector Copy Number (VCN)**

Die Analyse wird zur Feststellung der Menge an integriertem lentiviralem Vektor pro transduzierter Zelle eingesetzt und dient zur Charakterisierung des zellulären Produkts am Tag 12 bzw. als In-Process-Control (IPC) am Tag 5 bei der Herstellung von CAR-T-Zellen.

Bei der Durchführung der Analyse ist darauf zu achten, dass DNA-Präparation und PCR-Ansatz in separaten Laminar Air Flows durchgeführt werden. Die Amplifikation wird mit dem LightCycler 480 II (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt.

### **2.6.1 DNA-Extraktion**

Für die Analyse wird DNA aus maximal  $5 \times 10^6$  Zellen mittels QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) lt. Herstellervorgaben extrahiert. Proben werden erst mit Proteinase K lysiert und auf eine Säule geladen. Während der

Zentrifugation wird DNA an die Membran gebunden, während Verunreinigungen die Membran passieren. Verbliebene Verunreinigungen und Enzym Inhibitoren werden in zwei Waschschrritten entfernt und danach die DNA in einem Puffer eluiert.

## 2.6.2 PCR

Für die Amplifikation in einer PCR werden eine Negativkontrolle und ein Plasmid-Standard (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) in Form einer Verdünnungsreihe und als Positivkontrolle verwendet.

Alle Reagenzien müssen vor Verwendung für ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Laminar Air Flow muss vor Verwendung mit einer DNA-Exitus Lösung gereinigt und danach desinfiziert werden.

Vorbereitungen:

- Negativkontrolle: nukleasefreies Wasser
- Standardkurve: Verdünnungsreihe des Plasmids pLTG 173-PTBP2 (Miltenyi Biotec) lt. folgendem Schema

Name	Target Standard Konzentration (Kopien/ $\mu$ l)	Komponente 1		Komponente 2	
		Name	Volumen ( $\mu$ l)	Name	Volumen ( $\mu$ l)
STD 0	<b><math>1 \times 10^7</math></b>	Stock $1 \times 10^8$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 1	<b><math>1 \times 10^6</math></b>	STD 0 $1 \times 10^7$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 2	<b><math>1 \times 10^5</math></b>	STD 1 $1 \times 10^6$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 3	<b><math>1 \times 10^4</math></b>	STD 2 $1 \times 10^5$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 4	<b><math>1 \times 10^3</math></b>	STD 3 $1 \times 10^4$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 5	<b><math>1 \times 10^2</math></b>	STD 4 $1 \times 10^3$	10	Nuklease-freies Wasser	90
STD 6	<b><math>1 \times 10^1</math></b>	STD 5 $1 \times 10^2$	10	Nuklease-freies Wasser	90

- Positivkontrollen: Verdünnungsreihe des Plasmids pLTG 173-PTBP2 (Miltenyi Biotec) lt. folgendem Schema

Name	Target Standard Konzentration (Kopien/ $\mu$ l)	Komponente 1		Komponente 2	
		Name	Volumen ( $\mu$ l)	Name	Volumen ( $\mu$ l)
QC 1	<b>50.000</b>	STD 1 $1 \times 10^6$	10	Nuklease-freies Wasser	190
QC 2	<b>5.000</b>	QC 1 50.000	10	Nuklease-freies Wasser	90
QC 3	<b>500</b>	QC 2 5.000	10	Nuklease-freies Wasser	90

QC 4	<b>50</b>	QC 3 500	10	Nuklease-freies Wasser	90
------	-----------	----------	----	------------------------	----

- Mastermix: Herstellung des Mastermix für die PCR, indem 990 µl TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) mit 10 µl VCN-G Primer and Probes Mix (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) gemischt werden

**PCR-Ansatz:**

Für den PCR Ansatz werden jeweils 50 µl Mastermix und 50 µl Probe (NTC, Standards, Qualitätskontrollen und Prozessproben) gemischt. Davon werden dann jeweils 25 µl in Triplikaten in eine 96 well PCR-Platte pipettiert. Zwischen den einzelnen Proben werden die Handschuhe mit DNA Exitus (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) behandelt und danach desinfiziert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	STD 1 1x10 <sup>6</sup> copies/µl			STD 2 1x10 <sup>5</sup> copies/µl			STD 3 1x10 <sup>4</sup> copies/µl			STD 4 1x10 <sup>3</sup> copies/µl		
<b>B</b>	STD 5 1x10 <sup>2</sup> copies/µl			STD 6 1x10 <sup>1</sup> copies/µl			---			NTC		
<b>C</b>	Sample 1			Sample 2			Sample 3			Sample 4		
<b>D</b>	QC 1 50000 copies/µl			QC 2 5000 copies/µl			QC 3 500 copies/µl			QC 4 50 copies/µl		
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

Die PCR-Platte wird mit einer Folie verschlossen. Die Amplifikation findet am Roche LightCycler 480 II mit folgendem Programm statt:

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode	Anzahl an Cycles
Activation	50	02:00	4,40	none	1
Denaturation	95	00:20	4,40	none	1
Amplification	95	00:05	4,40	none	40
	56	00:20	2,20	none	
	65	00:20	4,40	single	

Cooling	40	00:30	2,20	none	1
---------	----	-------	------	------	---

### 2.6.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgt unter Verwendung einer Farbkompensation für FAM (510 nm) und VIC/HEX/YELLOW555 (580 nm). Für gag (retrovirales Gen) wird der Filter FAM verwendet, für PTBP2 (humanes Gen) wird der Filter VIC/HEX/YELLOW555 verwendet. Die Standardkurve wird zur absoluten Quantifizierung verwendet.

#### Berechnung der Kopien / transduzierter Zelle:

(Kopien gag pro  $\mu\text{l}$ /Kopien PTBP2 pro  $\mu\text{l}$ ) /Transduktionsfrequenz % \*2 (diploid)

#### Akzeptanzkriterien:

Standardkurve:

- Die Steigung der Standardkurve muss  $\leq -3,1$  und  $\geq -3,6$  sein.
- Die Effizienz jeder Standardkurve muss  $> 85\%$  sein.
- Der durchschnittliche CP für den Standard STD 1 ( $1 \times 10^6$  Kopien) muss zwischen 15,0 und 18,0 liegen.
- Mindestens 2 von 3 NTC-Ergebnissen müssen „0“ oder „N/A“ sein.

Qualitätskontrollen:

- QC 1 (50.000 Kopien/ $\mu\text{l}$ ): 25.000 - 100.000 Kopien/ $\mu\text{l}$
- QC 2 (5.000 Kopien/ $\mu\text{l}$ ): 2.500 - 10.000 Kopien/ $\mu\text{l}$
- QC 3 (500 Kopien/ $\mu\text{l}$ ): 250 - 1.000 Kopien/ $\mu\text{l}$
- QC 4 (50 Kopien/ $\mu\text{l}$ ): 25 - 100 Kopien/ $\mu\text{l}$

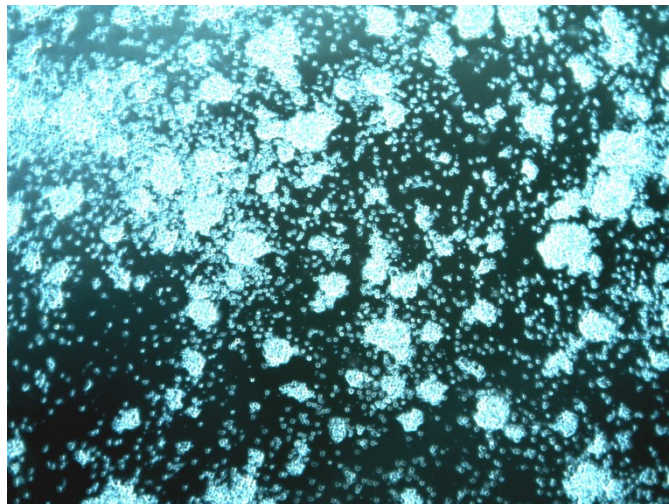
Valid Options:

- Es ist erlaubt, 3 Ausreißer aus der Standardkurve zu entfernen, die mehr als 0,5 CP vom Rest der Replikate entfernt liegen
- Es ist erlaubt, einen Punkt aus der Mitte der Standardkurve zu entfernen, wenn zumindest eine 5-Punkt-Standardkurve erhalten bleibt.
- Es ist erlaubt, detektierte Signale mit einem CP  $>35$  als „N/A“ zu qualifizieren.

### 3 Ergebnisse

Die T-Zell-Transduktion (TCT) wurde dreimal durchgeführt. Bei der ersten TCT fand die Schulung des Herstellungsprozesses von CD19 CAR-T-Zellen am CliniMACS Prodigy® durch die Fa. Miltenyi Biotec statt. Darüber hinaus wurde die erste TCT dazu verwendet, alle qualitätssichernden Analysen (Zellzahl, Vitalität, Zellcharakterisierung, Transduktionseffizienz, Sterilität, Endotoxin, Mycoplasmen, Vector Copy Number) zu etablieren. Im Anschluss erfolgten die zweite und dritte T-Zell Transduktion zur Herstellung von CD19 CAR-T-Zellen.

Folgende mikroskopische Aufnahmen zeigen am Beispiel der dritten T-Zell Transduktion die Zellen in Kultur. Die Aufnahmen werden anhand einer automatischen Fokussierung vom CliniMACS Prodigy™ erstellt. Lediglich der Abschnitt in der Kulturkammer und die Helligkeit werden manuell ausgewählt. Ab dem vollständigen Wechsel des Kulturmediums am Tag 3 des Herstellungsprozesses können keine Aufnahmen mehr erstellt werden, da zu diesem Zeitpunkt für den Rest der Kultivierung die Kammer regelmäßig geschüttelt wird, wodurch sich die Zellen in Suspension und nicht mehr in einer fokussierbaren Ebene befinden.



*Abbildung 7: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 1 nach Kulturstart und Aktivierung der T-Lymphozyten, vor Transduktion mit dem lentiviralen Vektor)*

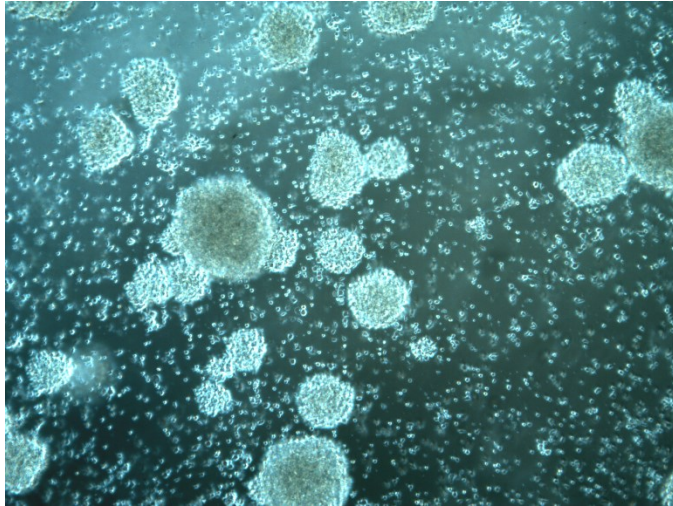


Abbildung 8: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 2 nach Kulturstart, 1 Tag nach Transduktion mit dem lentiviralen Vektor)

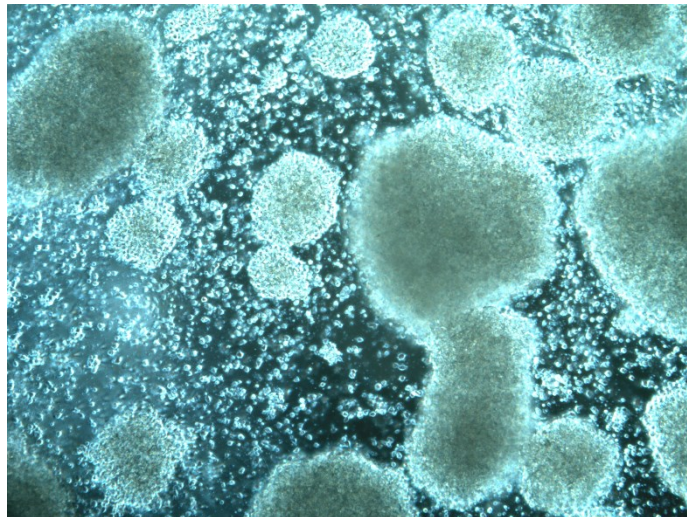


Abbildung 9: Zellen der dritten T-Zell Transduktion in Kultur (Tag 3 nach Kulturstart, vor Austausch des kompletten Kulturmediums)

### **3.1 Zellzahl, Vitalität, zelluläre Zusammensetzung und Transduktionseffizienz**

Zellzahl, Vitalität und zelluläre Zusammensetzung des Ausgangsmaterials (Apheresat) vor Beginn der Anreicherung und des Selektionates nach Anreicherung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten am Tag 0 werden durchflusszytometrisch analysiert. Ebenso Zellzahl, Vitalität, zelluläre Zusammensetzung und Transduktionseffizienz der Intra-Process-Control am Tag 5 und des Endproduktes am Tag 12 des Herstellungsprozesses. Die Ergebnisse des Tages 12 sind wesentlich für die patientInnen-spezifische Formulierung des

Wirkstoffs (x CD19 CAR-T-Zellen / kg Körpergewicht des Empfängers / der Empfängerin).

### 3.1.1 Etablierung

Für die Etablierung wurden nach Färbungen der Zellen mit einzelnen Antikörpern die Spannung für jeden Farbstoff eingestellt und darauf folgend die Kompensation berechnet. Diese grundsätzlichen Settings für die Akquisition wurden auf zwei Durchflusszytometern erstellt (Beckman Navios und Beckman CytoFLEX).

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Ergebnisse beider Durchflusszytometer verglichen. Die Ergebnisse der Messungen am Beckman CytoFLEX, der sich im S1-Bereich befindet sollten mit dem für die Routine-Diagnostik eingesetzten und validierten Beckman Navios verglichen werden.

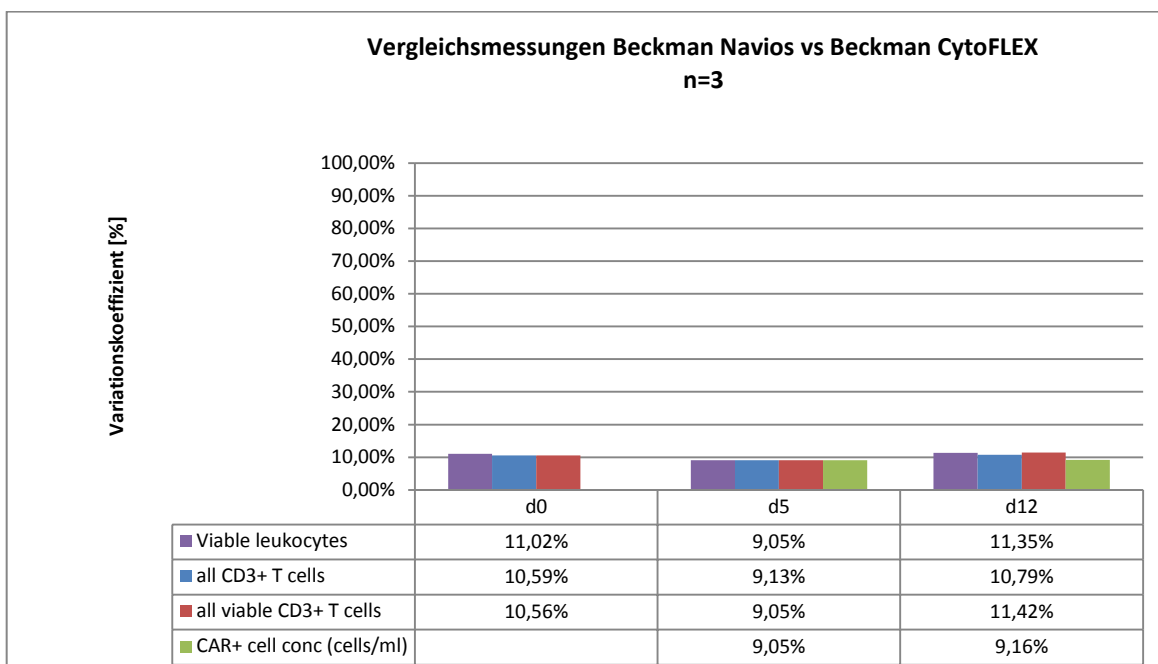


Diagramm 1: Vergleich der Ergebnisse von 3 Proben nach Messung und Analyse mit zwei Durchflusszytometern; Berechnung des Variationskoeffizienten, der < 20 % sein soll

Die weit unter 20 % liegenden Variationskoeffizienten lassen die Verwendung des Beckman CytoFLEX Durchflusszytometers für die durchflusszytometrischen Analysen beim Herstellungsprozess von CD19 CAR-T-Zellen zu.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Single Platform Analysen mit Dual Platform Analysen verglichen.

Bei der Dual Platform werden durchflusszytometrisch lediglich die relativen Anteile jeder Population erhoben. Die absoluten Zellzahlen werden anhand einer auf einem anderen Gerät erhobenen Zellzahl daraus berechnet.

Bei der Single Platform Analyse wird die Zellzahl direkt bei der Messung am Durchflusszytometer erhoben. Dies ist möglich durch die Zugabe von Counting Beads oder durch volumetrische Bestimmung nach Kalibrierung des Durchflusszytometers.

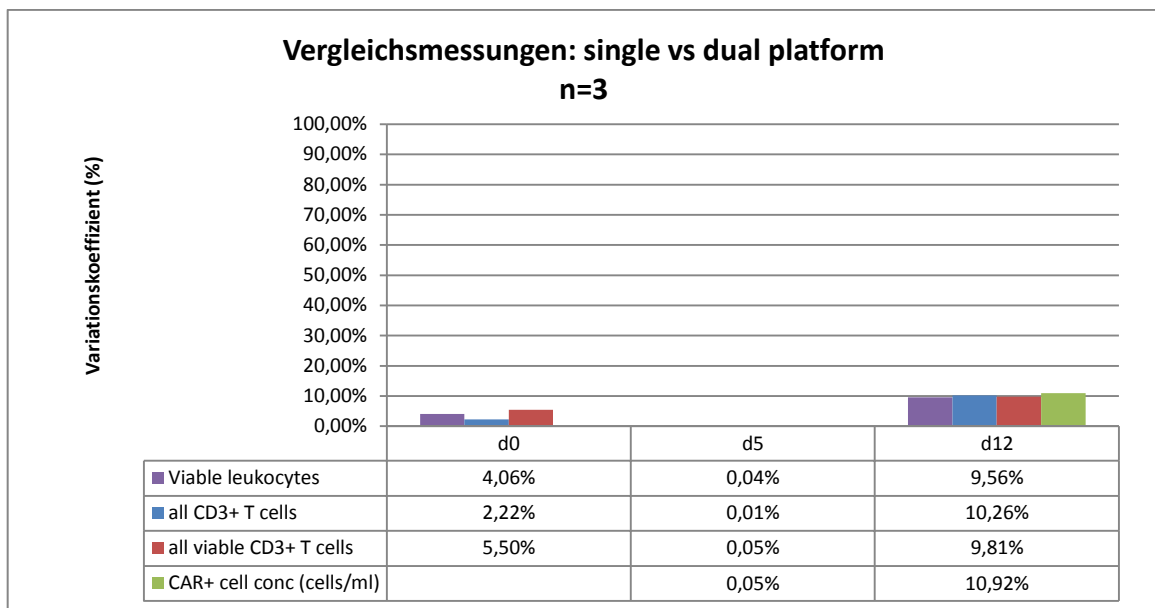


Diagramm 2: Vergleich der Ergebnisse von 3 Proben nach Dual Platform Analyse und Single Platform Analyse; Berechnung des Variationskoeffizienten, der < 20 % sein soll

Die weit unter 20 % liegenden Variationskoeffizienten lassen die Verwendung des Beckman CytoFLEX Durchflusszytometers mit der Durchführung der Single Platform Analyse für die durchflusszytometrischen Analysen beim Herstellungsprozess von CD19 CAR-T-Zellen zu. Die absoluten Zellzahlen werden volumetrisch ermittelt.

Diesen Protokollen folgend wurden drei Herstellungsprozesse mit Apheresaten gesunder Freiwilliger durchgeführt (TCT 1 bis 3)

### 3.1.2 Zellzahl

Die Zellzahlen werden bei der durchflusszytometrischen Analyse mittels volumetrischer Berechnung ermittelt. Die Anzahl CD45+ Gesamtleukozyten wurde in folgenden Proben erhoben:

- Apheresat: Ausgangsmaterial einen Tag nach Apherese, allerdings direkt vor Start des Anreicherungsprozesses am CliniMACS Prodigy®. Für den Start der Anreicherung sind  $2 \times 10^8$  bis  $3 \times 10^9$  T-Lymphozyten in einem Volumen von 60 – 280 ml nötig.
- Selektionat: Nach magnetischer Separation und Anreicherung der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten wird eine Probe entnommen, die als Basis für den Start der Kultur dient.
- Tag 0: Für den Start der Kultur sind 30 bis  $100 \times 10^6$  T-Lymphozyten erforderlich.
- Tag 5: In-Process Control zur Feststellung des Transduktionserfolges.
- Tag 12: Nach Ende der Kultur und Ernte aller Zellen wird die absolute und relative Zusammensetzung des Zellproduktes ermittelt.

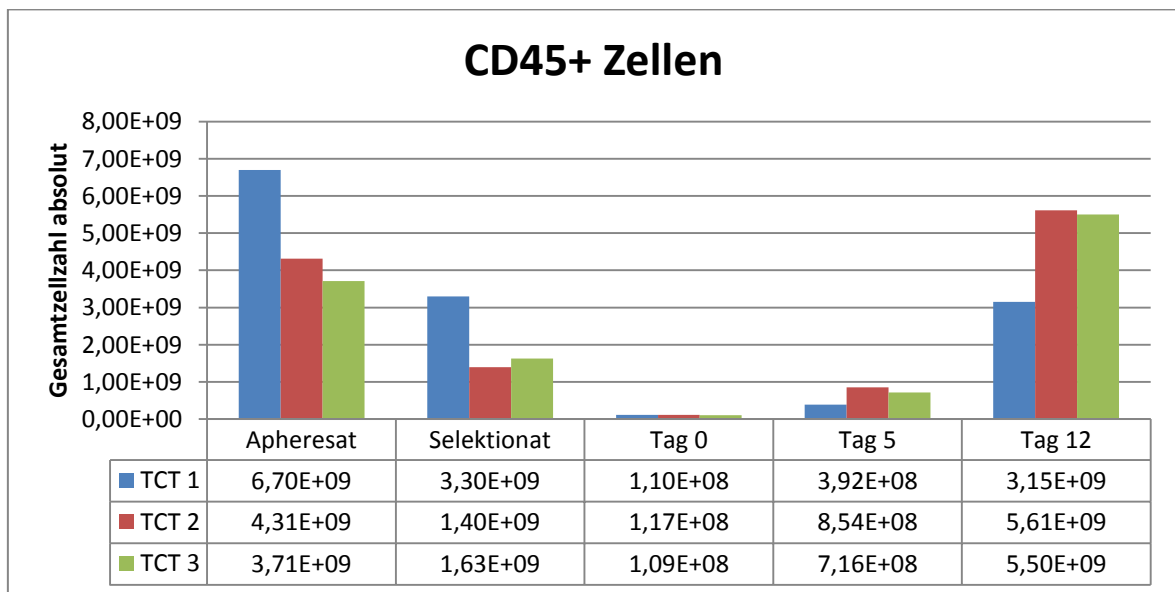


Diagramm 3: Leukozytenanzahl (CD45+ Zellen) absolut im Ausgangsmaterial (Apheresat), nach Anreicherung mittels CD4- und CD8-MicroBeads (Selektionat), beim Start der Kultur (Tag 0), bei der Intra-Process-Control (Tag 5) und nach Beendigung der Kultur (Tag 12): Das Ausgangsmaterial wird durch die Anreicherung der T-Lymphozyten stark reduziert. Davon werden max.  $1 \times 10^8$  T-Lymphozyten entnommen, aktiviert, transduziert und anschließend expandiert bis zum Tag 12.

### 3.1.3 Vitalität

Die Vitalität der Zellen wird durchflusszytometrisch mit 7-AAD ermittelt, welches nur in Zellen ohne intakte Zellmembran – also nicht-vitale Zellen - eindringen kann. Die Angabe der Vitalität erfolgt in Prozent.

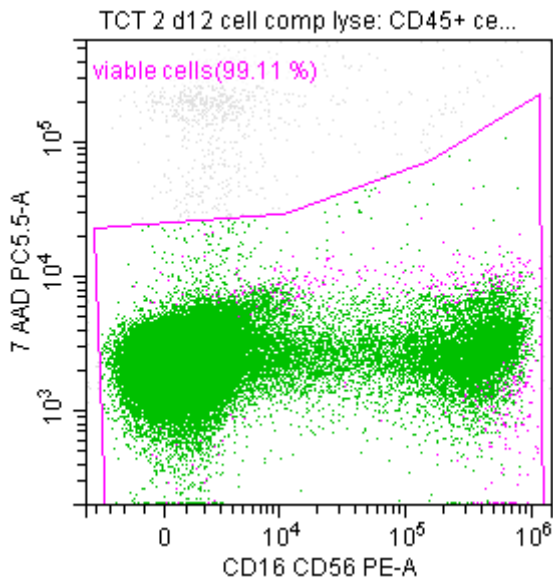


Abbildung 10: Scatter Plot aller CD45+Leukozyten am Tag 12 der zweiten T-Zell Transduktion. Alle 7-AAD negativen Zellen (hier 99,11 %) sind vitale Zellen. 7-AAD negative Zellen werden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen

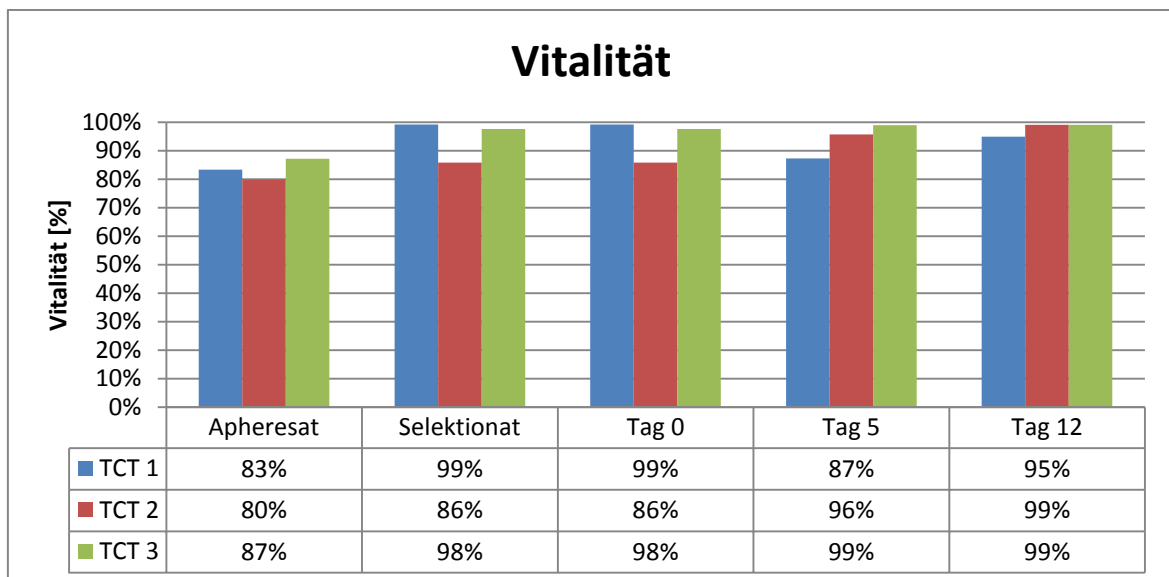


Diagramm 4: Vitalität der Zellen im Apheresat, während des Prozesses und im Endprodukt gemessen mit 7-AAD

Die Vorgaben der Fa. Miltenyi Biotec sind 80 % vitale T-Lymphozyten im Endprodukt des Herstellungsprozesses. Dieses Kriterium wurde mit 95 % Vitalität (TCT 1) und 99 % Vitalität (TCT 2 und 3) Vitalität erfüllt.

### 3.1.4 Zelluläre Zusammensetzung

Im Rahmen der Analyse der zellulären Zusammensetzung werden die Populationen CD3+ T-Lymphozyten (inkl. CD4+, CD8+ und CD56+ Subpopulationen), CD19+ B-Lymphozyten und CD14+ Monozyten gemessen und deren Anzahl in der jeweiligen Probe berechnet.

Der relative und absolute Anteil an CD19 CAR<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten wird bei der In-Process-Control am Tag 5 und im Endprodukt am Tag 12 gemessen und berechnet und ist gemeinsam mit der Anzahl CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten die Grundlage für die Herstellung des Wirkstoffes zur spezifischen Anwendung an der Patientin / dem Patienten bei einem Heilversuch.

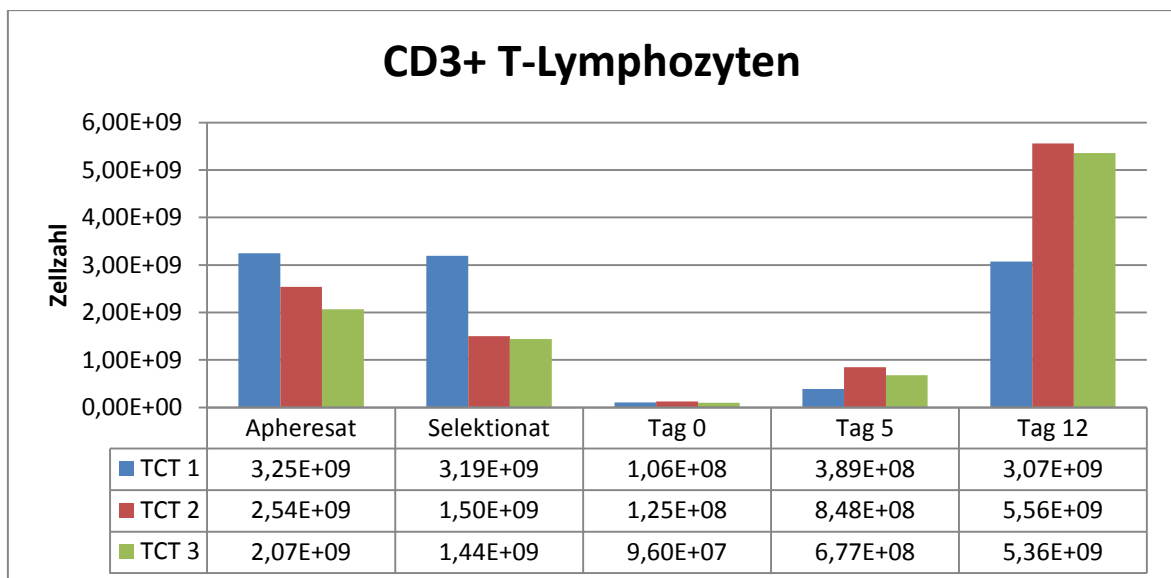


Diagramm 5: Absolute Anzahl an CD3+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur

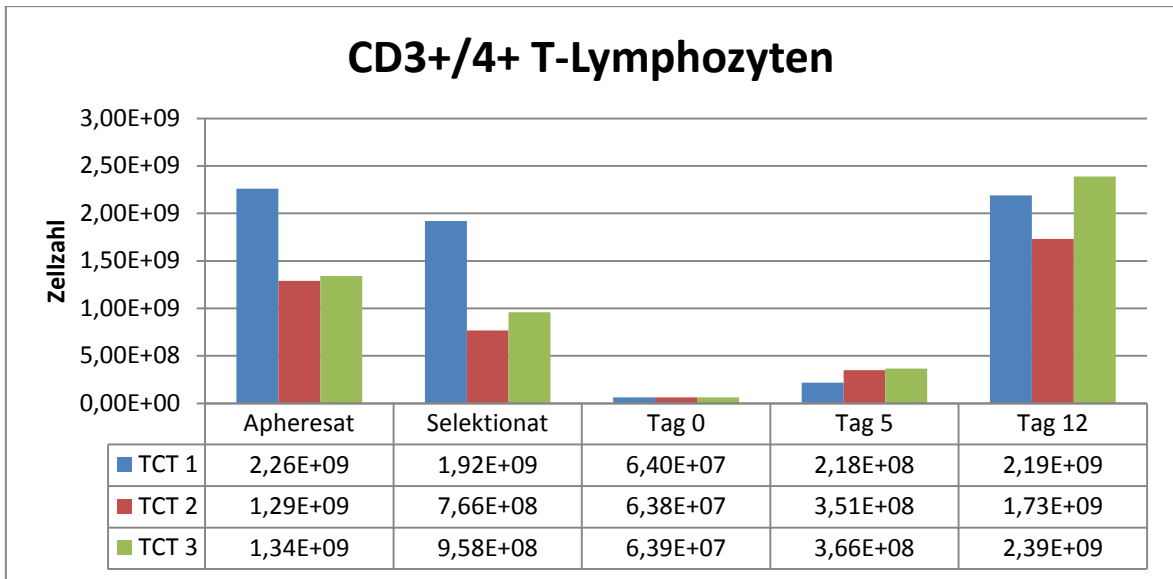


Diagramm 6: Absolute Anzahl an CD3+/4+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur

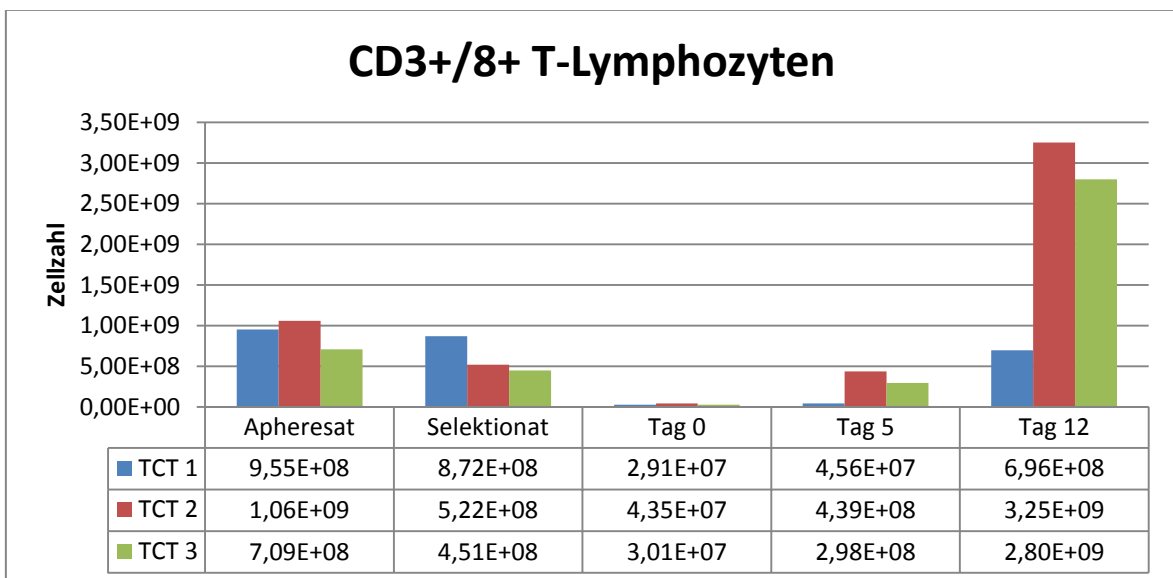


Diagramm 7: Absolute Anzahl an CD3+/8+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur

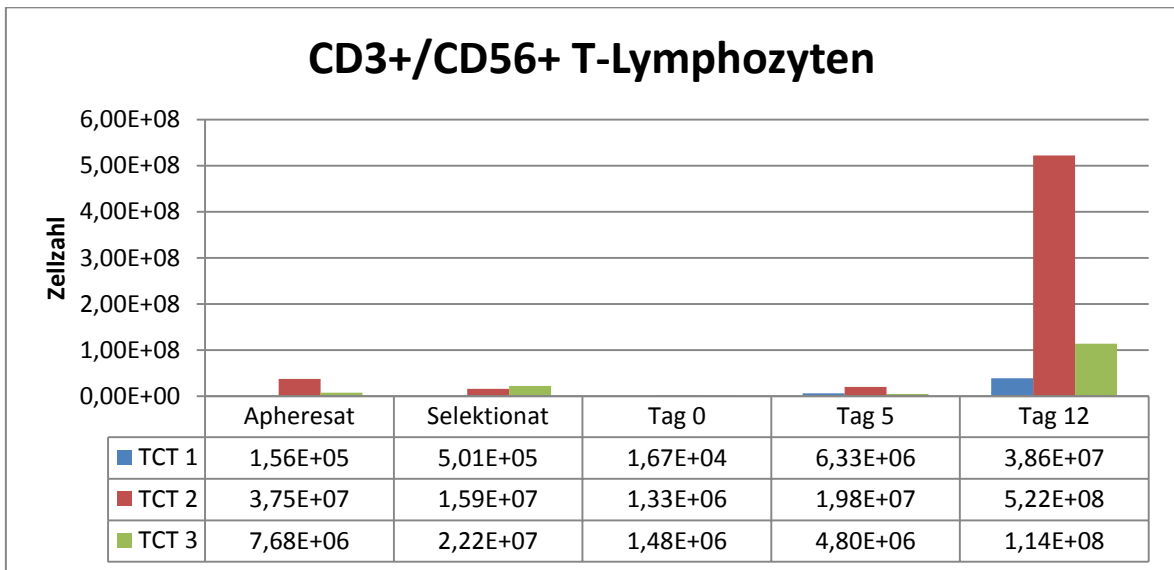


Diagramm 8: CD3+/56+ NKT-Zellen im Ausgangsmaterial, während des Prozesses und im Endprodukt

Die Anzahl CD3+ T-Lymphozyten im Ausgangsmaterial und im Selektionat war bei allen drei Herstellungsprozessen ausreichend. Die Kultur ist optimiert für max.  $1 \times 10^8$  CD3+ T-Lymphozyten am Tag 0 (Start der Kultur). Die Ergebnisse am Tag 12 sind Berechnungsgrundlage für die Transduktionseffizienz

Die Reinheit des Selektionats, also vor dem Kulturansatz, beträgt bei allen drei Validierungsläufen mehr als 80%. Damit wurde die Anforderung von >80% erreicht bzw. die Akzeptanzkriterien erfüllt.

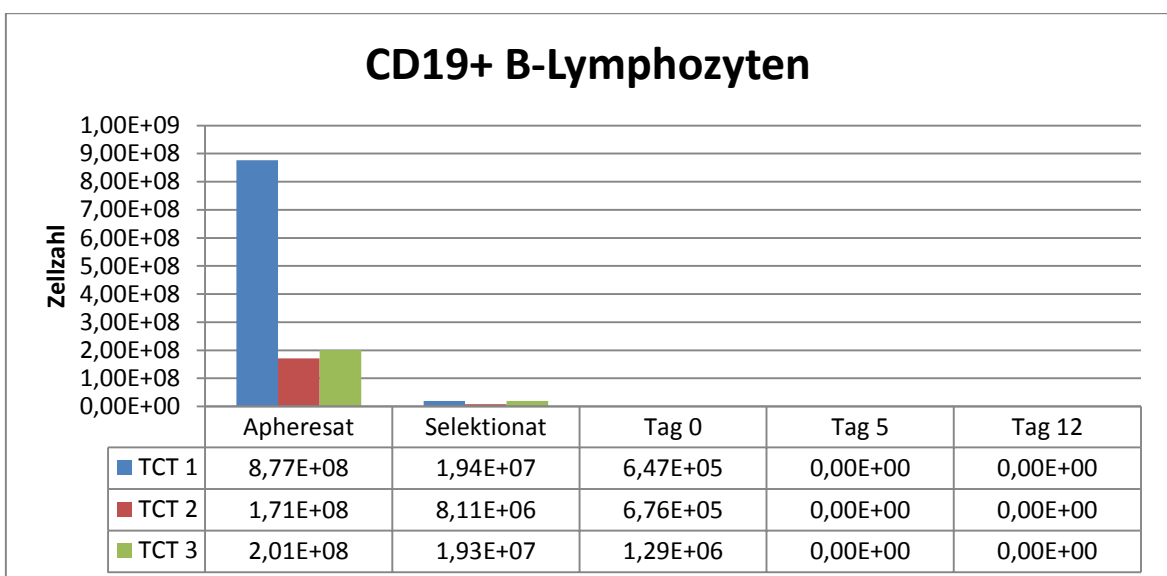


Diagramm 9: Absolute Anzahl an CD19+ B-Lymphozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur

Am Tag 0 – dem Start der Kultur – sind noch restliche CD19+ B-Lymphozyten vorhanden, die am Tag 5 und am Tag 12 im Endprodukt nicht mehr nachweisbar sind.

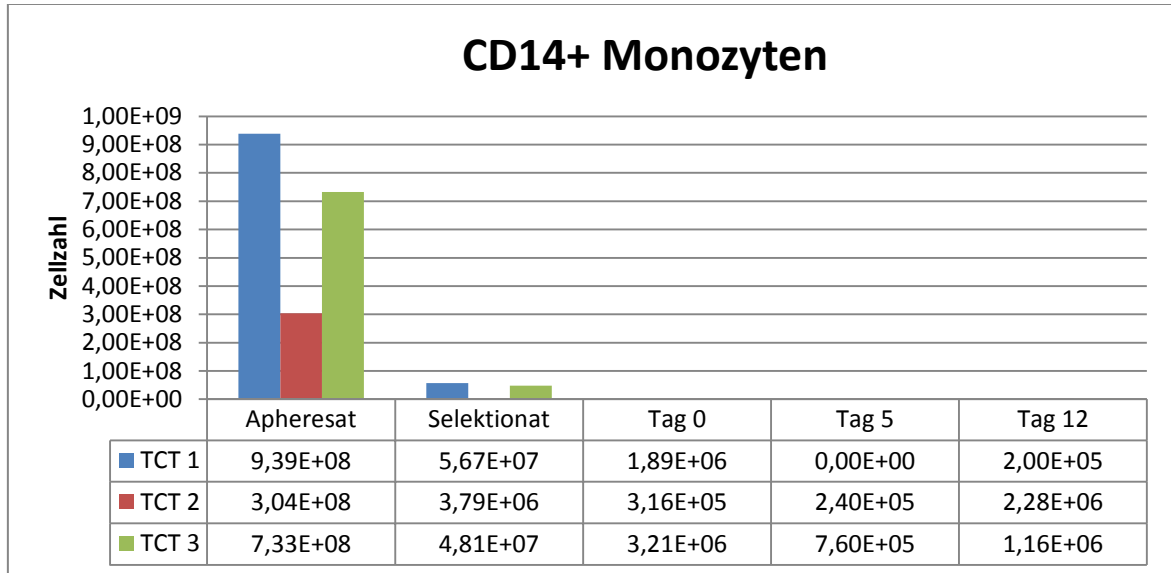


Diagramm 10: Absolute Anzahl an CD14+ Monozyten im Ausgangsmaterial, im Selektionat und im Verlauf der Kultur

Monozyten werden vorab durch die Anreicherung von T-Lymphozyten eliminiert und können auch unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht proliferieren.

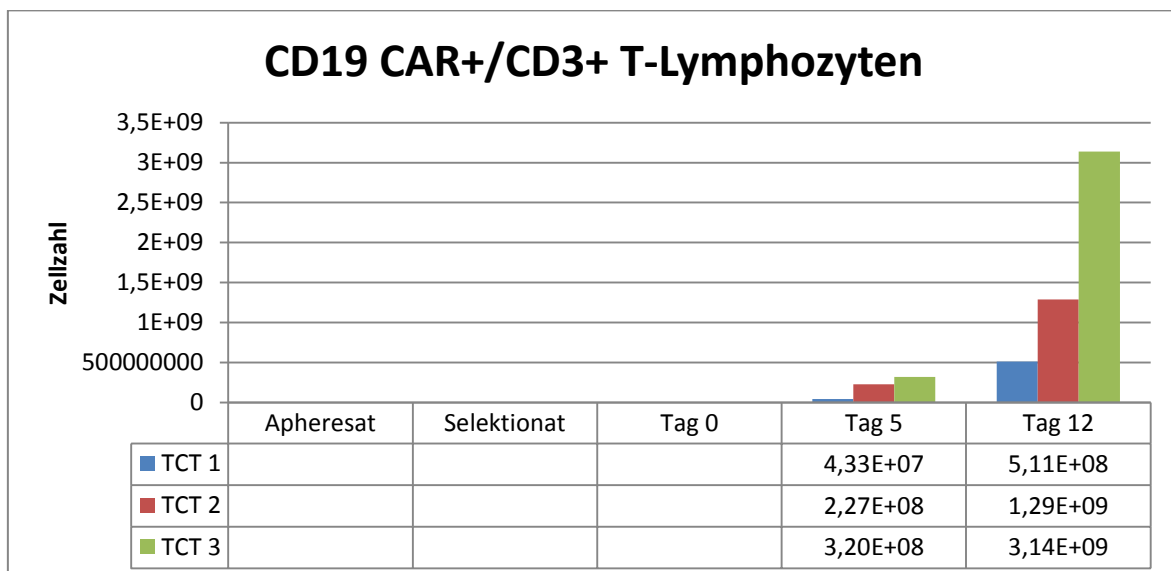


Diagramm 11: Absolute Anzahl an CD19 CAR+/CD3+ T-Lymphozyten im Verlauf der Kultur

Der Nachweis einer positiven T-Zell Transduktion ist die durchflusszytometrische Analyse von T-Lymphozyten, die den CD19 CAR tragen. Bereits am Tag 5 der Kultur, das sind 4 Tage nach Transduktion mit dem lentiviralen Virus, sind CAR-Zellen nachweisbar, die bis zum Tag 12 weiter expandieren. Die Anzahl dieser Zellen ist die Grundlage zur Berechnung des Präparates für die Empfängerin / den Empfänger.

### 3.1.5 Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz wird durchflusszytometrisch erhoben. Anti-CD3 FITC wird gegen Anti CD19 CAR PE gemessen und analysiert. Die CD19 CAR<sup>+</sup> und CD19 CAR<sup>-</sup> Populationen sollen gut sichtbar sein. Mithilfe eines Density Plots können die beiden Populationen gut voneinander getrennt werden.

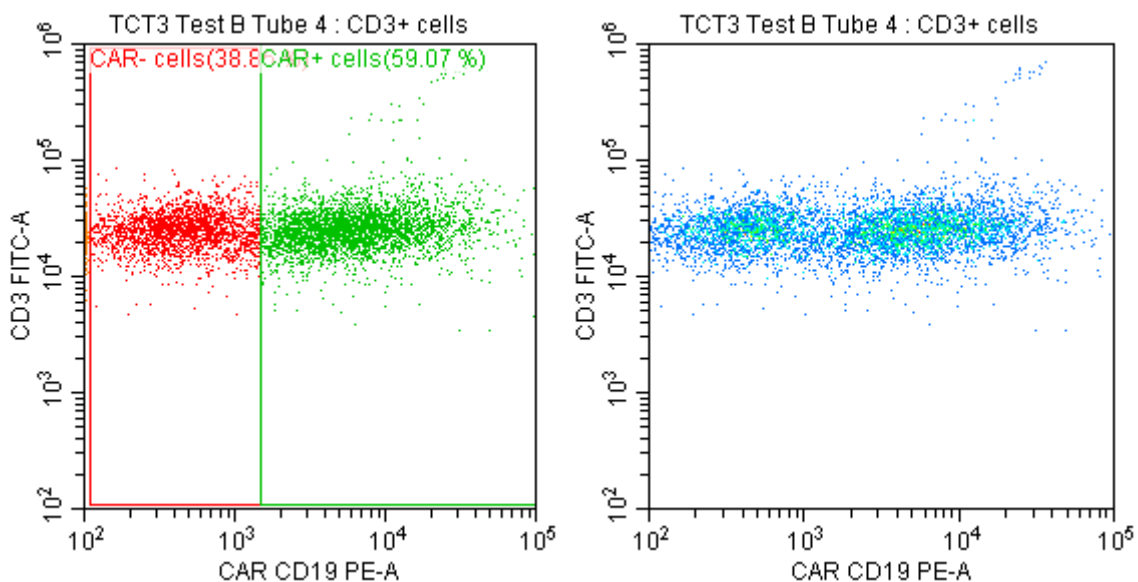


Diagramm 12: Scatter Plots zur Analyse der Transduktionseffizienz am Beispiel der dritten T-Zell Transduktion am Tag 12 nach Ende der Kultur. Auf der X-Achse ist anti-CD19 CAR PE, auf der Y-Achse anti-CD3 FITC aufgetragen (rechts der Density Plot)

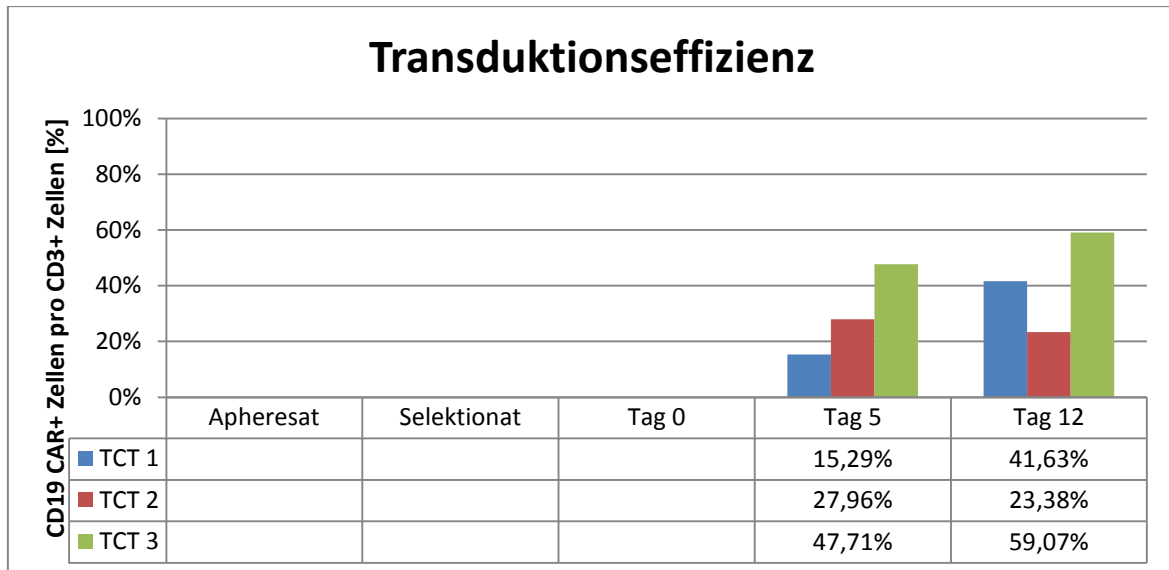


Diagramm 13: Transduktionseffizienz an Tag 5 und 12 der Expansionskultur, Messung erfolgt durchflusszytometrisch und beschreibt die CAR+ Lymphozyten pro vitalen CD3+ T-Lymphozyten in Prozent

Die Transduktionseffizienz ist der prozentuelle Anteil an CD19 CAR+/CD3+ Zellen pro vitaler CD3+ T-Lymphozyten und soll >10% sein. Diese Vorgabe konnte erfüllt werden.

### 3.2 Qualitätskontrolle: Mikrobiologische Analyse

Proben für die Blutkulturen wurden an den Tagen 10 (In Process Control) und 12 (Ende der Kultur) entnommen, in die Kulturflaschen inokuliert und für 7 Tage im BACTEC 9050 bebrütet. Die Sterilitätskontrollen vom Tag 10 wurden am Tag 12 nach 2 Tagen Kultur abgelesen, um einen Richtwert für das Endprodukt des Herstellungsprozesses zu haben („negative to date“). Dies ist vor allem deshalb nötig, da der S2-Status der Probe bis zur Anreicherung des lentiviralen Vektors aufrecht ist und am Tag 5 kein Material für die Blutkultur entnommen werden kann. Die Blutkulturen des Endmaterials am Tag 12 nach Ernte der Zellen werden 7 Tage inkubiert und das Ergebnis nach Freigabe des Produktes nachgereicht.

Bactec aerob	TCT 1	TCT 2	TCT 3
Apheresat			
Selektionat			
Tag 10 (nach 2 d)	negativ	negativ	negativ
Tag 10 (nach 7 d)	negativ	negativ	negativ
Tag 12 (nach 7 d)			negativ

*Tabelle 1: Ergebnisse der aeroben Blutkulturen am Tag 10 (ausgelesen nach 2 und nach 7 Tagen) und am Tag 12 (ausgelesen nach 7 Tagen). Die Durchführung der mikrobiologischen Kontrolle am Tag 12 wurde erst bei der 3. T-Zell Transduktion gestartet*

Bactec anaerob	TCT 1	TCT 2	TCT 3
Apheresat			
Selektionat			
Tag 10 (nach 2 d)	negativ	negativ	negativ
Tag 10 (nach 7 d)	negativ	negativ	negativ
Tag 12 (nach 7 d)			negativ

*Tabelle 2: Ergebnisse der anaeroben Blutkulturen am Tag 10 (ausgelesen nach 2 und nach 7 Tagen) und am Tag 12 (ausgelesen nach 7 Tagen). Die Durchführung der mikrobiologischen Kontrolle am Tag 12 wurde erst bei der 3. T-Zell Transduktion gestartet*

Bei keiner der drei T-Zell Transduktionen ist die Anwesenheit lebensfähiger Mikroorganismen nachgewiesen worden, weder aerob noch anaerob.

### **3.3 Qualitätskontrolle: Endotoxintestung**

Endotoxintestungen wurden von der Core Facility Imaging des ZMF durchgeführt. Die Proben der 1. T-Zell Transduktion dienten der Etablierung des Protokolls und Austestung von Konzentrationen und aller mit der Probe in Kontakt gekommener Reagenzien, wie Kulturmedium, HSA und Composol. Sensitivität und Spezifität wurden mit Verdünnungsreihen des Probenmaterials, das künstlich mit Endotoxin versetzt wurde durchgeführt.

Ab der 2. T-Zell Transduktion wurden die Analysen gemäß den Forderungen der European Pharmacopoeia durchgeführt und ausgewertet.

Endotoxin	TCT 1	TCT 2	TCT 3
Apheresat			
Selektionat			
Tag 0			
Tag 5	negativ		
Tag 12	negativ	<0,06 EU/ml	<0,06 EU/ml

Tabelle 3: Ergebnisse der Endotoxinanalysen am Tag 5 und am Tag 12. Die Messung am Tag 5 wurde nur bei der 1. T-Zell Transduktion durchgeführt und diente der Etablierung des Protokolls

Die Vorgabe von weniger als 5,0 EU/ml konnte bei allen drei T-Zell Transduktionen erfüllt werden.

### 3.4 Qualitätskontrolle: Mycoplasmen-Nachweis

Die Mycoplasmen-Testung auf RealTime PCR Basis wurde jeweils am Tag 12 mit Proben des Endproduktes durchgeführt.

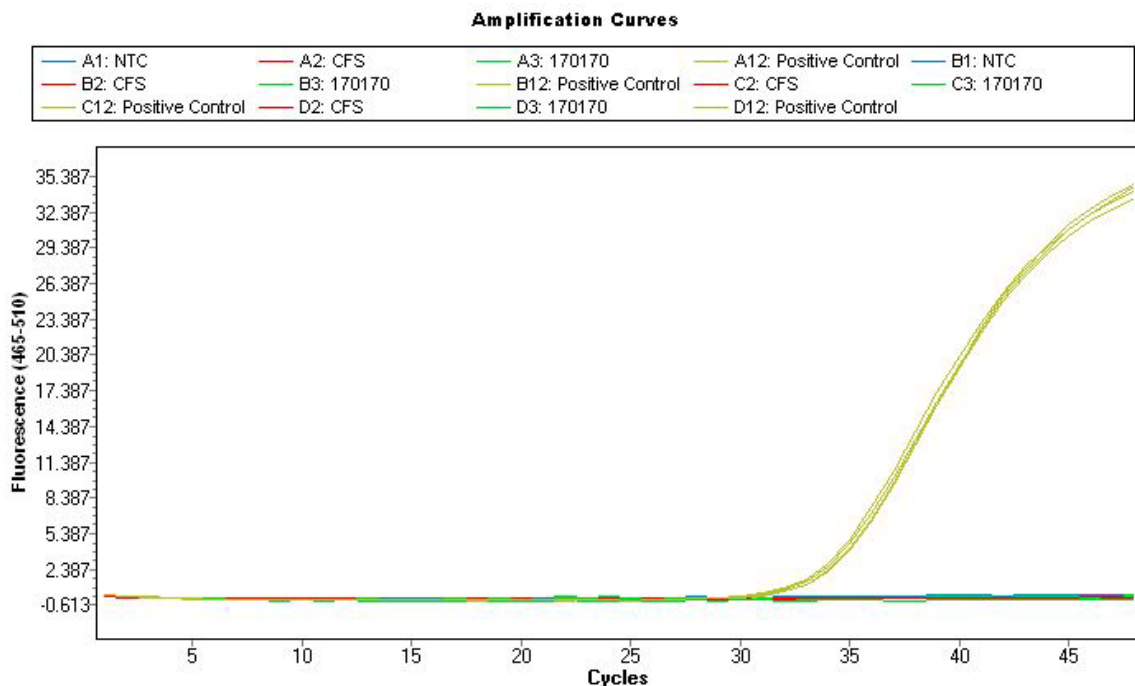


Abbildung 11: Beispiel für die RealTime PCR für Mycoplasmen: Positive Amplifikation der Positivkontrollen, keine Amplifikation der Negativkontrollen und der Proben. Detektion im Fluoreszenzkanal FAM [465 – 510 nm]; NTC = No template Control; CFS = Cell Free Sample; 170170 = Probe des Endproduktes nach T-Zell Transduktion Nr. 2

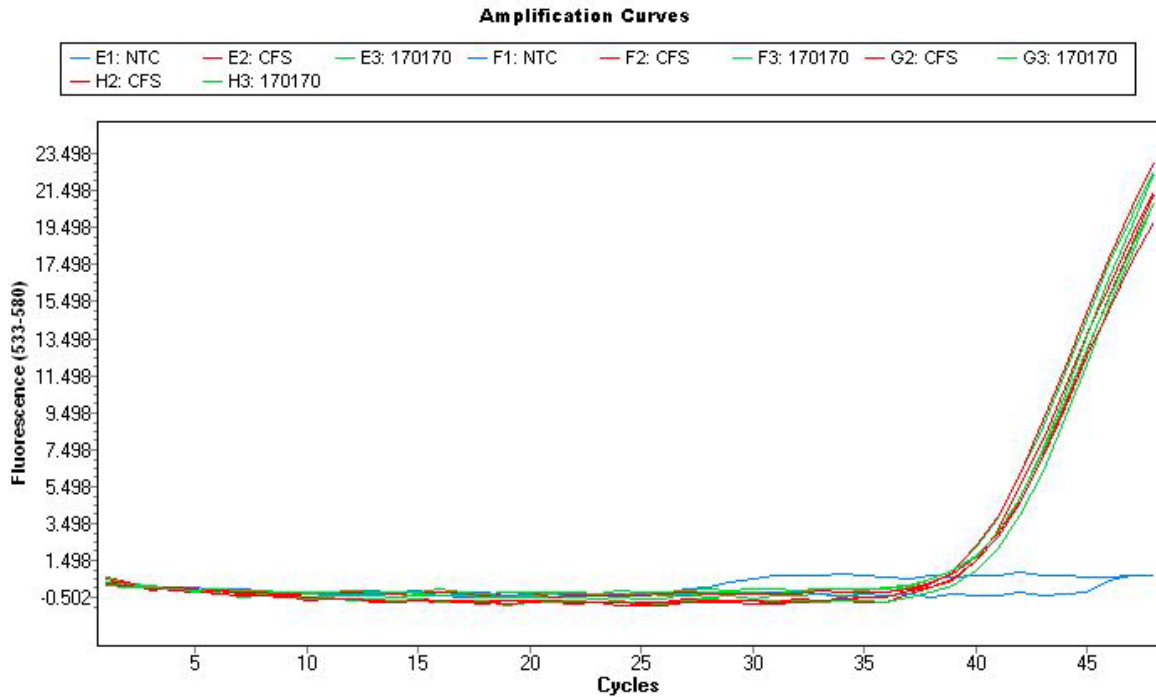


Abbildung 12: Beispiel für die RealTime PCR für die Recovery Control: Positive Amplifikation aller Proben, keine Amplifikation der Negativkontrollen. Detektion im Fluoreszenzkanal VIC/HEX/Yellow555 [533 – 580 nm]; NTC = No template Control; CFS = Cell Free Sample; 170170 = Probe des Endprodukts nach T-Zell Transduktion Nr. 2

Acceptance criteria	Range	Result	Valid	
Mycoplasma	all NTC (2/2)	neg	2/2	Valid
	all Positive Controls (4/4)	pos	4/4	Valid
Recovery				
Control	all NTC (2/2)	neg	2/2	Valid
	all Recovery Controls (4/4)	pos	4/4	Valid
Valid options	Signals > Cp 43	neg		

Tabelle 4; Beispiel für die Bewertung der Mycoplasmen-RealTime PCR der T-Zell Transduktion Nr. 2 anhand der Akzeptanzkriterien des Herstellers Roche.

Folgende Tabelle zeigt die Resultate der Mycoplasmen-Analyse aller drei T-Zell Transduktionen:

Mykoplasmen	TCT 1	TCT 2	TCT 3
Apheresat			
Selektionat			
Tag 0			
Tag 5			
Tag 12	negativ	negativ	negativ

Tabelle 5: Mykoplasmen

Die Ergebnisse der Mykoplasmenanalysen sind bei allen drei T-Zell Transduktionen negativ und erfüllen somit die Vorgaben.

### **3.5 Qualitätskontrolle: VCN (Vektor Copy Number)**

Die Analyse dient der Feststellung der Kopienanzahl des integrierten lentiviralen Vektors pro transduzierter Zelle. Die Methode ist eine quantitative RealTime PCR nach Vorgaben der Fa. Miltenyi Biotec GmbH.

Acceptance criteria		Range	<i>gag</i>		<i>PTBP2</i>	
			Result	Valid	Result	Valid
Standard						
curve	Slope	-3,1 - -3,6	-3,1	Valid	-3,2	Valid
	Efficiency	> 85 %	103,75%	Valid	101,85%	Valid
	Cp STD 1 (1 x 10 <sup>6</sup> copies/well)	15,0 - 18,0	18	Valid	17	Valid
	NTC: at least 2/3	0 or N/A	3/3	Valid	3/3	Valid
		25.000 -				
QC	QC 1 50.000 copies/μl	100.000	57.300	Valid	63.100	Valid
		2.500 -				
	QC 2 5.000 copies/μl	10.000	5.940	Valid	6.150	Valid
		250 -				
	QC 3 500 copies/μl	1.000	838	Valid	597	Valid
	QC 4 50 copies/μl	25 - 100	56	Valid	68	Valid
Valid options	Omission of up to 3 outliers from STD curve	> 0,5 CP	0	Valid	0	Valid
	Omission of 1 STD		0	Valid	0	Valid
	Signals > Cp 35	N/A				

Tabelle 6: Beispiel für die Bewertung der RealTime PCR für die Vector Copy Number der T-Zell Transduktion Nr. 3 anhand der Akzeptanzkriterien der Fa. Miltenyi Biotec GmbH.

VCN	TCT 1	TCT 2	TCT 3
Apheresat		0,0	0,0
Selektionat			0,0
Tag 0		0,0	0,0
Tag 5		4,7	1,3
Tag 12	4,5	3,8	4,0

Tabelle 7: Ergebnisse der Vector Copy Number-Analysen als Kopien pro transduzierter Zelle. Wesentlich sind die Ergebnisse des Tages 12 (Endprodukt). Die Tests von Ausgangsmaterial, Selektionat und Proben von Tag 0 und Tag 5 dienten ausschließlich der Verlaufskontrolle

Laut Freigabekriterien der Fa. Miltenyi Biotec soll die Vector Copy Number < 5,0 Kopien pro transduzierter Zelle sein. Diese Vorgabe konnte bei allen drei T-Zell Transduktionen erfüllt werden.

## 4 Diskussion

Die akute lymphatische Leukämie des Kindesalters ist gut therapierbar, jedoch reichen für etwa 10% der PatientInnen die aktuellen Leitlinien zur Therapie nicht aus oder es kommt zu Rezidiven. T-Zellen, die für die Tumorabwehr zuständig sind, können nicht immer Tumore erfolgreich bekämpfen. Durch Tumorabwehrmechanismen werden T-Zellen so manipuliert, dass sie den Tumor nicht bekämpfen, sondern tolerieren oder sie werden selber angegriffen und zerstört. Durch Manipulation der T-Zellen wiederum ist es gelungen 10% der therapierefraktären Kinder eine neue Chance auf Heilung zu ermöglichen. Die adaptive T-Zell Therapie hat mehr als 20 Jahre benötigt, um die nötige Effizienz in Form der CAR T-Zellen zur Verbesserung der Therapie aufzuweisen. Noch heute stehen einige Fragen offen und es wird noch weiter am CAR-Konstrukt zur Verbesserung und Weiterentwicklung geforscht. Bei hämatologischen Malignitäten wurden bereits gute Erfolge erzielt. An soliden Tumoren wurden mit Hilfe der Immuntherapien neue Ansatzpunkte gefunden, die in Angriff genommen werden können. Dies hat auch dazu beigetragen, dass viel über Tumore generell und v.a. über die Tumorumwelt bekannt geworden ist. Aber an soliden Tumoren ist die CAR-T-Zell Therapie noch nicht ganz angeschlagen. Deshalb bedarf es hierbei noch weiterer Forschung.

Die vorliegende Arbeit hat die Aufgabe herauszufinden, ob mit dem geschlossenen System von Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland), dem CliniMACS Prodigy®, die Herstellung von CAR-T-Zellen in adäquaten, therapeutisch nutzbaren Dosen möglich erscheint. Um die Aufgabe zu beantworten, muss zu den Vorversuchen das Endprodukt validiert werden. Neben immunologischen Parametern muss das Endprodukt in Hinsicht auf erfolgreiches Übertragen des chimären Antigen Rezeptors überprüft werden. Dass dabei die Zellen vital sein sollen, ist von größter Bedeutung. Wie bereits bei den Ergebnissen angeführt, sind die Vorversuche geglückt und die Herstellung ist mit Hilfe des CliniMACS Prodigy durchgeführt worden. Neben der erforderlichen Zellzahl und der erfolgreichen Transduktion des chimären Antigenrezeptors sind die immunologischen Parameter negativ geblieben und somit frei von Mikroorganismen und deren Toxinen. Damit ist der erste Schritt für das Bereitstellen dieser Therapieform am Landeskrankenhaus Graz getan. Im Vergleich mit anderen Studien zur Herstellung von CAR-T-Zellen, mittels dem

CliniMACS Prodigy System wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Mock, Nickolay et al. 2016b haben neben dem geschlossenen Versuch am CliniMACs Prodigy einen direkten Vergleich im Labor gestartet. Dabei zeigte sich, dass zwischen der manuellen und der automatischen Herstellung von CAR-T-Zellen vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf Transduktionseffizienz und erforderlichen Zellzahlen zu erzielen sind. Darüber hinaus ist nur eine minimale Ausprägung des PD-1 Rezeptors vorgekommen. Zhang, Jordan et al. 2018 haben auch die Durchführbarkeit im Universitätsklinikum Aurora, Colorado bewiesen und für den Klinikgebrauch zugelassen. Auch duale CAR-Konstrukte konnten dabei hergestellt werden. Demonstriert wurde das ganze durch Zhu, Shah et al. 2018, die CD19/CD20 CAR hergestellt haben, weil bei PatientInnen mit CD19+ ALL vermehrt Rezidive aufgetreten sind. Dadurch kann auch nach Runterregulieren des CD19 Antigens die ALL bekämpft werden. Es wurde an mehreren Standorten bewiesen, dass das automatisierte Herstellen der CAR-T-Zellen in einem geschlossenen System vergleichbare Ergebnisse gewährleistet, wie das aufwändig manuelle Herstellen im Labor. Außerdem wurden Kosten und Personal eingespart, was die Durchführbarkeit erleichtert und die Therapiebereitstellung beschleunigt.

## 5 Literaturverzeichnis

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. and PILLAI, S., 2014. *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.

AHMADZADEH, M., JOHNSON, L.A., HEEMSKERK, B., WUNDERLICH, J.R., DUDLEY, M.E., WHITE, D.E. and ROSENBERG, S.A., 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, **114**(8), pp. 1537-1544.

BAE, E., SEO, H., KIM, I., JEON, I. and KANG, C., 2019. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Archives of Pharmacal Research*, , pp. 1-6.

BANCHEREAU, J. and PALUCKA, A.K., 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, **5**(4), pp. 296.

BARTRAM, C.R., SCHRAUDER, A., KOHLER, R. and SCHRAPPE, M., 2012. Acute lymphoblastic leukemia in children: treatment planning via minimal residual disease assessment. *Deutsches Arzteblatt international*, **109**(40), pp. 652-658.

BONNER, J.A., HARARI, P.M., GIRALT, J., AZARNIA, N., SHIN, D.M., COHEN, R.B., JONES, C.U., SUR, R., RABEN, D. and JASSEM, J., 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, **354**(6), pp. 567-578.

BRODY, J.D., AI, W.Z., CZERWINSKI, D.K., TORCHIA, J.A., LEVY, M., ADVANI, R.H., KIM, Y.H., HOPPE, R.T., KNOX, S.J., SHIN, L.K., WAPNIR, I., TIBSHIRANI, R.J. and LEVY, R., 2010. In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**(28), pp. 4324-4332.

BUCHHOLZ, C.J., HARTMANN, J., SCHÜSSLER-LENZ, M. and KELLER-STANISLAWSKI, B., 2018. CAR-T-Zell-Therapie: Aussichten und Risiken. *Deutsches Arzteblatt international*, .

BURNETT, A.K., HILLS, R.K., MILLIGAN, D., KJELDSSEN, L., KELL, J., RUSSELL, N.H., YIN, J.A., HUNTER, A., GOLDSTONE, A.H. and WHEATLEY, K., 2010. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *Journal of clinical oncology*, **29**(4), pp. 369-377.

CHARROT, S. and HALLAM, S., 2019. CAR-T cells: future perspectives. *HemaSphere*, **3**(2), pp. e188.

CHMIELEWSKI, M. and ABKEN, H., 2015. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy*, **15**(8), pp. 1145-1154.

COIFFIER, B., LEPAGE, E., BRIERE, J., HERBRECHT, R., TILLY, H., BOUABDALLAH, R., MOREL, P., VAN DEN NESTE, E., SALLES, G. and GAULARD, P., 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP

alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, **346**(4), pp. 235-242.

DAVILA, M.L. and SADELAIN, M., 2016. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *International journal of hematology*, **104**(1), pp. 6-17.

DISIS, M.L., GOOLEY, T.A., RINN, K., DAVIS, D., PIEPKORN, M., CHEEVER, M.A., KNUTSON, K.L. and SCHIFFMAN, K., 2002. Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *Journal of Clinical Oncology*, **20**(11), pp. 2624-2632.

DOUGAN, M. and DRANOFF, G., 2009. Immune therapy for cancer. *Annual Review of Immunology*, **27**, pp. 83-117.

D'SOUZA, G. and DEMPSEY, A., 2011. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive medicine*, **53**, pp. S5-S11.

ESCHERICH, G., HORSTMANN, M., ZIMMERMANN, M. and JANKA-SCHAUB, G., 2010. Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukaemia (COALL): long-term results of trials 82, 85, 89, 92 and 97. *Leukemia*, **24**(2), pp. 298.

FERENCÍK, M., ROVENSKY, J., MATHA, V. and HEROLD, M., 2006. *Kompndium der Immunologie: Grundlagen und Klinik*. Springer-Verlag.

FERRARA, J.L., LEVINE, J.E., REDDY, P. and HOLLER, E., 2009. Graft-versus-host disease. *The Lancet*, **373**(9674), pp. 1550-1561.

FINNEY, O.C., BRAKKE, H., RAWLINGS-RHEA, S., HICKS, R., DOOLITTLE, D., LOPEZ, M., FUTRELL, B., ORENTAS, R.J., LI, D. and GARDNER, R., 2019. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *The Journal of clinical investigation*, **129**(5), pp. 2123-2132.

FRY, T.J., SHAH, N.N., ORENTAS, R.J., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C.M., RAMAKRISHNA, S., WOLTERS, P., MARTIN, S., DELBROOK, C. and YATES, B., 2018. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature medicine*, **24**(1), pp. 20.

GRUPP, S.A., KALOS, M., BARRETT, D., APLENC, R., PORTER, D.L., RHEINGOLD, S.R., TEACHEY, D.T., CHEW, A., HAUCK, B. and WRIGHT, J.F., 2013. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **368**(16), pp. 1509-1518.

HAMMER, O., 2012. CD19 as an attractive target for antibody-based therapy, *MAbs* 2012, Taylor & Francis, pp. 571-577.

HEIBLIG, M., ELHAMRI, M., MICHALLET, M. and THOMAS, X., 2015. Adoptive immunotherapy for acute leukemia: New insights in chimeric antigen receptors. *World journal of stem cells*, **7**(7), pp. 1022-1038.

HILLMEN, P., SKOTNICKI, A.B., ROBAK, T., JAKSIC, B., DMOSZYNSKA, A., WU, J., SIRARD, C. and MAYER, J., 2007. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **25**(35), pp. 5616-5623.

HODI, F.S., O'DAY, S.J., MCDERMOTT, D.F., WEBER, R.W., SOSMAN, J.A., HAANEN, J.B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D. and HASSEL, J.C., 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*, **363**(8), pp. 711-723.

HOPFINGER, G., JÄGER, U. and WOREL, N., 2019. CAR-T cell therapy in diffuse large B cell lymphoma: hype and hope. *HemaSphere*, **3**(2), pp. e185.

HUANG, X., WANG, Y., LIU, D., XU, L., LIU, K., CHEN, H., CHEN, Y., HAN, W. and SHI, H., 2009. Administration of short-term immunosuppressive agents after DLI reduces the incidence of DLI-associated acute GVHD without influencing the GVL effect. *Bone marrow transplantation*, **44**(5), pp. 309.

JACKSON, H.J., RAFIQ, S. and BRENTJENS, R.J., 2016. Driving CAR T-cells forward. *Nature reviews Clinical oncology*, **13**(6), pp. 370.

JONKER, D.J., O'CALLAGHAN, C.J., KARAPETIS, C.S., ZALCBERG, J.R., TU, D., AU, H., BERRY, S.R., KRAHN, M., PRICE, T. and SIMES, R.J., 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, **357**(20), pp. 2040-2048.

JUNE, C.H., 2007. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of clinical investigation*, **117**(6), pp. 1466-1476.

KAATSCH, P., SPIX, C., KATALINIC, A., HENTSCHEL, S., LUTTMANN, S., STEGMAIER, C., CASPRITZ, S., CHRIST, M., ERNST, A. and FOLKERTS, J., 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012.

KANTARJIAN, H., STEIN, A., GÖKBUGET, N., FIELDING, A.K., SCHUH, A.C., RIBERA, J., WEI, A., DOMBRET, H., FOÀ, R. and BASSAN, R., 2017. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **376**(9), pp. 836-847.

KEILHOLZ, U., BERGMANN, L., SCHMITT, M. and SCHEIBENBOGEN, C., 2006. Zelluläre Immuntherapie. *Kompodium Internistische Onkologie*. Springer, pp. 707-713.

KLESMITH, J.R., SU, L., WU, L., SCHRACK, I.A., DUFORT, F.J., BIRT, A., AMBROSE, C., HACKEL, B.J., LOBB, R.R. and RENNERT, P.D., 2019. Retargeting CD19 CAR T cells via engineered CD19-fusion proteins. *Molecular pharmaceuticals*, .

KOCHENDERFER, J.N., DUDLEY, M.E., KASSIM, S.H., SOMERVILLE, R.P., CARPENTER, R.O., STETLER-STEVENSON, M., YANG, J.C., PHAN, G.Q., HUGHES, M.S., SHERRY, R.M., RAFFELD, M., FELDMAN, S., LU, L., LI, Y.F., NGO, L.T., GOY, A., FELDMAN, T., SPANER, D.E., WANG, M.L., CHEN, C.C.,

KRANICK, S.M., NATH, A., NATHAN, D.A., MORTON, K.E., TOOMEY, M.A. and ROSENBERG, S.A., 2015. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **33**(6), pp. 540-549.

LEE, D.W., KOCHENDERFER, J.N., STETLER-STEVENSON, M., CUI, Y.K., DELBROOK, C., FELDMAN, S.A., FRY, T.J., ORENTAS, R., SABATINO, M. and SHAH, N.N., 2015. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, **385**(9967), pp. 517-528.

LIU, X., RANGANATHAN, R., JIANG, S., FANG, C., SUN, J., KIM, S., NEWICK, K., LO, A., JUNE, C.H., ZHAO, Y. and MOON, E.K., 2016. A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors. *Cancer research*, **76**(6), pp. 1578-1590.

LU, C., KLEMENT, J.D., IBRAHIM, M.L., XIAO, W., REDD, P.S., NAYAK-KAPOOR, A., ZHOU, G. and LIU, K., 2019. Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal for immunotherapy of cancer*, **7**(1), pp. 157.

MALLMANN, P. and KREBS, D., 1995. Generation and activation of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) within the scope of lymphokine activated killer cell therapy (LAK-TIL therapy) in patients with advanced breast and ovarian carcinoma. *Gynakologisch-geburtshilfliche Rundschau*, **35 Suppl 1**, pp. 161-165.

MARIN, V., PIZZITOLA, I., AGOSTONI, V., ATTIANESE, G.M., FINNEY, H., LAWSON, A., PULE, M., ROUSSEAU, R., BIONDI, A. and BIAGI, E., 2010. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica*, **95**(12), pp. 2144-2152.

MAUDE, S.L., FREY, N., SHAW, P.A., APLENC, R., BARRETT, D.M., BUNIN, N.J., CHEW, A., GONZALEZ, V.E., ZHENG, Z. and LACEY, S.F., 2014. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New England Journal of Medicine*, **371**(16), pp. 1507-1517.

MAUDE, S.L., BARRETT, D., TEACHEY, D.T. and GRUPP, S.A., 2014. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, **20**(2), pp. 119-122.

MET, Ö, JENSEN, K.M., CHAMBERLAIN, C.A., DONIA, M. and SVANE, I.M., 2019. Principles of adoptive T cell therapy in cancer, *Seminars in immunopathology* 2019, Springer, pp. 49-58.

MILLER, J.S., WEISDORF, D.J., BURNS, L.J., SLUNGAARD, A., WAGNER, J.E., VERNERIS, M.R., COOLEY, S., WANGEN, R., FAUTSCH, S.K., NICKLOW, R., DEFOR, T. and BLAZAR, B.R., 2007. Lymphodepletion followed by donor

lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone. *Blood*, **110**(7), pp. 2761-2763.

MOCK, U., NICKOLAY, L., PHILIP, B., CHEUNG, G.W., ZHAN, H., JOHNSTON, I.C., KAISER, A.D., PEGGS, K., PULE, M. and THRASHER, A.J., 2016a. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*, **18**(8), pp. 1002-1011.

MOCK, U., NICKOLAY, L., PHILIP, B., CHEUNG, G.W., ZHAN, H., JOHNSTON, I.C., KAISER, A.D., PEGGS, K., PULE, M. and THRASHER, A.J., 2016b. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*, **18**(8), pp. 1002-1011.

MORETON, P., KENNEDY, B., LUCAS, G., LEACH, M., RASSAM, S.M., HAYNES, A., TIGHE, J., OSCIER, D., FEGAN, C. and RAWSTRON, A., 2005. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(13), pp. 2971-2979.

MURPHY, K. and WEAVER, C., 2016. *Janeway's immunobiology*. Garland Science.

NEUMANN, J., 2008. *Immunbiologie: Eine Einführung*. Springer-Verlag.

NIEMEYER, C. and EGGERT, A., 2017. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer-Verlag.

PARK, J.H., RIVIÈRE, I., GONEN, M., WANG, X., SÉNÉCHAL, B., CURRAN, K.J., SAUTER, C., WANG, Y., SANTOMASSO, B. and MEAD, E., 2018. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **378**(5), pp. 449-459.

PETTITT, A.R., JACKSON, R., CARRUTHERS, S., DODD, J., DODD, S., OATES, M., JOHNSON, G.G., SCHUH, A., MATUTES, E. and DEARDEN, C.E., 2012. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *Journal of Clinical Oncology*, **30**(14), pp. 1647-1655.

PORTER, D.L., LEVINE, B.L., KALOS, M., BAGG, A. and JUNE, C.H., 2011. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **365**(8), pp. 725-733.

PUI, C., CHENG, C., LEUNG, W., RAI, S.N., RIVERA, G.K., SANDLUND, J.T., RIBEIRO, R.C., RELLING, M.V., KUN, L.E. and EVANS, W.E., 2003. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **349**(7), pp. 640-649.

QASIM, W., ZHAN, H., SAMARASINGHE, S., ADAMS, S., AMROLIA, P., STAFFORD, S., BUTLER, K., RIVAT, C., WRIGHT, G., SOMANA, K., GHORASHIAN, S., PINNER, D., AHSAN, G., GILMOUR, K., LUCCHINI, G.,

INGLOTT, S., MIFSUD, W., CHIESA, R., PEGGS, K.S., CHAN, L., FARZENEH, F., THRASHER, A.J., VORA, A., PULE, M. and VEYS, P., 2017. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science translational medicine*, **9**(374), pp. 10.1126/scitranslmed.aaj2013.

RIDDELL, S.R., 2004. Finding a place for tumor-specific T cells in targeted cancer therapy. *The Journal of experimental medicine*, **200**(12), pp. 1533-1537.

RINK, L., KRUSE, A. and HAASE, H., 2012. *Immunologie für Einsteiger*. Springer.

RITCHIE, D.S., NEESON, P.J., KHOT, A., PEINERT, S., TAI, T., TAINTON, K., CHEN, K., SHIN, M., WALL, D.M. and HÖNEMANN, D., 2013. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Molecular Therapy*, **21**(11), pp. 2122-2129.

ROBERT, C., SCHACHTER, J., LONG, G.V., ARANCE, A., GROB, J.J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M.S., MCNEIL, C. and LOTEM, M., 2015. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*, **372**(26), pp. 2521-2532.

ROSENBERG, S.A., PACKARD, B.S., AEBERSOLD, P.M., SOLOMON, D., TOPALIAN, S.L., TOY, S.T., SIMON, P., LOTZE, M.T., YANG, J.C. and SEIPP, C.A., 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*, **319**(25), pp. 1676-1680.

SADELAIN, M., 2015. CAR therapy: the CD19 paradigm. *The Journal of clinical investigation*, **125**(9), pp. 3392-3400.

SADELAIN, M., RIVIÈRE, I. and RIDDELL, S., 2017. Therapeutic T cell engineering. *Nature*, **545**(7655), pp. 423.

SANDLER, A., GRAY, R., PERRY, M.C., BRAHMER, J., SCHILLER, J.H., DOWLATI, A., LILENBAUM, R. and JOHNSON, D.H., 2006. Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, **355**(24), pp. 2542-2550.

SCHADENDORF, D., UGUREL, S., SCHULER-THURNER, B., NESTLE, F., ENK, A., BRÖCKER, E., GRABBE, S., RITTGEN, W., EDLER, L. and SUCKER, A., 2006. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Annals of Oncology*, **17**(4), pp. 563-570.

SCHRAPPE, M., ZIMMERMANN, M., MÖRICKE, A., MANN, G., VALSECCHI, M.G., BARTRAM, C.R., BIONDI, A., PANZER-GRÜMAYER, R., BEIER, R. and CARIO, G., 2016. *Reduced intensity delayed intensification in standard-risk patients defined by minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of an international randomized trial in 1164 patients (Trial AIEOP-BFM ALL 2000)*, .

SCHULSTER, M., 2019. Bladder Cancer Academy 2019 Selected Summaries. *Reviews in Urology*, **21**(1), pp. 23.

SCHÜTT, C. and BRÖKER, B., 2011. *Grundwissen Immunologie*. Springer-Verlag.

SHLOMCHIK, W.D., 2007. Graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology*, **7**(5), pp. 340.

SITZMANN, F.C., 2007. Duale Reihe Pädiatrie.

SLAMON, D.J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J. and PEGRAM, M., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, **344**(11), pp. 783-792.

SPEER, C.P. and GAHR, M., 2013. *Pädiatrie*. Springer-Verlag.

SRIVASTAVA, S. and RIDDELL, S.R., 2015. Engineering CAR-T cells: design concepts. *Trends in immunology*, **36**(8), pp. 494-502.

STORB, R.F., CHAMPLIN, R., RIDDELL, S.R., MURATA, M., BRYANT, S. and WARREN, E.H., 2001. Non-myeloablative transplants for malignant disease. *Hematology.American Society of Hematology.Education Program*, , pp. 375-391.

TIO, D.C.K.S., VAN MONTFRANS, C., RUIJTER, C.G.H., HOEKZEMA, R. and BEKKENK, M.W., 2019. Effectiveness of 5% Topical Imiquimod for Lentigo Maligna Treatment. *Acta Dermato-Venereologica*, .

TOKAREW, N., OGONEK, J., ENDRES, S., VON BERGWELT-BAILDON, M. and KOBOLD, S., 2018. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *British journal of cancer*, , pp. 1.

TRAN JANCO, J.M., LAMICHHANE, P., KARYAMPUDI, L. and KNUTSON, K.L., 2015. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **194**(7), pp. 2985-2991.

TURTLE, C.J., HANAFI, L.A., BERGER, C., HUDECEK, M., PENDER, B., ROBINSON, E., HAWKINS, R., CHANEY, C., CHERIAN, S., CHEN, X., SOMA, L., WOOD, B., LI, D., HEIMFELD, S., RIDDELL, S.R. and MALONEY, D.G., 2016. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Science translational medicine*, **8**(355), pp. 355ra116.

WANG, K., WEI, G. and LIU, D., 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology & oncology*, **1**(1), pp. 36.

WEI, G., DING, L., WANG, J., HU, Y. and HUANG, H., 2017. Advances of CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Experimental hematology & oncology*, **6**(1), pp. 10.

WEILAND, J., PAL, D., CASE, M., IRVING, J., PONTAN, F., KOSCHMIEDER, S., HEIDENREICH, O., VON STACKELBERG, A., ECKERT, C. and VORMOOR, J., 2016. BCP-ALL blasts are not dependent on CD19 expression for leukaemic maintenance. *Leukemia*, **30**(9), pp. 1920.

WOLCHOK, J.D., KLUGER, H., CALLAHAN, M.K., POSTOW, M.A., RIZVI, N.A., LESOKHIN, A.M., SEGAL, N.H., ARIYAN, C.E., GORDON, R. and REED, K., 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*, **369**(2), pp. 122-133.

XU, D., JIN, G., CHAI, D., ZHOU, X., GU, W., CHONG, Y., SONG, J. and ZHENG, J., 2018. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget*, **9**(17), pp. 13991.

YEE, C., THOMPSON, J., BYRD, D., RIDDELL, S., ROCHE, P., CELIS, E. and GREENBERG, P., 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8 T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(25), pp. 16168-16173.

YU, P. and FU, Y., 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory investigation*, **86**(3), pp. 231.

YU, S., LI, A., LIU, Q., LI, T., YUAN, X., HAN, X. and WU, K., 2017. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *Journal of hematology & oncology*, **10**(1), pp. 78.

ZHANG, W., JORDAN, K.R., SCHULTE, B. and PUREV, E., 2018. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system. *Drug design, development and therapy*, **12**, pp. 3343.

ZHU, F., SHAH, N., XU, H., SCHNEIDER, D., ORENTAS, R., DROPULIC, B., HARI, P. and KEEVER-TAYLOR, C.A., 2018. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*, **20**(3), pp. 394-406.