

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluation des Einflusses der PD-1-Inhibition auf die  
Effektivität der chimären Antigenrezeptor (CAR) T-Zelltherapie  
im Neuroblastom

Evaluating the influence of PD-1 inhibition on chimeric antigen  
receptor (CAR) T cell therapy efficacy in neuroblastoma

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karin Töws

aus Halle Westf., Deutschland

Datum der Promotion: 26.06.2022

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1 Kurzdarstellung	6
1.2 Deutsche Kurzdarstellung	6
1.3 Englische Kurzdarstellung	7
<b>2 Einführung</b>	<b>8</b>
2.1 Neuroblastom	8
2.2 Chimäre Antigenrezeptor T-Zellen	10
2.3 PD-1/PD-L1-Signalweg	11
2.4 Zellbasierte Immuntherapien bei soliden Tumoren	12
2.5 CAR-T-Zelltherapie bei refraktärem Neuroblastom oder Rezidiv	13
2.6 Zielsetzung	15
<b>3 Methodik</b>	<b>16</b>
3.1 Zelllinien und Zellkultur	16
3.2 Lentivirusproduktion	17
3.3 L1CAM-CAR-T-Zell Herstellung und Kultur	17
3.4 CRISPR/Cas9-basierte Herstellung von PD-L1 <i>knock-out</i> Neuroblastomzellen	19
3.5 Behandlung mit monoklonalem PD-1-Antikörper	20
3.6 Zytotoxizitätsassay	20
3.7 Stresstest	21
3.8 ELISA-basierte Messung der Zytokinproduktion	22
3.9 Durchflusszytometrie	22
3.10 Statistische Analyse	22
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1 Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse bei Ko-Kultur von L1CAM-CAR-T- mit Neuroblastomzellen	23
4.2 Mechanismen der PD-1/PD-L1-Induktion unterscheiden sich zwischen Neuroblastom- und L1CAM-CAR-T-Zellen	25
4.3 PD-1 Inhibition erhöht L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität unabhängig	

	3
von der PD-L1 Expressionshöhe	27
4.4 Einfluss des CAR-T-Zell Ausgangsmaterials auf die PD-1/PD-L1-Achse	29
4.5 Erhöhte PD-1/PD-L1 Expression in CAR-T-Zellen mit T <sub>CM</sub> -Ursprung ist unabhängig von der kostimulatorischen Domäne	32
4.6 Erschöpfte L1CAM-CAR-T-Zellen profitieren stärker von PD-1- <i>Checkpoint</i> -Inhibition	33
4.7 T-Zell-Subpopulation für CAR-T-Zell Herstellung bestimmt PD-1/PD-L1 Expression anhaltend	36
<b>5 Diskussion</b>	<b>37</b>
5.1 Rationale für eine Kombinationstherapie von PD-1- <i>Checkpoint</i> -Inhibitoren und CAR-T-Zelltherapie beim Neuroblastom	37
5.2 Regulierung der PD-1/PD-L1-Achsen-Induktion	40
5.3 Einfluss auf die PD-1/PD-L1-Achse	42
5.4 Limitationen	44
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>7 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung</b>	<b>51</b>
7.1 Eidesstattliche Versicherung	51
7.2 Anteilserklärung	52
<b>8 Auszug aus der <i>Journal Summary List</i></b>	<b>54</b>
<b>9 Druckexemplar der Originalpublikation</b>	<b>59</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>71</b>
<b>11 Vollständige Publikationsliste</b>	<b>73</b>
<b>12 Danksagung</b>	<b>74</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des chimären Antigenrezeptors	10
Abbildung 2: PD1- <i>Checkpoint</i> -Inhibition vermindert Hypofunktion der CAR-T-Zellen	13
Abbildung 3: L1CAM-CAR-Konstrukte der zweiten Generation	18
Abbildung 4: L1CAM-CAR-T-Zell-Konfrontation aktiviert die PD-1/PD-L1-Achse in Neuroblastomzellen	25
Abbildung 5: Transduktionseffizienz	24
Abbildung 6: Mechanismen der PD-1/PD-L1-Induktion in CAR-T- und Neuroblastomzellen	26
Abbildung 7: Erhöhte L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität durch PD-1- <i>Checkpoint</i> -Inhibition	28
Abbildung 8: Ausgangsmaterial für CAR-T-Zellgenerierung beeinflusst Nivolumab-Effektivität	31
Abbildung 9: Höhere PD-1/PD-L1 Expression der CAR-T-Zellen mit T <sub>CM</sub> -Ursprung ist unabhängig von kostimulatorischer Domäne	33
Abbildung 10: CAR-T-Zell-Erschöpfung ist Voraussetzung für Nivolumab-Effektivität	35
Abbildung 11: Anhaltender Einfluss der T-Zell-Fraktion auf PD-1/PD-L1-Achse	37

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	16
Tabelle 2: Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper	23

## Abkürzungsverzeichnis

CAR – chimärer Antigenrezeptor

PD-1 – *programmed cell death 1*

PD-L1 – *programmed cell death 1 ligand 1*

T<sub>CM</sub> – englisch für *central memory T cells*, zentrale Gedächtnis-T-Zellen

T<sub>NS</sub> – nicht selektierte T-Zellen

FACS – englisch für *fluorescence-activated cell sorting*, Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer

EGFR<sub>t</sub> – englisch für *truncated epidermal growth factor receptor*, blind-endender epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

RNA – englisch für *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure

DNA – englisch für *desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure

gRNA – englisch für *guide RNA*, Leit-Ribonukleinsäure

IFNG – Interferon gamma

TNF- $\alpha$  - Tumornekrosefaktor- $\alpha$

KO – *knock-out*

IL – Interleukin

Ig – Immunoglobulin

NaCl – Natriumchlorid

FCS – englisch für *fetal calf serum*, fetales Kälberserum

E:Z – Effektor-zu-Zielzelle

KM – konditioniertes Medium

# 1 Zusammenfassung

**Vormerkung:** Diese Dissertation fasst meine Arbeit zum Thema „Evaluation des Einflusses der PD-1-Inhibition auf die Effektivität der chimären Antigenrezeptor (CAR) T-Zelltherapie im Neuroblastom“ als Publikationspromotion zusammen. Der Text der vorliegenden Zusammenfassung basiert zu großen Anteilen auf der Originalpublikation „Central memory phenotype drives success of checkpoint inhibition in combination with CAR T cells“, für die ich das Manuskript erstellt habe.

## 1.1 Kurzdarstellung

### 1.2 Deutsche Kurzdarstellung

Adoptive Immunzelltherapien haben sich als vielversprechend und innovativ in der Krebsforschung behaupten können. Eine Form verwendet T-Zellen, die chimäre Antigenrezeptoren (CAR) exprimieren. Trotz bemerkenswerter Fortschritte im Bereich der CAR-T-Zelltherapie ist eine erhebliche Diskrepanz zwischen hämatologischen und soliden Tumorerkrankungen im Hinblick auf erste klinische Erfolge festzustellen. Während das klinische Ansprechen auf eine CAR-T-Zelltherapie bei der Mehrzahl hämatologischer Patienten exzellent ist, ist eine ähnlich erfolgreiche Anwendung bei soliden Tumoren bislang nicht gelungen. Man geht davon aus, dass das immunsuppressive Mikromilieu solider Tumoren eine Barriere für den Eintritt und die Effektivität zellbasierter Therapien darstellt. Die Kombination von CAR-T-Zelltherapie und PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren kann sich den Mechanismen der Immunevasion der Tumore entgegensetzen und die Anti-Tumor-Aktivität erhöhen. In dieser Arbeit evaluierten wir den Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse und die Wirkung eines PD-1-Inhibitors in *in vitro* Ko-Kulturen von Neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zellen mit verschiedenen Neuroblastomzelllinien. Der verwendete CAR erkennt das Tumor-assoziierte Antigen L1CAM, ein von Neuroblastomzellen exprimiertes neurales Zelladhäsionsmolekül. Durchflusszytometrie-basierte Analysen und Luciferase-basierte Reporter-Gen-Assays wurden verwendet, um die PD-1/PD-L1-Expression auf CAR-T- und Tumorzellen sowie die zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen zu beurteilen. Es wurden zwei Neuroblastomzelllinienmodelle generiert, die SK-N-BE(2)<sup>PD-L1+</sup>, die lentiviral mit PD-L1 transduziert wurden, und die SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup>, deren PD-L1 Genlocus mittels CRISPR/Cas 9 irreparabel zerstört wurde, um den Einfluss des PD-L1-

Expressionsniveaus auf die PD-1/PD-L1 vermittelte Inhibition zu bewerten. Die Ko-Kultivierung von Neuroblastomzelllinien und CAR-T-Zellen führte zur Hochregulation der PD-L1-Expression auf Neuroblastomzellen, was die adaptive Immunresistenz dieser bestätigte, und zur Induktion der PD-1/PD-L1-Expression in den CAR-T-Zellen. Der PD-1-Inhibitor, Nivolumab, verstärkte die zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen. Der Einfluss der PD-1-Blockade spiegelte sich nicht in einer veränderten Zytokinfreisetzung oder verminderten Apoptoserate der CAR-T-Zellen wider und das Ausmaß des Nutzens der PD-1-Blockade korrelierte nicht mit der PD-L1-Expression auf Neuroblastomzellen. Tatsächlich war der Erfolg der PD-1-Blockade von einer starken PD-1/PD-L1-Expression der CAR-T-Zellen selbst abhängig, die wiederum von der kostimulatorischen Domäne des CAR-Konstrukts und vor allem von der ausgewählten T-Zell-Fraktion für die CAR-T-Zellgenerierung abhing. Daher könnte die Auswahl der T-Zell-Fraktion und ein anschließendes Screening des PD-1/PD-L1-Expressionspiegels generierter CAR-T-Zellen dazu beitragen, festzustellen, wann eine Kombinationstherapie mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren die Effektivität der CAR-T-Zelltherapie verbessern könnte.

### 1.3 Englische Kurzdarstellung

Despite the remarkable potency of CD19-targeting CAR T cells against hematological malignancies, similar results have not yet been achieved for CAR T cell therapy of solid tumors. The immunosuppressive microenvironment in solid tumors is thought to contribute to the observed impediment of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy efficacy. A combinational treatment approach for CAR T cell therapy with complementing immunotherapies such as Programmed Cell Death-1 (PD-1) checkpoint inhibitors has proven to oppose immune escape mechanisms of solid tumors and augment anti-tumor efficacy. In this study, we evaluated the PD-1/PD-L1 checkpoint axis and the impact of a PD-1 inhibitor on CAR T cell efficacy in different *in vitro* co-culture set-up of neuroblastoma-specific CAR T cells with neuroblastoma cell lines. The CAR used recognizes the tumor-associated antigen L1CAM, a neural adhesion molecule expressed by neuroblastoma cells. Two neuroblastoma cell models were generated, the SK-N-BE(2)<sup>PD-L1+</sup>, which stably expresses PD-L1 from a lentiviral vector, and the SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup> using CRISPR/ Cas 9 to knock out PD-L1 to assess the impact of PD-L1 expression levels on the PD-1/PD-L1 signaling capacity. Flow cytometry-based analyses and luciferase reporter assays were used to assess PD-1/PD-L1 expression on CAR T and tumor cells as well as CAR T cell directed-killing of neuroblastoma cells. Co-culturing

neuroblastoma cell lines with L1CAM-CAR T cells upregulated PD-L1 expression on neuroblastoma cells, confirming adaptive immune resistance. In L1CAM-CAR T cells the expression of the PD-1/PD-L1 axis was induced after co-culture. The PD-1 checkpoint inhibitor, nivolumab, enhanced L1CAM-CAR T cell-directed killing. However, this benefit was not reflected in altered L1CAM-CAR-T cell cytokine release or decreased apoptosis. Interestingly, nivolumab-enhanced L1CAM-CAR T cell killing did not strictly correlate with PD-L1 expression on neuroblastoma cells. In fact, checkpoint inhibitor success relied on strong PD-1/PD-L1 axis expression in the L1CAM-CAR T cells themselves not tumor cells, which in turn depended on co-stimulatory domains within the CAR construct, and more importantly, on the subset of T cells selected for L1CAM-CAR T cell generation. Thus, T cell subset selection for CAR T cell generation and screening generated CAR T cell for PD-1/PD-L1 expression could help determine when to combine CAR T cell therapy with checkpoint inhibitors to improve treatment efficacy.

## **2 Einführung**

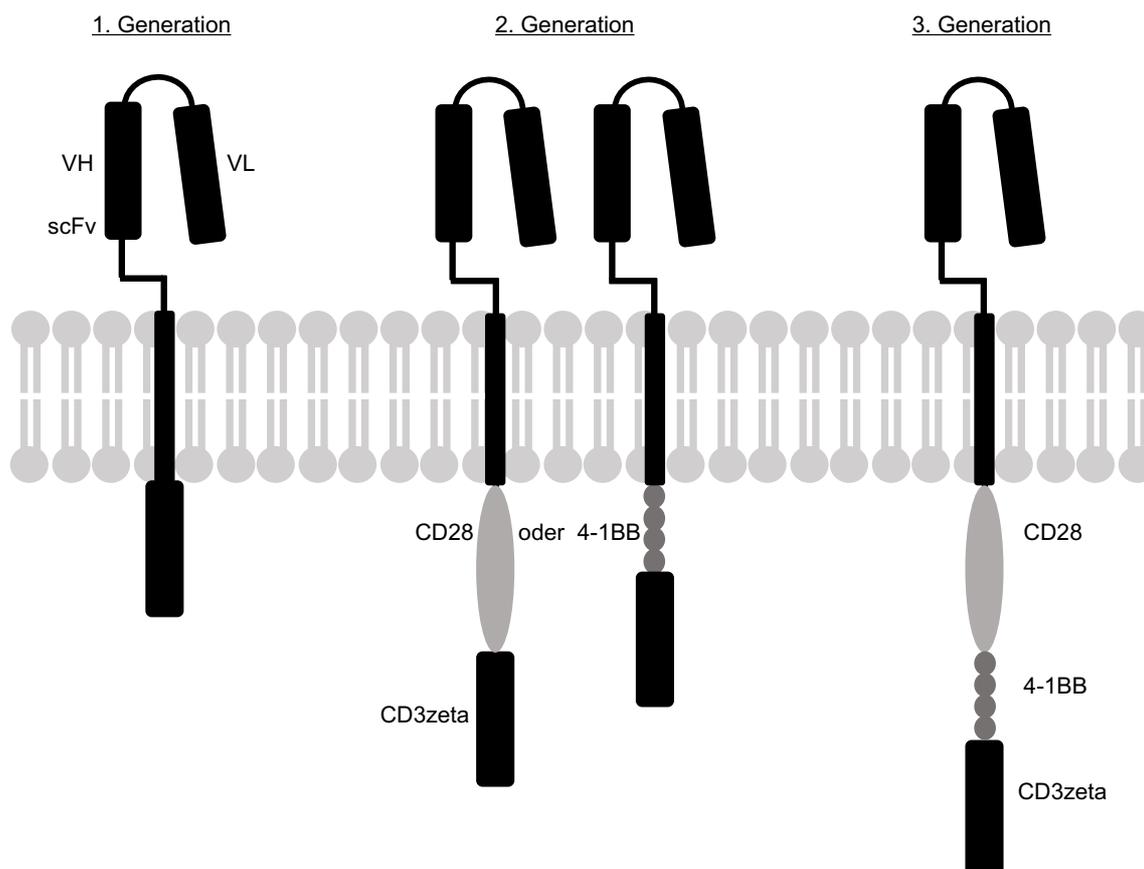
### **2.1 Neuroblastom**

Das Neuroblastom, der häufigste extrakranielle solide Tumor des Kindesalters, ist ein embryonaler Tumor des autonomen Nervensystems mit Ursprung aus sympathicoadrenalen Vorläuferzellen der Neuralleiste.<sup>1,2</sup> Aufgrund seines Ursprungs finden sich Primärtumoren des Neuroblastoms entlang des gesamten sympathischen Grenzstrangs oder vom Mark der Nebennieren ausgehend. Entsprechend der variablen Tumorlokalisation ist auch die klinische Präsentation des Neuroblastoms vielseitig. Es finden sich sowohl spezifische Symptome, wie das Horner Syndrom mit Ptosis, Miosis und Enophthalmus sowie Anhidrose bei Lokalisation im Bereich des oberen Grenzstrangs auf Höhe von Hals oder oberen Thorax als auch Schmerzen, Ausfallerscheinungen bis hin zu Querschnittssymptomatik bei tiefer liegender Lokalisation auf Höhe des Thorax, Abdomens und Beckens mit Verdrängung und Kompression des Rückenmarks. Insbesondere lokalisierte Tumore können Katecholamine sekretieren, die zu Tachykardie, Hypertension und Flush führen. Seltener kommt es zu paraneoplastischen Phänomenen, wie osmotischer Diarrhoe bei Produktion und Sekretion von vasoaktiven intestinalen Peptiden oder dem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom mit unkontrollierten Bewegungen der Augen und Gliedmaßen sowie Ataxie. Bei der Hälfte der Patienten liegt bei Erstdiagnose bereits eine Metastasierung des

Neuroblastoms vor, mit lymphatischer Ausbreitung in regionale Lymphknoten oder hämatologischen Absiedlungen in Leber, Haut und Knochenmark, zum Teil mit Infiltration und Bildung von Knochenmetastasen. Bei Metastasierung kommt es häufig zur Infiltration der Orbita und resultierende periorbitale Ekchymosen finden sich als typisches Zeichen einer bereits disseminierten Erkrankung. Genauso vielseitig wie die klinische Präsentation ist auch die Prognose des Neuroblastom mit aggressiven Verläufen mit einem Langzeit-Überleben von weniger als 40% bis zu milderer Verläufen früher und intermediärer Stadien mit einem Langzeit-Überleben von mehr als 90 %. Eine Sonderstellung haben dabei Tumore im Stadium 4S, bei denen es häufig zur spontanen Remission kommt und eine alleinige Beobachtung ausreichend ist. Diese lokalisierten Primärtumore betreffen Kinder, die jünger als 12 Monate alt sind und deren Erkrankung disseminiert ist, wobei nur Metastasen der Haut und Leber sowie eine Infiltration des Knochenmarks mit weniger als 10% malignen Zellen vorliegen. Die Risikostratifikation und Stadieneinteilung des Neuroblastoms erfolgt gemäß internationaler Stadieneinteilung (*International Neuroblastoma Staging System*) oder der neueren internationalen Neuroblastom-Risikoklassifizierung (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*, INRG). Bei letzterer erfolgt die Einteilung anhand von Patientenalter, Tumorstadium, Histologie, vorliegender *MYCN* Amplifikation, Ploidiegrad und segmentalen Chromosomenanomalien. Anhand der INRG Klassifikation wird zwischen geringem, intermediärem und hohem Risiko unterschieden. Bei geringem und intermediärem Risiko handelt es sich um lokalisierte Tumore mit günstiger Tumorgenetik durch fehlende *MYCN* Amplifikation oder 11q Aberration. Behandelt wird primär chirurgisch in Kombination mit mehreren Zyklen Chemotherapie moderater Intensität. Für die Therapie von Hochrisiko Tumoren wird ein multimodaler Therapieansatz bestehend aus intensiver Radiochemotherapie bis hin zu myeloablativer Chemotherapie mit anschließender autologen Stammzelltransplantation gewählt. Auch Retinsäure und immuntherapeutische Ansätze mit dem monoklonalen Anti-GD2 Antikörper Dinutuximab und Zytokinen gehören zum aktuellen Therapieregime. Fortschritte in der Therapie von Hochrisiko Tumoren haben zu einer Verbesserung des Langzeit-Überlebens der Patienten geführt, nichtsdestotrotz übersteigt das 5-Jahres Überleben dieser Patientenkohorte weiterhin nicht 50%.

## 2.2 Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen

Die adoptive T-Zelltherapie gehört zu den neuen innovativen Immuntherapien der Krebsforschung, bei der man sich die Effektormechanismen des Immunsystems bei Chemotherapie- und Radiatio-resistenten Tumorerkrankungen zunutze macht. Ein vielversprechender Therapieansatz sind modifizierte T-Zellen, deren chimärer Antigenrezeptor (CAR) gezielt Tumor-assoziierte Antigene erkennt und zu einer potenten Aktivierung der T-Zellen führt.<sup>3,4</sup> Ein CAR besteht neben der gewählten spezifischen Antigen-erkennenden variablen Domäne (*single chain fragment variable*, scFv) aus einer unterschiedlich langen Abstandshaltersequenz (*spacer*), gefolgt von einer aus dem T-Zell-Rezeptor stammenden aktivierenden zyttoplasmatischen CD3zeta Domäne. CARs zweiter und dritter Generation beinhalten zusätzlich zu der zyttoplasmatischen CD3zeta Signalsequenz eine beziehungsweise zwei kostimulatorische Domänen, häufig von CD28, OX40 oder 4-1BB (vormals CD137) Rezeptoren stammend (Abb. 1).



**Abbildung 1. Schematischer Aufbau des chimären Antigenrezeptors nach June et al.<sup>4</sup>** Konstrukte der 1. Generation beinhalten nur eine intrazelluläre stimulatorische Domäne, in der Regel CD3zeta. Konstrukte der 2. und 3. Generation beinhalten eine bzw. zwei weitere kostimulatorische intrazelluläre Domänen. VH: variable Region der schweren Kette; VL: variable Region der leichten Kette; scFv: *single chain fragment variable*.

Zur Generierung von CAR-T-Zellen werden Patienteneigene T-Zellen aus Aphereseprodukten genutzt und abhängig vom verfolgten Protokoll wird gegebenenfalls ein spezifisches CD8<sup>+</sup> zu CD4<sup>+</sup> T-Zell-Verhältnis des Ausgangsprodukts gewählt. Darüber hinaus wählen einige Ansätze zur CAR-T-Zellgenerierung Ausgangsprodukte, die für spezifische T-Zell-Subpopulationen angereichert sind. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die *in vivo* Proliferation und das Überleben von CAR-T-Zellen, die aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub> für *central memory T cells*) generiert wurden höher sind. Unabhängig vom Ausgangsprodukt und gewählten kostimulatorischen Domänen, erkennen CAR-T-Zellen MHC- (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) unabhängig Tumorzellen über ihre spezifisch gewählte scFv und ermöglichen somit eine spezifische gegen den Tumor gerichtete Aktivierung des Immunsystems.

### 2.3 PD-1/PD-L1-Signalweg

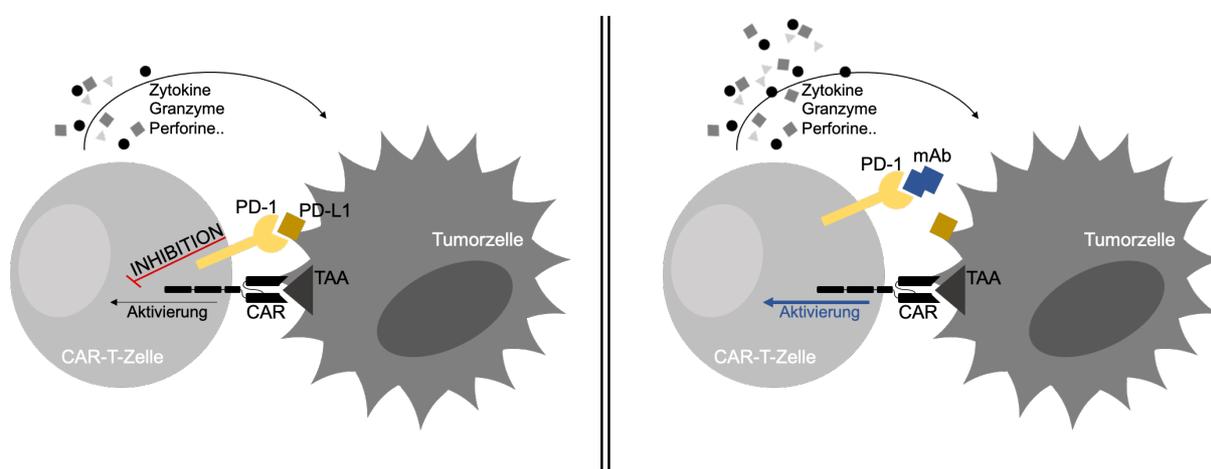
*Programmed Cell Death 1* (PD-1) ist ein koinhibitorischer Rezeptor der B7:CD28 Familie. Physiologisch ist PD-1 über seinen Liganden *Programmed Cell Death 1 Ligand 1* (PD-L1; formal bekannt als CD274) für die Balance zwischen T-Zellaktivierung und immunologischer Toleranz mitverantwortlich.<sup>5</sup> Exprimiert wird PD-1 von T- und B-Zellen sowie myeloischen Dendritischen Zellen und Monozyten. PD-L1 wird ebenfalls von aktivierten T-Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten sowie von einigen nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert, wie Lungen- und Plazentagewebe, Endothel oder Keratinozyten. Nach Bindung seines Liganden PD-L1, beeinträchtigt PD-1 die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion, durch Dephosphorylierung proximaler Signalmoleküle, und führt somit zur Abschwächung der T-Zellaktivierung. Die PD-1/PD-L1-Achse inhibiert innerhalb des immunsuppressiven Mikromilieus von soliden Tumoren Tumor-infiltrierende Lymphozyten (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) und trägt somit zur Immunevasion dieser Tumoren bei.<sup>6</sup> Für das multiple Melanom konnte gezeigt werden, dass sich die Subgruppe Tumor-reaktiver TILs durch eine hohe PD-1-Expression auszeichnet.<sup>7</sup> Es wird angenommen, dass es durch Tumor-reaktive TILs und die resultierende Zytokin-vermittelte inflammatorische Reaktion zur Induktion der PD-L1-Expression der Tumorzellen kommt. Dieser Prozess wird als adaptive Immunresistenz bezeichnet.<sup>8</sup> Um dem immunsuppressiven Mikromilieu solider Tumore etwas entgegen zu setzen, bewies sich die PD-1-*Checkpoint*-Inhibition mittels monoklonaler Antikörper

und die resultierende Unterbrechung der PD-1/PD-L1-Achse klinisch bereits bei der Therapie verschiedener solider Tumorentitäten als potenter neuer Therapieansatz.<sup>9</sup> Genexpressionmuster, die Interferon gamma (IFNG) und verwandte der T-Zellaktivierung zuzuordnende Gene beinhalten, korrelieren dabei mit dem Ansprechen auf monoklonale PD-1-oder PD-L1-Antikörper und bieten vorab die Möglichkeit deren Erfolg vorherzusagen.<sup>10</sup>

## 2.4 Zellbasierte Immuntherapien bei soliden Tumoren

Durch adoptiven T-Zell-Transfer von CD19-exprimierenden CAR-T-Zellen bei der Therapie refraktärer hämatologischer Tumorerkrankungen ließen sich bereits beachtliche Erfolge in klinischen Studien erzielen.<sup>11</sup> Dies führte im August 2018 zur Zulassung des ersten CAR-T-Zellprodukts in Europa. Vergleichbare Ergebnisse bei der CAR-T-Zelltherapie solider Tumoren konnten bis dato nicht erreicht werden.<sup>12</sup> Hürden, wie die Suche nach geeigneten Tumor-spezifischen Antigenen, Proliferation und Persistenz der CAR-T-Zellen, Lokalisation und Infiltration des soliden Tumors müssen hierfür adressiert und überwunden werden. Auch ein immunsuppressives Tumormikromilieu, charakterisiert durch hohen oxidativen Stress, Nährstoffdepletion, Hypoxie sowie durch vom Tumor sezernierte immunsuppressive Faktoren und Zytokine, bietet eine Erklärung für die Limitationen der CAR-T-Zelleffektivität bei soliden Tumoren. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression inhibitorischer Rezeptoren bei der Aktivierung von CAR-T-Zellen zu der in soliden Tumoren zu beobachtenden Hypofunktion beiträgt.<sup>13,14</sup> Zu diesen inhibitorischen Rezeptoren zählt auch PD-1, dessen Expression auf Tumor-infiltrierenden CAR-T-Zellen hochreguliert wird. Aufgrund der zudem vermehrten PD-L1-Expression von soliden Tumoren, könnte PD-1 für die beobachtete Tumor-induzierte Hypofunktion eine zentrale Rolle spielen. Diese Erkenntnisse unterstützten die Strategie einer Kombination der adoptiven Immuntherapie mittels Tumorantigen-spezifischer CAR-T-Zellen und einer Blockade der durch PD-1-Rezeptor-vermittelten T-Zell-Inhibition. Erste *in vivo* Studien bei Tumoren des Erwachsenenalters, wie dem Mesotheliom, Sarkom und Mammakarzinom, zeigen, wie sich durch die zusätzliche Gabe von PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren die Effektorfunktionen der CAR-T-Zellen wiederherstellen, die Wirksamkeit erhöhen und letztendlich eine Verbesserung des Therapieansprechens erzielen lässt (Abb. 2, Seite 13).<sup>15,16</sup> Aufgrund der immunmodulierenden Rolle des PD-1/PD-L1-Signalweges, muss bei systemischer

Gabe der monoklonalen anti-PD-1 und anti-PD-L1 Antikörper der Nachteil ernst zunehmender autoimmuner Nebenwirkungen berücksichtigt werden.<sup>9</sup> Aus diesem Grund werden alternative Methoden der PD-1-Blockade untersucht: Überzeugende Ergebnisse im Hinblick auf eine verminderte Hypofunktion der CAR-T-Zellen in soliden Tumoren konnten durch die Integration neuartiger Fusionsrezeptoren, Konstrukte bestehend aus einem extrazellulären PD-1 Anteil verbunden mit intrazellulären stimulatorischen Domänen,<sup>17,18</sup> oder durch die Generierung von PD-1 negativen CAR-T-Zellen zwecks Unterbrechung der PD-1/PD-L1-Interaktion mittels CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und *CRISPR*-assoziiertes Protein) erzielt werden.<sup>19</sup>



**Abbildung 2. PD1-Checkpoint-Inhibition vermindert Hypofunktion der CAR-T-Zellen nach Grosser sowie Miao et al.<sup>20,21</sup>** Der PD-1-Rezeptor inhibiert nach Bindung des von Tumorzellen exprimierten PD-L1 die CAR-T-Zell Aktivierung. Durch die Blockade des PD-1-Rezeptors mittels monoklonaler Antikörper kommt es zur uneingeschränkten CAR-T-Zell Aktivierung mit höherer, gegen die Tumorzellen gerichteten Zytotoxizität. TAA: Tumor-assoziiertes Antigen; mAb: monoklonaler Antikörper.

## 2.5 CAR-T-Zelltherapie bei refraktärem Neuroblastom und Rezidiv

Trotz des umfangreichen Therapieregimes, einschließlich immuntherapeutischer Ansätze, ist die Prognose für Neuroblastompatienten mit Hochrisiko-Tumoren oder Rezidiv weiterhin schlecht und die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten unabdingbar. Als weiterführender Schritt erwies sich neben der Therapie mit dem monoklonalen GD2-Antikörper, die Behandlung des Neuroblastoms mit GD2-spezifischen CAR-T-Zellen als vielversprechend. Insbesondere GD2-spezifische CAR-T-Zellen, die aus Epstein-Barr-Virus-spezifischen zytotoxischen T-Zellen generiert wurden, zeigten vor bereits 10 Jahren frühe Erfolge, durch eine verbesserte Aktivierung und

Persistenz dieser.<sup>22</sup> In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M.C. Jensen des *Seattle Children's Research Institute*, gelang es PD Dr. Künkele für das Neuroblastom einen CAR für das Tumor-selektive, glykosylierte CE7-Epitop auf L1CAM, zu entwickeln.<sup>23</sup> Dieses glykosylierte CE7-Epitop des L1CAM-Oberflächenmoleküls wird, unabhängig von der Risikogruppe des Patienten und Entnahmezeitpunkt der Tumorprobe, konstant und uneingeschränkt von Neuroblastomzellen exprimiert. Vorklinische Daten unterstützen zudem Gebrauch, Sicherheit und Durchführbarkeit einer L1CAM-CAR-T-Zelltherapie im Neuroblastom. Die Anti-Tumor-Aktivität konnte für beide, GD2- und L1CAM-CAR-T-Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden.<sup>23,24</sup> Dennoch zeigen erste Ergebnisse initiiertes klinischer CAR-T-Zell-Studien bei Patienten mit Therapie refraktärem Neuroblastom oder Rezidiv nur geringes oder vorübergehendes Ansprechen, vorwiegend aufgrund eingeschränkter CAR-T-Zell-Persistenz. Das Neuroblastom gilt grundsätzlich als immunologisch kalter Tumor, aufgrund keiner oder nur sehr geringer T-Zellinfiltration.<sup>25</sup> Der Mechanismus der adaptiven Immunresistenz mit IFNG-induzierter PD-L1-Expression der Tumorzellen konnte kürzlich auch für das Neuroblastom nachgewiesen werden.<sup>26</sup> Die Tumordinfiltration mit Neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zellen könnte ebenfalls zur PD-L1-Expression der Neuroblastomzellen führen und somit erst die Möglichkeit zur Kombinationstherapie mit zusätzlicher Unterbrechung der PD-1/PD-L1-Achse mittels monoklonaler Antikörper bieten, um Persistenz und Effektorfunktion der Neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zellen zu steigern. Bislang wurden, neben der obligatorischen CD3zeta zytoplasmatischen Domäne, für Neuroblastom-spezifische CAR-T-Zellen der zweiten Generation vier verschiedene kostimulatorische Domänen verwendet, namentlich CD28, 4-1BB, OX40 und CD27.<sup>27</sup> Es wird allgemein angenommen, dass die kostimulatorische Domäne die PD-1/PD-L1-Achse beeinflusst. Es wurden bisher jedoch widersprüchliche Auswirkungen der kostimulatorischen Domänen CD28 und 4-1BB auf die PD-1-Expression in CAR-T-Zellen in der Literatur beschrieben.<sup>28,29</sup> Diese Forschungsergebnisse erschweren den Einfluss der jeweiligen kostimulatorischen Domäne auf die PD-1-Expression der Neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zellen vorherzusagen und zusätzliche Tests sind erforderlich, um CARs zu identifizieren, die von einer PD-1-*Checkpoint*-Inhibition profitieren.

## 2.6 Zielsetzung

Unter den pädiatrisch-onkologischen Erkrankungen haben Patienten mit Therapie-refraktärem Neuroblastom oder Rezidiv weiterhin trotz intensiver Bemühungen eine vergleichsweise schlechte Prognose. Adoptive Immunzelltherapien haben sich in den letzten Jahren als viel versprechend erwiesen, jedoch ist das Ansprechen auf Neuroblastom-spezifische CAR-T-Zellen transient und die im Bereich der CAR-T-Zelltherapie bestehende Diskrepanz zwischen den klinischen Erfolgen hämatologischer und solider Tumorerkrankungen zeigt sich auch hier. Ziel dieser Forschungsarbeit ist es kombinatorische Therapieansätze mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren bei der Neuroblastom-spezifischen CAR-T-Zelltherapie zu untersuchen als eine Möglichkeit dieser Diskrepanz entgegenzutreten. Um den Einfluss der PD1-Inhibition auf die Effektivität der L1CAM-CAR-T-Zelltherapie im Neuroblastom und die Auswirkungen auf Viabilität, Aktivierung, Erschöpfung, Zytotoxizität sowie Effektorfunktion der L1CAM-CAR-T-Zellen zu evaluieren, wurden durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Zytokine, ELISA-basierte Zytokinmessungen sowie Luciferase-basierte Reporter-Gen-Assays genutzt. PD-L1 hoch-exprimierende sowie PD-L1-*knock-out* Neuroblastomzelllinien wurden mittels lentiviraler Transduktion oder CRISPR/Cas9 Technologie für die *in vitro* Untersuchungen etabliert. Konträre veröffentlichte Forschungsergebnisse erschweren es den Einfluss kostimulatorischer Domänen auf die PD-1/PD-L1-Achse bei Neuroblastom-spezifischer CAR-T-Zelltherapie vorherzusagen. Aus diesem Grund haben wir CARs entweder mit CD28- oder 4-1BB-kostimulatorischer Domäne verwendet, um deren Auswirkungen auf die PD-1/PD-L1-Achse zu untersuchen. Um den besten CAR-Kandidat für einen kombinatorischen Ansatz mit PD-1-Inhibition auszuwählen, wurde neben der Wahl der kostimulierenden Domäne zudem der Einfluss der gewählten Ausgangs-T-Zell-Subpopulation für die CAR-T-Zell-Herstellung auf die Effektivität von Neuroblastom-spezifischen-CAR-T-Zellen und die PD-1/PD-L1-Achse betrachtet.

### 3 Methodik

#### 3.1 Zelllinien und Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden entweder in DMEM oder RPMI 1640 Medium (beide Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA), jeweils zugesetzt mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), kultiviert und bei Erreichen einer 70- bis 80-prozentigen Konfluenz entsprechend dem Bedarf auf neue Petrischalen oder Zellkulturflaschen aufgeteilt (siehe Tabelle 1). Bei Kultur der EBV-transformierten lymphoblastischen Zelllinie TMLCL wurden zudem 2mM/L L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) zum Medium hinzugefügt.

**Tabelle 1. Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	ATCC Nummer	Kultiviermedium	Mediumzusätze
SK-N-BE(2)	CRL-2271	DMEM	10% FCS
SK-N-AS	CRL-2137	RPMI 1640	10% FCS
SH-SY5Y	CRL-2266	RPMI 1640	10% FCS
TMLCL		RPMI 1640	10% FCS, 2mM/L, L-Glutamin
293T	CRL-3216	DMEM	10% FCS

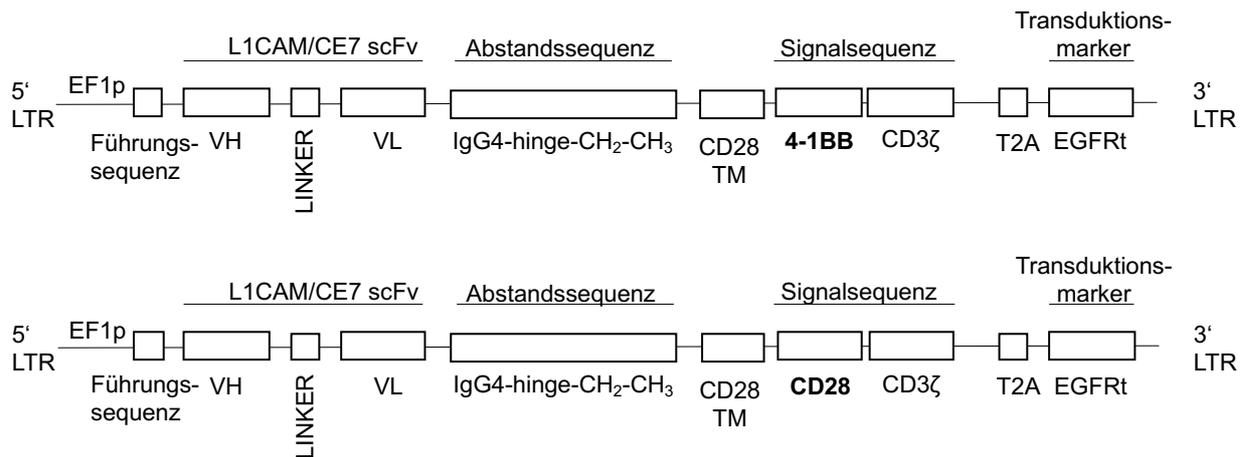
Die Neuroblastomzelllinie SK-N-BE(2) wurde lentiviral mit dem Vektor PDL1-T2A-CD19t\_epHIV7.2 transduziert. Die T2A-Peptid-Sequenz führt zur Abspaltung eines blind-endenden CD19-Moleküls (*truncated* CD19, CD19t), welches die Erfassung und Anreicherung PD-L1-transduzierter Zellen ermöglicht. Somit konnten PD-L1-exprimierende SK-N-BE(2) Zellen durch immunomagnetische CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) selektiert werden. Die Neuroblastomzelllinien SK-N-AS, SH-SY5Y sowie PD-L1-transduzierte als auch parentale SK-N-BE(2) wurden lentiviral mit dem Vektor GFP-ffLuc\_epHIV7 transduziert und GFP-exprimierende Zellen mittels Fluoreszenz aktivierter Zell-Sortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) angereichert.

### 3.2. Lentivirusproduktion

Lentiviren exprimieren eine virale Reverse Transkriptase und Integrase. Erstere katalysiert die Transkription von Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) in Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) in umgekehrter Richtung und Zweitere integriert die neu transkribierte DNA in das Genom der Wirtszelle. Virale Übertragungssysteme von Genen machen sich diese Eigenschaften von Lentiviren zu nutzen, um das genetische Material von Wirtszellen beliebig zu verändern. Die Herstellung der verwendeten Lentiviren für die Generierung neuer CAR-T- und Tumorzelllinien erfolgte gemäß bereits publiziertem Protokoll.<sup>30</sup> Sowohl die verwendeten L1CAM-spezifischen CE7-CAR Konstrukte als auch das PD-L1-T2A-CD19t und GFP-ffLuc Konstrukt wurden jeweils in den lentiviralen SIN epHIV7 Vektor kloniert. Die Transfektion der HEK293T Zellen erfolgte mittels Liposomen. Anschließend wurden die jeweiligen lentiviralen Vektoren vermehrt, isoliert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

### 3.3 L1CAM-CAR-T-Zell Herstellung und Kultur

Die L1CAM-spezifischen CE7-CARs wurden bereits in früheren Publikationen beschrieben.<sup>31</sup> Verwendet wurden für diese Arbeit nur L1CAM-CARs der 2. Generation (Abb. 3, Seite 18). Auf die Codon-optimierte CE7-L1CAM-spezifische Antigen-erkennende variable Domäne (*single chain fragment variable*, scFv) der CARs folgt eine Abstandshaltersequenz bestehend aus 229 Aminosäuren des humanen IgG4. Anschließend folgt die CD28-Transmembrandomäne, welche mit der zytoplasmatisch liegenden Signalsequenz verbunden ist. Diese besteht aus einer zytoplasmatischen CD3zeta Domäne und entweder einer 4-1BB oder CD28 kostimulatorischen Domäne. Auf die Sequenz beider CAR-Konstrukte folgt jeweils eine T2A-Peptid-Sequenz, wodurch der darauffolgende blind-endende epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*truncated epidermal growth factor receptor*, EGFRt) während der Translation vom CAR-Konstrukt abgespalten wird. Bei diesem blind-endenden EGF-Rezeptor fehlt die intrazelluläre Signalsequenz, wodurch der Rezeptor seine eigentliche Funktion verloren hat und keine Signaltransduktionswege bei Bindung aktiviert werden. Allerdings erlaubt der extrazelluläre Rezeptoranteil den indirekten CAR-T-Zell-Nachweis und deren Anreicherung über biotinyliertes Cetuximab (Bristol-Myers Squipp, New York City, NY), ein gegen den EGF-Rezeptor gerichteter klinisch erprobter Antikörper vom Typ IgG1.



**Abbildung 3. L1CAM-CAR-Konstrukte der zweiten Generation.**<sup>32</sup> Schema der L1CAM-CAR-Konstrukte 2. Generation mit 4-1BB oder CD28 kostimulatorischer Domäne. LTR: Long *Terminal Repeats*; scFv: *single chain fragment variable*; VH: variable Region der schweren Kette; VL: variable Region der leichten Kette; TM: Transmembran; EGFRt: *truncated epidermal growth factor receptor*.

CAR-T-Zellen wurden aus Aphereseprodukten gesunder Probanden generiert (Genehmigung des Charité Ethikkomitees EA2/216/18). Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL) wurde verwendet um mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) zu isolieren. Mit Hilfe von immunomagnetischen MicroBeads (Miltenyi Biotec) wurden CD8- und CD4-positive T-Zellen isoliert. Für T-Zell-Sets mit T<sub>CM</sub>-Ursprung wurden die T-Zellen in einem zweiten Schritt CD45RA depletiert und positive selektiert für CD62L, ebenfalls mittels immunomagnetischen MicroBeads (Miltenyi Biotec). Vor Transduktion wurden die jeweiligen T-Zell-Sets an Tag 0 mit anti-CD3/CD28-Beads bei einem *Bead*-zu-T-Zell-Verhältnis von 1:1 kultiviert und dadurch aktiviert. Anschließend wurden die T-Zellen an Tag 3 mit den entsprechenden Lentiviren transduziert. Erfolgreich transduzierte CAR-T-Zellen exprimieren EGFRt. Somit erfolgte die Anreicherung an Tag 14-20 durch immunomagnetische Selektion mittels Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec) nach Inkubation der T-Zellen mit biotinyliertem Cetuximab (Bristol-Myers Squibb). Bei jedem CAR-T-Zell-Set wurde ein Teil der T-Zellen desselben Donors nicht transduziert, aber gleichermaßen kultiviert, um in den Experimenten als Kontrolle eingesetzt werden zu können. CAR- und Kontroll-T-Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung und Expansion kryokonserviert. Zur Expansion wurden kryokonservierte CAR- und Kontroll-T-Zellen aufgetaut und zur Stimulation mit bestrahlten PBMCs sowie bestrahlten TMLCL-Zellen und 30 ng/mL CD3-Antikörper (OKT 3 Klon, Miltenyi Biotec) kultiviert. Aufgrund der limitierten Lebenszeit dieser sogenannten *Feeder*-Zellen durch

die Bestrahlung, erhält man eine reine CAR- oder Kontroll-T-Zell Kultur am Ende der Expansion. Dem verwendeten RPMI 1640 Medium wurden 10% Hitze-inaktiviertes FCS sowie 2mM/L L-Glutamin zugegeben. Außerdem erfolgte eine regelmäßige Zugabe von 0,5 ng/mL Interleukin-15 (IL-15; Miltenyi Biotec) und für CD8<sup>+</sup>-positive CAR-T-Zell-Sets zusätzlich 50U/mL Interleukin-2 (IL-2; Novartis, Basel, Schweiz) sowie für CD4<sup>+</sup>-positive CAR-T-Zell-Sets zusätzlich 5ng/mL Interleukin-7 (IL-7; Miltenyi Biotec) entsprechend einem bereits publiziertem Protokoll<sup>33</sup> zur schnellen Expansion. Die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen erfolgten zwischen Tag 11-15 der Expansion beziehungsweise zwischen Tag 11-25 für den Stresstest.

### 3.4 CRISPR/Cas9-basierte Herstellung von PD-L1 *knock-out* Neuroblastomzellen

Die sich rapide entwickelnde CRISPR/ Cas9-basierte Technologie zur Genom-Editierung beruht auf dem adaptiven antiviralen Immunsystem von Bakterien und ermöglicht eine zielgenaue Zerstörung ausgesuchter Gene (*knock-out*, KO).<sup>34</sup> Die Endonuklease Cas9 erkennt und bindet eine spezifische CRISPR-RNA-Sequenz (crRNA). Diese ist Teil der sogenannten Leit-RNA (*guide RNA*, gRNA), welche zudem die wählbare und an der Ziel-DNA bindende crRNA-*spacer*-Sequenz enthält. Beinhaltet die Ziel-DNA das zusätzlich notwendige Protospacer angrenzende Motiv (PAM) kommt es nach Bindung der gRNA zur Aktivierung der Endonuklease Cas9 und beide Stränge der Ziel-DNA werden 3 Nukleotide vor dem PAM geschnitten. Bei der DNA-Reparatur kommt es durch nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*) zu Insertion und Deletion von Basen, was wiederum durch eine Verschiebung des Leserasters zur Funktionsverlustmutation (*Loss-of-function mutation*) führt. In dieser Arbeit verwendete gRNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von Dr. Feng Zhang's online CRISPR Design-Instruments ([http://www.genome-engineering.org/crispr/?page\\_id=41](http://www.genome-engineering.org/crispr/?page_id=41)) entworfen.<sup>35</sup> Um einen globalen *knock-out* von PD-L1 in der Neuroblastomzelllinie SK-N-BE(2) zu erreichen, wurden gRNA-Sequenzen ausgewählt, die auf Exon 2 und 3 gerichtet sind, und miteinander verglichen.

Verwendet wurden die zwei folgenden gRNA-Sequenzen:

**TCTTTATATTCATGACCTAC (PD-L1-gRNA1)**

**TACCGCTGCATGATCAGCTA (PD-L1-gRNA2)**

Die ausgewählten Oligonukleotidsequenzen der entsprechenden gRNAs wurden anniliert und in den BbsI-verdauten CRISPR Vektor, pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (eine Spende von Feng Zhang an Addgene nonprofit plasmid repository, Watertown, MA) eingebunden. Mittels Sequenzierung wurden die generierten gRNA-tragenden Vektoren überprüft. Für die Transfektion der Neuroblastomzelllinie SK-N-BE(2) wurde das auf dem Prinzip der Lipofektion beruhenden Effectene Transfektions-Kit (cat #301425, Qiagen, Venlo, Netherlands) den Angaben des Herstellers folgend verwendet. Sowohl  $5 \times 10^5$  parentale als auch GFP-ffLuc\_epHIV7-transduzierte SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen wurden dabei 24 Stunden vor geplanter Transfektion auf einer 6-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des zuvor angesetzten Transfektionsreagens, bestehend aus 100µL Effectene Puffer, 2µL Enhancer, 1µg der jeweiligen Plasmid DNA sowie 7,5µL Effectene im Rahmen eines Mediumwechsels. Nach weiteren Medienwechseln innerhalb der nächsten Woche wurde anschließend 100 ng/mL rekombinantes Interferon gamma (IFNG; PeproTech, Rocky Hill, NJ) hinzugefügt und die Neuroblastomzellen über 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden die SK-N-BE(2) Zellen mit und ohne erfolgreichem PD-L1-KO mit einem APC-konjugiertem monoklonalen PD-L1-Antikörper (cat #329708, BioLegend, San Diego; CA) angefärbt. In einem zweiten Schritt wurden PD-L1-KO SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen durch immunomagnetische Depletion mittels APC MicroBeads (Miltenyi Biotec) angereichert.

### 3.5 Behandlung mit monoklonalem PD-1-Antikörper

Bei allen *in vitro* Assays erfolgte eine Intervention in Form einer PD-1-*Checkpoint*-Inhibition. Hierfür wurden 40µg/mL des klinisch erprobten und therapeutisch eingesetzten monoklonalen IgG-Typ PD-1-Antikörpers Nivolumab (Bristol-Myers Squibb) bei den jeweiligen Versuchsansätzen dem Medium zugefügt. Trägerlösung von Nivolumab ist 0,9%ige Natriumchloridlösung (NaCl), weshalb dem Medium der Kontrollgruppe dasselbe Volumen 0,9% NaCl hinzugegeben wurde.

### 3.6 Zytotoxizitätsassay

Um als Zielzellen des Luciferase-basierten Reporter-gen-Assays fungieren zu können, wurden die SH-SY5Y, SK-N-AS und parentale, PD-L1-transduzierte sowie PD-L1-KO SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen stabil lentiviral mit dem Vektor GFP-ffLuc\_epHIV7 transduziert. Die *Firefly*-Luciferase (FLuc) ist ein Enzym, das durch Oxidation des

hinzugegebenem D-Luciferins (PerkinElmer Inc, Waltham, MA) eine biolumineszente Reaktion katalysiert, welche mittels Luminometer messbar und quantifizierbar ist. Für diese Reaktion wird Adenosontriphosphat (ATP) benötigt, somit korreliert die gemessene Lichtemission mit der Anzahl lebender GFP-ffLuc\_epHIV7 transduzierter Zielzellen.



Somit kann die zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen bei Ko-Kultur mit Neuroblastomzellen quantifiziert werden durch die abnehmende Lichtemission, aufgrund der Reduktion lebender Zieltumorzellen mit funktionsfähiger integrierter Firefly-Luciferase. Konkret wurden Zielzellen in Triplikaten mit Kontroll- oder CAR-T-Zellen bei einem 1:2 oder 1:5 Effektor-zu-Zielzell (E:Z)-Verhältnis ko-kultiviert beziehungsweise in einem 1:1 E:Z-Verhältnis im Rahmen des Stresstest. Dem Medium der Interventionsgruppe, wurde Nivolumab und dem der Kontrollgruppe 0,9%iges NaCl zugesetzt. Nach 24, 48 oder 72 Std. wurde 0,14mg/mL D-Luciferin zu den einzelnen Wells dazugegeben und die Lumineszenz mittels Luminometer erfasst. Für jeden Assay wurde die detektierte Lumineszenz einer Ko-Kultur aus Zieltumorzellen und Kontroll-T-Zellen in den entsprechenden oben genannten Verhältnissen als maximale Lichtemission definiert (*maximal relative light unit*, RLU<sub>max</sub>). Die CAR-T-Zell-vermittelte Tumorlyse entsprach  $(1 - (RLU_{\text{sample}}/RLU_{\text{max}})) \times 100$  in Relation zu Kontroll-T-Zellen.

### 3.7 Stresstest

Ein Stresstest wurde anlehnend an bereits publizierten Untersuchungsaufbauten etabliert,<sup>31,36</sup> um eine mehrfache Antigen-induzierte Aktivierung von CAR-T-Zellen durch wiederholte Zugabe zusätzlicher Tumorzellen nachzuahmen. Konkret wurden SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen in einem 1:2 E:Z-Verhältnis mit entsprechenden L1CAM-CAR-T-Zellen kultiviert. Ab Tag 1 wurde entweder Nivolumab oder als Kontrolle 0,9% NaCl-Lösung dem Medium hinzugefügt. An Tag 4, 8 und 12 wurden die L1CAM-CAR-T-Zellen gesammelt und mittels Hämozytometer und Trypanblau gezählt. Anschließend wurden die L1CAM-CAR-T-Zellen erneut in einem 1:2 E:Z-Verhältnis mit neuen Tumorzellen kultiviert. Dem Medium der Interventionsgruppe wurde weiterhin Nivolumab, der Kontrollgruppe 0,9% NaCl-Lösung hinzugefügt. An Tag 5, 9 und 12, jeweils 24 Std. nach der letzten erneuten Konfrontation mit neuen Neuroblastomzellen, erfolgten Zytotoxizitätsassays und durchflusszytometrische Untersuchungen von Oberflächenmarkern und Zytokinen.

### 3.8 ELISA-basierte Messung der Zytokinproduktion

Um die IFNG-Freisetzung nach Antigen induzierter CAR-T-Zellaktivierung bei Ko-Kultur mit Neuroblastomzellen und hinzugefügtem Nivolumab oder 0,9% NaCl-Lösung zu messen, wurde das OptEIA Enzym-gebundene Immunosorbent-Assay (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) den Angaben des Herstellers folgend verwendet. Konkret wurden  $2 \times 10^5$  CAR- oder Kontroll-T-Zellen in einem 2:1 E:Z-Verhältnis mit SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen kultiviert. Nach 24 Std. wurde das konditionierte Medium gesammelt und bis zur Durchführung des ELISAs bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.9 Durchflusszytometrie

Die Expression von Oberflächenmolekülen wurde durchflusszytometrisch durch Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper mit dem Fortessa X-20 (BD Bioscience) erfasst. In dieser Arbeit verwendete Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper sind in Tabelle 2 auf Seite 23 aufgelistet. Darüber hinaus wurde die intrazelluläre Zytokinexpression nach T-Zellaktivierung ebenfalls durchflusszytometrisch erfasst, nach Verwendung des Fixation/Permeabilization Solution Kits und GolgiStop™ Set (beide BD Bioscience). Des Weiteren wurde das Annexin V/7AAD Kit (BioLegend) zur durchflusszytometrischen Erfassung der Apoptose verwendet. Mittels QuantiBRITE Kalibrations-*Beads* (BD Bioscience) wurde die L1CAM-Antigendichte auf verschiedenen Neuroblastomzelllinien, den Angaben des Herstellers folgend, ermittelt. Alle durchflusszytometrisch erfassten Daten wurden mit der FlowJo Software (Tree Star Inc, Ashland, OR) ausgewertet.

### 3.10 Statistische Analyse

Der gepaarte oder ungepaarte Student *t*-Test wurde für die statistische Auswertung von Unterschieden in der zytotoxischen Aktivität, Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinexpression sowie Zytokinfreisetzung zwischen Intervention- und Kontrollgruppe verwendet. Hierfür wurde GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) genutzt und *p*-Werte  $< 0,05$  als signifikant betrachtet.

Tabelle 2. Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper

Fluorophor-konjugierter monoklonaler Antikörper	Hersteller	Katalognummer
CD8A	BioLegend	#301041
CD4	BioLegend	#300545
L1CAM (vormals CD171)	Miltenyi Biotec	#130-100-691
PD-1 (formal PDCD1)	BioLegend	#329922
PD-L1 (formal CD274)	BioLegend	#329708
PTPRC Isotop CD45RO	BD Bioscience	#562641
PTPRC Isotop CD45RA	BioLegend	#304105
SELL (vormals CD62L)	BioLegend	#304821
FAS	BioLegend	#305611
Streptavidin	BioLegend	#12-4317-87
IFNG	BioLegend	#502531
TNFSF2 (vormals TNF- $\alpha$ )	BioLegend	#502913
IL2	BioLegend	#500325
Granzym B	BioLegend	#515403

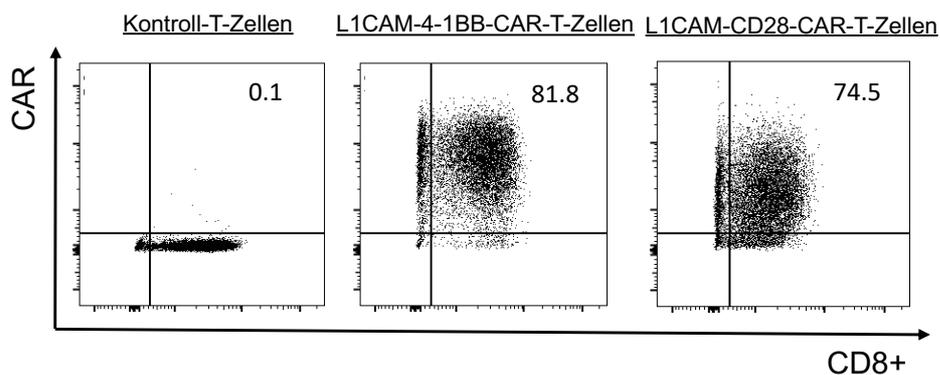
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse bei Ko-Kultur von L1CAM-CAR-T mit Neuroblastomzellen

Hochrisiko-Neuroblastome werden aufgrund der geringen Leukozyteninfiltration als immunologisch kalte Tumore bezeichnet und entsprechend spielt die PD-1/PD-L1-Achse bei diesen in der Regel keine Rolle. Bei Infiltration tumorspezifischer T-Zellen kommt es durch die adaptive Immunresistenz der meisten Tumorzellen zur IFNG vermittelten Induktion der PD-1/PD-L1-Oberflächenexpression<sup>8</sup>, weshalb wir die Hypothese aufstellten, dass die PD-1/PD-L1-Achse auch nach Konfrontation mit CAR-T-Zellen aktiviert wird. Die PD-1/PD-L1-Achse könnte somit als Teil des immunsuppressiven Mikromilieus die Wirksamkeit der CAR-T-Zellen im Neuroblastom beeinträchtigen. Gleichzeitig bietet sie einen Angriffspunkt, um die CAR-T-Zelltherapie beim Neuroblastom zu verbessern. Um die Möglichkeit einer Kombination von CAR-T-Zelltherapie mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibition zur Behandlung von Neuroblastomen festzuhalten, testeten wir somit zunächst, ob die *in vitro* Ko-Kultur Neuroblastom-spezifischer L1CAM-CAR-T-Zellen die PD-1/PD-L1-Achse in Neuroblastom und CAR-T-Zellen aktiviert. Dafür wurden drei Neuroblastomzelllinien ausgewählt mit mittlerer oder

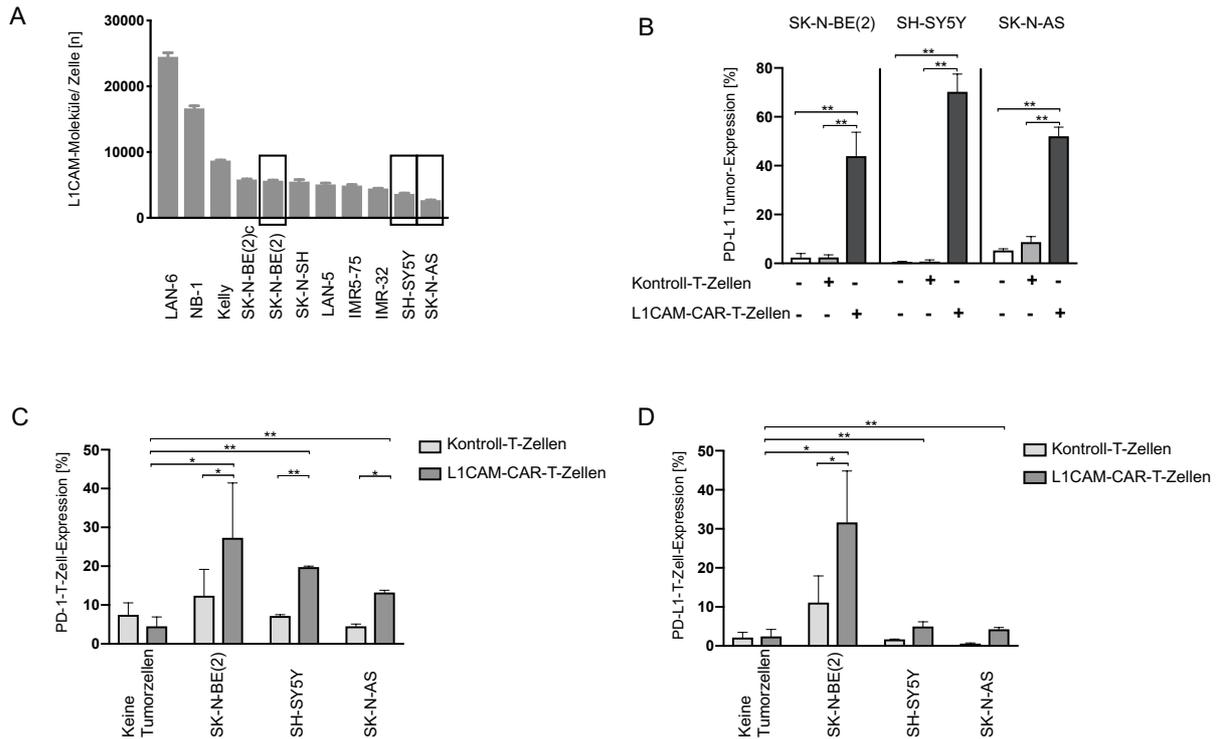
niedriger Oberflächendichte des L1CAM-Tumorantigens mit dem Hintergrund, dass diese Tumorzellen für die CAR-T-Zellen eine größere Herausforderung bieten können und somit sich die Effektivität von Kombinationstherapien folglich besser evaluieren lässt. Die L1CAM-Oberflächenexpressionsdichte wurde mittels QuantiBRITE-Quantifizierung erhoben. Die SK-N-BE(2)-Zelllinie exprimierte mediane L1CAM-Spiegel und die SH-SY5Y- und SK-N-AS-Zelllinien niedrige Antigenspiegel (Abb. 4A, Seite 25).<sup>32</sup>

Wir generierten L1CAM-spezifische CAR-T-Zellen der zweiten Generation aus für die T<sub>CM</sub>-Subpopulation angereicherten CD8<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>-Zellen. Mittels blind-endenden epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*truncated epidermal growth factor receptor*, EGFRt), der während der Translation vom CAR-Konstrukt abgespalten wird, konnte durch die immunmagnetische Selektion auf EGFRt eine vergleichbare CAR-Expression sichergestellt werden (Abb. 5).<sup>32</sup>



**Abbildung 5. Transduktionseffizienz.**<sup>32</sup> „Nach der Anreicherung wurden CAR-positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Fluorochrom-konjugiertem Cetuximab durchflusszytometrisch erfasst. Nicht transduzierte T-Zellen dienen als Negativkontrolle [Kontroll-T-Zellen] (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

Die PD-L1-Expression wurde in allen drei Zelllinien nach einer Ko-Kultur mit L1CAM-CAR-T-Zellen signifikant induziert aber nicht nach Ko-Kultur mit Kontroll-T-Zellen (Abb. 4B, Seite 25). Gleichzeitig nahm auch die PD-1-Expression der L1CAM-CAR-T-Zellen zu und wurde am stärksten durch Ko-Kultur mit SK-N-BE(2)-Zellen induziert (Abb. 4C, Seite 25). Diese Erhöhung des PD-1-Rezeptors nach Ko-Kultur mit allen drei Neuroblastom-Zelllinien ging interessanterweise auch mit einer erhöhten PD-L1-Expression der L1CAM-CAR-T-Zellen einher (Abb. 4D, Seite 25). Die PD-1-vermittelte Hemmung tumorinfiltrierender CAR-T-Zellen könnte somit nicht nur durch Tumorzellen, sondern möglicherweise auch durch PD-L1-exprimierende CAR-T-Zellen verursacht werden.



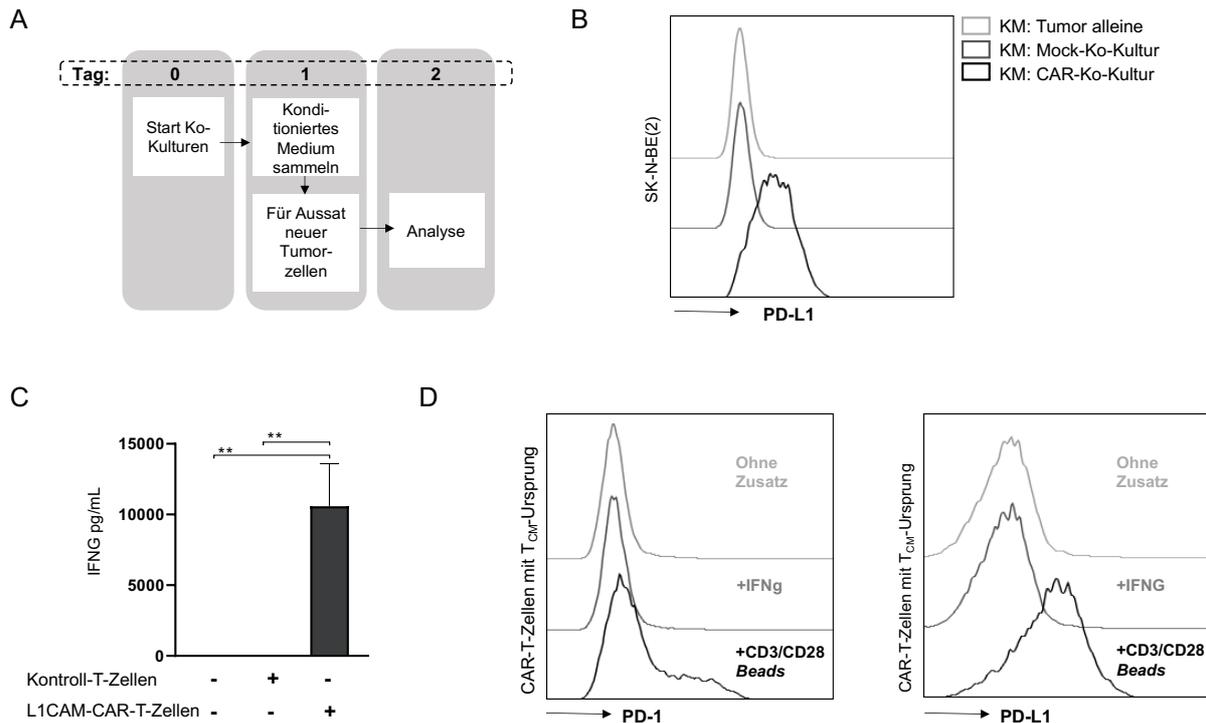
**Abbildung 4. L1CAM-CAR-T-Zell-Konfrontation aktiviert die PD-1/PD-L1-Achse in Neuroblastomzellen.**<sup>32</sup> „A. Durchflusszytometrisch erfasste L1CAM Zelloberflächendichte von Neuroblastomzelllinien. Ausgewählte Zelllinien sind eingerahmt. B. PD-L1-Oberflächenexpression von SK-N-BE(2)-, SH-SY5Y- und SK-N-AS-Neuroblastomzellen allein und nach Ko-Kultur mit entweder Kontroll- oder L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen bei einem Effektor:Zielzell (E:Z)-Verhältnis von 1:5 über 24 Std. PD-1 (C) und PD-L1 Expression (D) von Kontroll- und L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung vor und nach der Ko-Kultur mit SK-N-BE(2) und SK-N-AS bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 bzw. SH-SY5Y Neuroblastomzellen bei einem E:Z-Verhältnis von 1:5 über 24 Std. Die dargestellten Daten zeigen die mittlere Expression aus 3 unabhängigen Experimenten, \*P < 0,05 und \*\*P < 0,01 bei ungepaartem (Kontroll-T-Zellen im Vergleich zu CAR-T-Zellen) oder gepaartem (Kontroll-, CAR-T oder Tumorzellen je allein im Vergleich zu deren Ko-Kultur) Student's t-Test“ (Übersetzt durch die Autorin).<sup>32</sup>

Somit konnten wir zeigen, dass das Zusammentreffen von Neuroblastom- und L1CAM-CAR-T-Zellen die PD-1/PD-L1-Achse aktiviert und darüber hinaus PD-L1 in den CAR-T-Zellen selbst hochreguliert. Beides unterstützt unsere Annahme, dass eine Kombination von CAR-T-Zelltherapie mit PD-1-Checkpoint-Inhibition bei der Behandlung von Neuroblastomen prinzipiell möglich wäre.

## 4.2 Mechanismen der PD-1/PD-L1-Induktion unterscheiden sich zwischen Neuroblastom- und L1CAM-CAR-T-Zellen

Den Erkenntnissen zur adaptiven Immunresistenz von TILs bei soliden Tumoren entsprechend, hatten wir die Hypothese, dass die PD-L1-Induktion in den verwendeten Neuroblastomzellen ebenfalls durch Zytokine wie IFNG gesteuert wird, die von aktivierten

L1CAM-CAR-T-Zellen nach Tumorantigenbindung und T-Zellaktivierung freigesetzt werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde konditioniertes Medium von alleine kultivierten Neuroblastomzellen sowie von Neuroblastomzellen, die mit L1CAM-CAR- oder Kontroll-T-Zellen für 24 Stunden kultiviert wurden, gesammelt. Anschließend wurden diese konditionierten Medien jeweils für die Ausplattierung frischer Neuroblastomzellen verwendet (Abb. 6A).



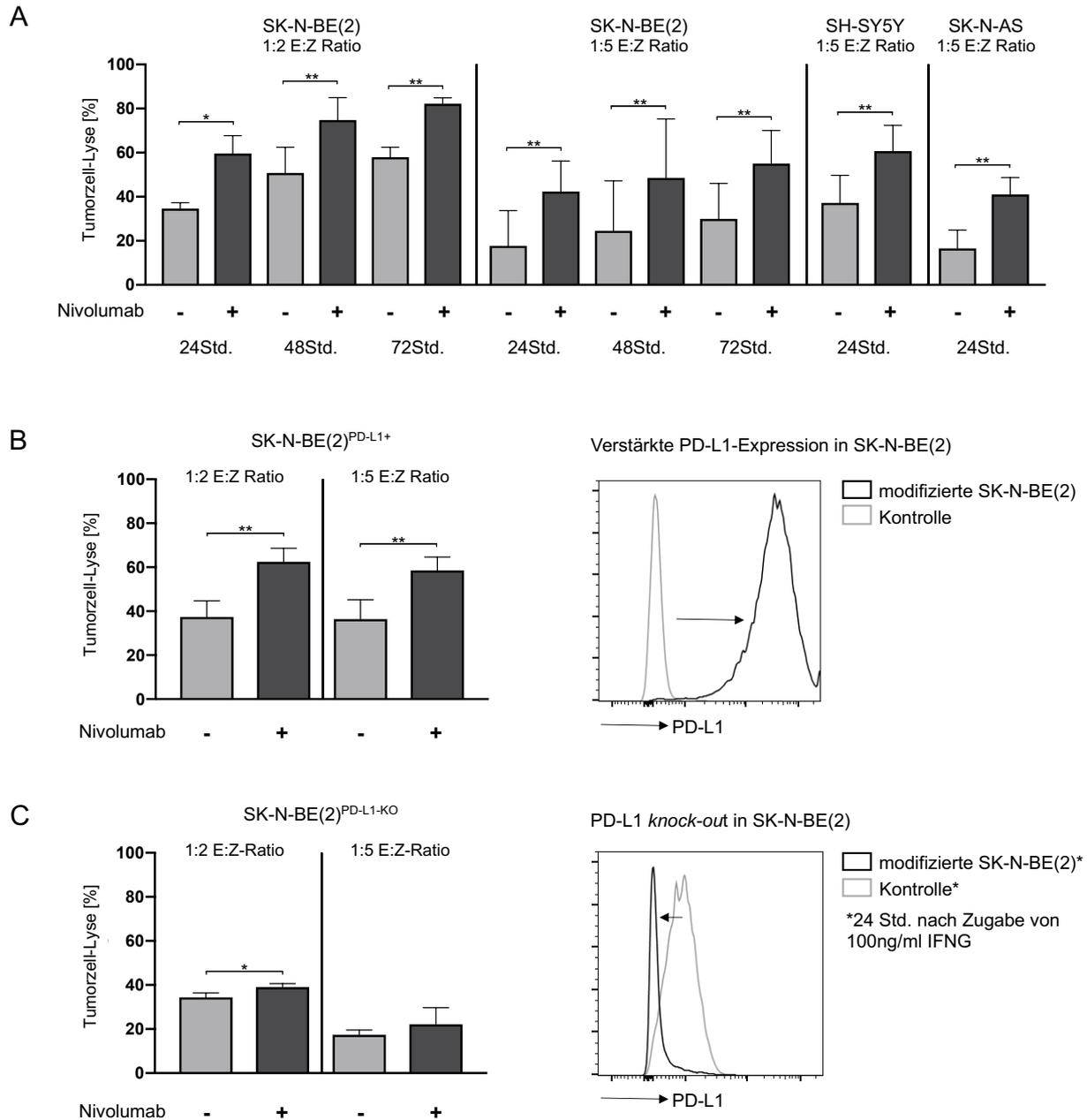
**Abbildung 6. Mechanismen der PD-1/PD-L1-Induktion in CAR-T- und Neuroblastomzellen.**<sup>32</sup> „A. Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau mit konditionierten Medien (KM). Das Medium wurde konditioniert, indem SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen allein oder entweder mit L1CAM-CAR oder Kontroll-T-Zellen im E:Z-Verhältnis 1:5 über 24 Std. kultiviert wurden. B. PD-L1-Expression auf SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen, die durch Durchflusszytometrie nach 24-stündiger Inkubation mit KM ermittelt wurden. C. IFNG-Spiegel, die mittels ELISA nach Kultivierung von SK-N-BE(2) Neuroblastomzellen allein oder entweder mit L1CAM-CAR- oder Kontroll-T-Zellen in einem E:Z-Verhältnis von 2:1 über 24 Std. bestimmt wurden. D. [PD-1- und] PD-L1-Expression auf L1CAM-CAR-T-Zellen, durchflusszytometrisch erfasst 24 Std. nach Zugabe von 1ng/ml IFNG- oder CD3/CD28-Beads bei einem *Bead*-zu-T-Zell-Verhältnis von 1:1 im Vergleich zu unbehandelten L1CAM-CAR-T-Zellen“ (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

Die PD-L1-Expression wurde nur durch 24-stündige Kultur in dem Medium induziert, das durch Ko-Kultur von L1CAM-CAR-T- mit Neuroblastomzellen konditioniert war (Abb. 6B).<sup>32</sup> Die konditionierten Medien wurden darüber hinaus mittels ELISA untersucht und nur in dem durch Neuroblastom-/ L1CAM-CAR T-Zell-Ko-Kultur konditioniertem Medium konnte eine erhöhte IFNG-Konzentration gemessen werden (Abb. 6C, Seite 26). Gemeinsam betrachtet unterstreichen beide Ergebnisse, dass lösliche Faktoren wie

IFNG und nicht Zell-Zell-Interaktionen die PD-L1-Hochregulierung in Neuroblastomzellen induzieren. Als nächstes untersuchten wir, ob dies auch für die Induktion der PD-1 und PD-L1-Expression in L1CAM-CAR T-Zellen gilt, indem wir entweder IFNG oder Anti-CD3/CD28-*Beads* den L1CAM-CAR-T-Zellen hinzugefügt haben. Interessanterweise induzierten nur CD3/CD28-*Beads*, nicht aber IFNG die PD-1 und PD-L1-Expression in L1CAM-CAR-T-Zellen (Abb. 6D, Seite 26).<sup>32</sup> Wir konnten zwar zeigen, dass die PD-L1-Expression in Neuroblastomzellen durch das lösliche Zytokin IFNG induziert wird. Dies gilt allerdings nicht für L1CAM-CAR-T-Zellen und somit unterschieden sich die Mechanismen, die zur Hochregulation von PD-1 und PD-L1 führen zwischen CAR-T- und Tumorzellen.

#### 4.3 PD-1 Inhibition erhöht L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität unabhängig von der PD-L1 Expressionshöhe

In Mausmodellen für verschiedene solide Tumore erwies sich die antikörperbasierte Blockade von PD-1 nachweislich als potenter Therapieansatz zur Erhöhung der Effektivität von CAR-T-Zellen.<sup>14,15</sup> Wir konnten zeigen, dass die PD-1/PD-L1-Achse durch Ko-Kultur von L1CAM-CAR-T- und Neuroblastomzellen induziert wird.<sup>32</sup> Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen PD-1 (Nivolumab) die Zytotoxizität von L1CAM-CAR-T-Zellen *in vitro* erhöht. Dafür wurden die Zelllinien SK-N-BE(2), SH-SY5Y und SK-N-AS mit einem GFP-*firefly*-Luciferase-Reporterplasmid transduziert, um vitale Tumorzellen im Luciferase-basierten Reporter-Gen-Assay zu quantifizieren. L1CAM-CAR-T-Zellen wurden mit SK-N-BE(2)-Reporterzellen in einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:2 und 1:5 mit oder ohne Nivolumab ko-kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur wurde durch Messung des von den verbleibenden vitalen Tumorzellen freigesetzten biophotonischen Signals die Zytotoxizität der L1CAM-CAR-T-Zellen bestimmt. Nivolumab erhöhte signifikant den Anteil durch L1CAM-CAR-T-Zellen eliminiertes SK-N-BE(2)-Zellen in beiden Effektor:Zielzell-Verhältnissen und zu allen drei Zeitpunkten (Abb. 7A, Seite 28).<sup>32</sup> Im Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:5 wurde die CAR-T-Zellzytotoxizität durch Nivolumab jedoch stärker erhöht, was einen zunehmenden Nutzen der PD-1-*Checkpoint*-Inhibition bei erhöhter Belastung der L1CAM-CAR-T-Zellen zeigte. Nivolumab erhöhte auch signifikant die L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität von SH-SY5Y- und SK-N-AS-Zellen, die niedrige Tumorantigenspiegel exprimieren.



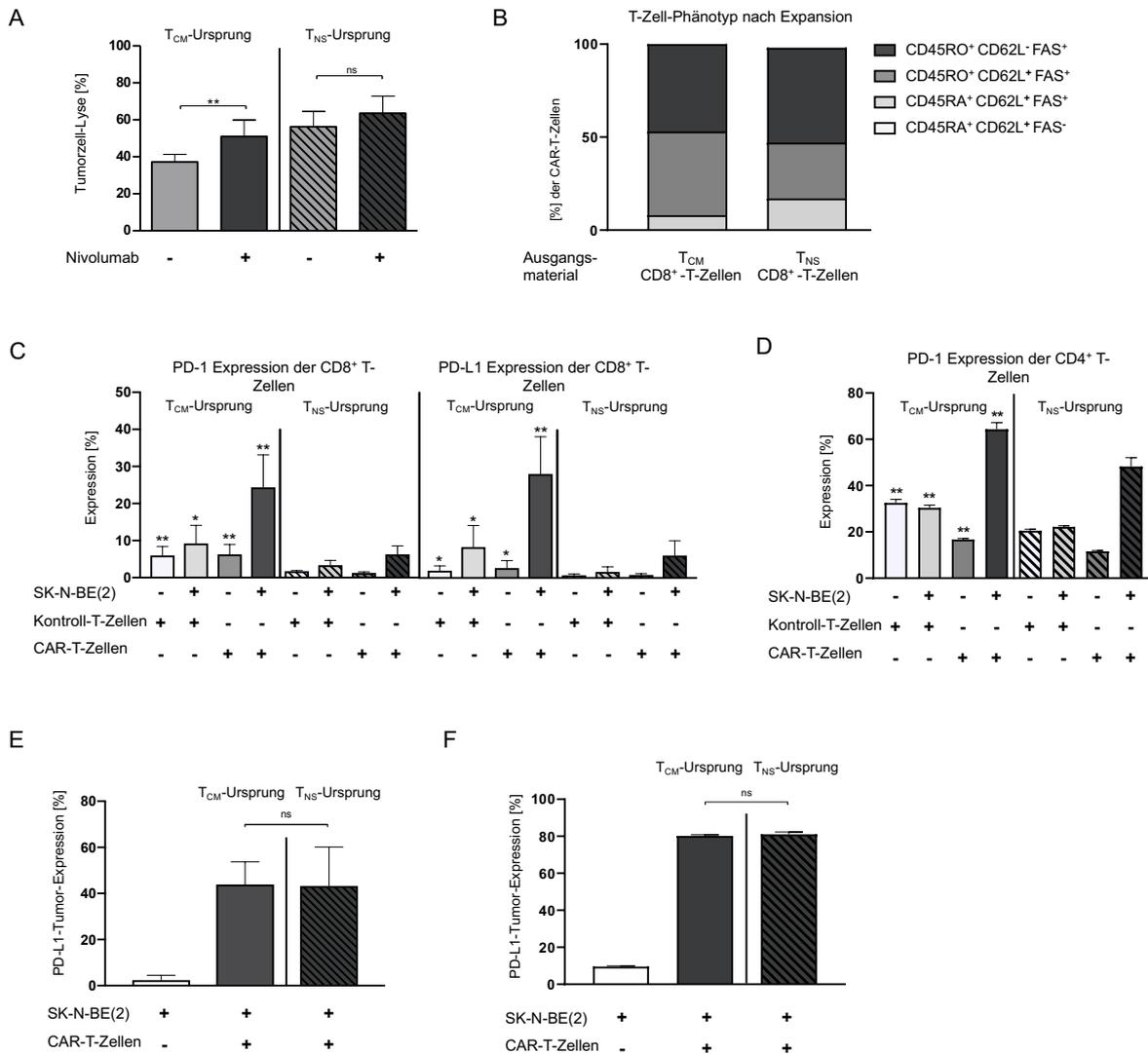
**Abbildung 7. Erhöhte L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität durch PD-1-Checkpoint-Inhibition.**<sup>32</sup> „A. Die Zytotoxizität von L1CAM-CAR-T-Zellen wurde durch einen Luciferase-basierten Reportgen-Assay nach Tumor-Ko-Kultur über 24, 48 und 72 Std. bei verschiedenen E:Z-Verhältnissen und Zugabe von Nivolumab (oder NaCl als Kontrolle) bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen die mittlere Zellyse von 3 unabhängigen Experimenten, wobei zuvor der Median der Triplikate jedes Experiments ermittelt wurde. \*P < 0,05 und \*\*P < 0,01 durch einen zweiseitigen gepaarten *t*-Test. B. CAR-T-Zell-induzierte Tumorzellyse der SK-N-BE(2)<sup>PD-L1+</sup> nach 24 Std. bei verschiedenen E:Z-Verhältnissen +/- Nivolumab und durchflusszytometrische Quantifizierung der PD-L1-Expression auf PD-L1-transduzierten SK-N-BE(2). C. CAR-T-Zell-induzierte Tumorzellyse der SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup> nach 24 Std. bei verschiedenen E:Z-Verhältnissen +/- Nivolumab und durchflusszytometrische Quantifizierung der PD-L1-Expression auf PD-L1-knock-out SK-N-BE(2) 24Std. nach Zugabe von 100ng/ml IFNG im Vergleich zu parentalen SK-N-BE(2)<sup>+</sup> (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

Um zu testen, ob hohe PD-L1-Spiegel das Ausmaß des Nivolumabnutzens für die Zytotoxizität ebenfalls erhöhen, etablierten wir PD-L1 hoch-exprimierende Neuroblastomzellen. Für unser SK-N-BE(2)<sup>PD-L1+</sup> Neuroblastomzellmodell wurden SK-N-BE(2)-Zellen lentiviral mit PD-L1 transduziert (Abb. 7B, Seite 28).<sup>32</sup> Nivolumab erhöhte signifikant die L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität gegen PD-L1-transduzierte SK-N-BE(2)-Zellen in einem 1:2 und 1:5 Effektor:Zielzell-Verhältnis nach 24 Stunden. Die Zytotoxizität der L1CAM-CAR-T-Zellen war jedoch bei Ko-Kultur mit SK-N-BE(2)-Zellen mit oder ohne erhöhter PD-L1-Expression in Gegenwart von Nivolumab ähnlich. Dies spricht dagegen, dass L1CAM-CAR-T-Zellen stärker von einer PD-1-Blockade profitieren bei Ko-Kultur mit PD-L1 hoch-exprimierenden Tumorzellen. Mittels CRISPR/Cas9 wurde der PD-L1 Genlocus permanent zerstört und somit ein SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup>-Modell etabliert.<sup>32</sup> Nach 24-stündiger IFNG-Stimulation lag die PD-L1-Expression in SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup> unter 8% (Abb. 7C, Seite 28). Nichtsdestotrotz erhöhte Nivolumab die L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität bei Ko-Kultur mit SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup> im 1:2 aber nicht 1:5 Effektor:Zielzell-Verhältnis nach 24 Stunden. Die Erkenntnisse des SK-N-BE(2)<sup>PD-L1-KO</sup>-Modells deutet darauf hin, dass der Nutzen der PD-1-Blockade trotz geringer PD-L1-Tumorexpression bestehen blieb. Wir konnten zeigen, dass das Ausmaß des Nutzens der PD-1-*Checkpoint*-Inhibition für die zytotoxische L1CAM-CAR-T-Zelleffektivität *in vitro* nicht streng mit der Höhe der PD-L1-Expression der Neuroblastomzellen korreliert, da bei erhöhter PD-L1-Expression ein *Ceiling*-Effekt beobachtet werden kann. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PD-1-vermittelte Hemmung und ihre Blockade mittels monoklonaler Antikörper in erster Linie von der Höhe der PD-1-Expression der CAR-T-Zellen abhängt.

#### 4.4 Einfluss des CAR-T-Zell Ausgangsmaterials auf die PD-1/PD-L1-Achse

Aufgrund der längeren Persistenz von CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung *in vivo*,<sup>37,38</sup> werden zentrale Gedächtnis-T-Zellen als Ausgangspopulation zur CAR-T-Zellgenerierung präferiert. Im Fall von refraktären oder rezidivierenden Krebserkrankungen ist man jedoch oft mit unzureichendem Ausgangsmaterial für die Generierung von CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung konfrontiert. Daher verwenden die meisten laufenden CAR-T-Zell-Studien nicht weiter selektierte T-Zellen (T<sub>NS</sub>) als Ausgangsmaterial. In den bisherigen Experimenten dieser Arbeit wurden L1CAM-CAR-T-Zellen aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen hergestellt. Um den positiven Nutzen einer PD-1-Blockade auf die Effektivität der L1CAM-CAR-T-Zellen mit T<sub>NS</sub>-Ursprung zu

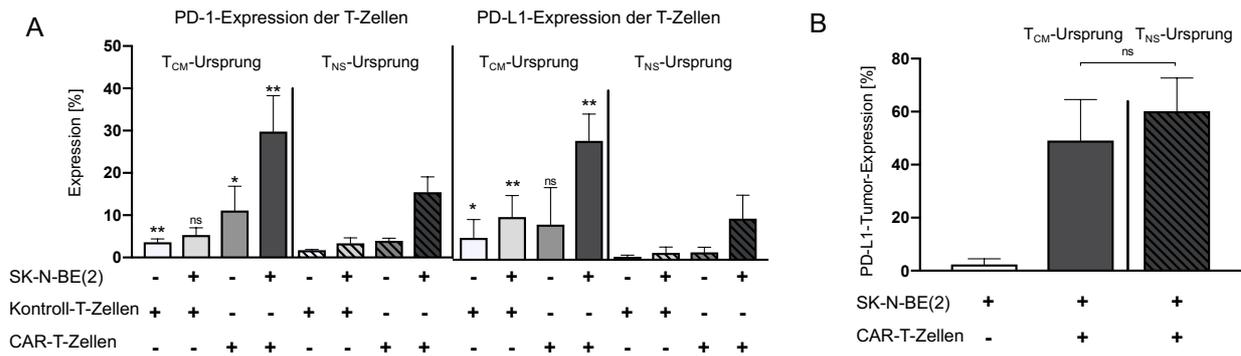
bestätigen, haben wir die funktionellen Zytotoxizitätsassays auch mit diesen L1CAM-CAR-T-Zellen wiederholt. Die PD-1-Blockade mit Nivolumab erhöhte überraschenderweise die zytotoxische Aktivität der L1CAM-CAR-T-Zellen mit T<sub>NS</sub>-Ursprung bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:2 nach 24 Stunden nicht (Abb. 8A, Seite 31).<sup>32</sup> Der Phänotyp verwendeter CAR-T-Zellen wurde vor Ko-Kultur mit Neuroblastomzellen durchflusszytometrisch untersucht, um zu zeigen, dass der ursprüngliche Phänotyp während der *ex vivo*-Expansion der CAR-T-Zellen erhalten bleibt. T-Zell-Subpopulationen wurden nach dem zuvor veröffentlichten Ansatz der Riddell-Gruppe definiert.<sup>39</sup> Zentralen Gedächtnis-T-Zellen ähnliche (CD45RO+/CD62L+/FAS+) CD8<sup>+</sup> T-Zellen blieben erwartungsgemäß die größte Subpopulation in CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung (Abb. 8B, Seite 31).<sup>32</sup> Die CAR-T-Zellen, die aus vorab nicht selektierten T-Zellen generiert wurden, bestanden nach Expansion hauptsächlich aus Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cells*) ähnlichen (CD45RO+/CD62L-/FAS+) CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach 24-stündiger Exposition mit SK-N-BE(2)-Zellen (Effektor:Ziel-Verhältnis 1:1) war die Induktion der PD-1/PD-L1-Achse bei den aus T<sub>CM</sub>-Zellen generierten L1CAM-CAR-T-Zellen signifikant höher als bei ihren aus T<sub>NS</sub>-Zellen generierten Pendants (Abb. 8C, Seite 31), und bei den L1CAM-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung war die PD-1/PD-L1-Expression ebenfalls höher vor Ko-Kultur mit Neuroblastomzellen. Die höhere PD-1-Induktion bei CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung nach 24-stündiger Exposition mit SK-N-BE(2)-Zellen zeigte sich ebenfalls bei CD4<sup>+</sup> L1CAM-CAR-T-Zellen (Abb. 8D, Seite 31). Allerdings gab es keinen Unterschied bei der Induktion von PD-L1 in SK-N-BE(2) bei CAR-T-Zell Ko-Kultur mit aus T<sub>NS</sub>-Zellen generierten L1CAM-CAR-T-Zellen oder ihren Pendants mit T<sub>CM</sub>-Ursprung (Abb. 8E und F, Seite 31). Nivolumab erhöhte die zytotoxische Aktivität von L1CAM-CAR-T-Zellen, die aus vorab nicht selektierten T-Zellen generiert wurden, nicht. Höchstwahrscheinlich liegt dies an der nur mäßigen PD-1- und PD-L1-Induktion dieser CAR-T-Zellen. Hohe PD-1- und PD-L1-CAR-T-Zell-Expression und der daraus folgende Nutzen einer PD-1-*Checkpoint*-Inhibition war auf L1CAM-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung beschränkt.



**Abbildung 8. Ausgangsmaterial für CAR-T-Zellgenerierung beeinflusst Nivolumab-Effektivität.**<sup>32</sup> A. Zytotoxizität von L1CAM-CAR-T-Zellen, die entweder aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Zellen gewonnen wurden, wurde durch einen Luciferase-basierten Reporter-Gen-Assay nach einer 24-stündigen Tumor-Ko-Kultur bei einem E:Z-Verhältnis von 1:2 und Zugabe von Nivolumab (oder NaCl als Kontrolle) bestimmt. Die Zelllyse wurde bestimmt und die statistische Analyse wurde wie in Abb. [7] beschrieben durchgeführt. B. T-Zell-Subpopulationen der L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellpopulationen mit T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Ursprung, die am Tag 12 der Expansion mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert wurden. Die Daten stellen den Mittelwert von jeweils 3 Spendern für CAR-T-Zellen mit T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Ursprung dar. CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> FAS<sup>+</sup> für Effektor Gedächtnis-T-Zell-ähnliche, CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> FAS<sup>+</sup> für T<sub>CM</sub>-ähnliche, CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> FAS<sup>+</sup> für Stamm-Gedächtnis-T-Zell- (*stem cell-like memory T cells*) ähnliche, CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> FAS<sup>-</sup> für naive T-Zellen. C. PD-1- und PD-L1-Expression von aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Zellen generierten CD8<sup>+</sup> Kontroll- und L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen vor und nach Ko-Kultur mit SK-N-BE(2) bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 für 24 Std. [D. PD-1-Expression von aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub> generierte CD4<sup>+</sup> Kontroll- und L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen vor und nach Ko-Kultur mit SK-N-BE(2) bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 für 24 Std.] PD-L1-Expression von SK-N-BE(2)-Neuroblastomzellen allein und nach Ko-Kultur mit entweder aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Zellen generierten CD8<sup>+</sup> (E) [und CD4<sup>+</sup>] L1CAM-4-1BB-CAR T-Zellen (F) in einem E:Z-Verhältnis von 1:5 für 24 Std. Die Daten stellen den Mittelwert von 2 Spendern für aus T<sub>NS</sub> bzw. 3 Spendern für aus T<sub>CM</sub>-Zellen generierte CAR-T-Zellen dar, wobei für jeden Spender 3 unabhängige Experimente ausgewertet wurden. \*P < 0,05 und \*\*P < 0,01 wurden mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test ausgewertet, wobei die PD-1 und PD-L1-Expression der CAR- und Kontroll-T-Zellen mit T<sub>NS</sub> oder T<sub>CM</sub>-Ursprung verglichen wurde“ (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

#### 4.5 Erhöhte PD-1/PD-L1 Expression in CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung ist unabhängig von der kostimulatorischen Domäne

Es konnte gezeigt werden, dass die kostimulierende Domäne eines CARs einen erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der CAR-T-Zellen hat. Allerdings erschweren konträre veröffentlichte Forschungsergebnisse es den Einfluss kostimulatorischer Domänen auf die PD-1/PD-L1-Achse bei Neuroblastom-spezifischer CAR-T-Zelltherapie genauer vorherzusagen. Daher untersuchten wir im nächsten Schritt die Wirkung einer zweiten kostimulatorischen Domäne auf die PD-1/PD-L1-Induktion in L1CAM-CAR-T-Zellen. Die L1CAM-CAR-T-Zellen, die bisher verwendet wurden, beinhalten eine 4-1BB kostimulatorische Domäne und werden nun mit L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen verglichen, die eine CD28 kostimulatorische Domäne beinhalten. Die Induktion der PD-1/PD-L1-Achse nach Ko-Kultur von Tumorzellen war in L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung ebenfalls signifikant höher als in aus nicht selektierten T-Zellen generierten CAR-T-Zellen.<sup>32</sup> Auch vor Ko-Kultur war die PD-1/PD-L1-Achse höher in L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung exprimiert. (Abb. 9A, Seite 33). Die Unterschiede in der PD-1/PD-L1 Induktion zwischen den aus T<sub>CM</sub> oder aus nicht selektierten T-Zellen generierten L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen ähnelten somit denen, die wir bei L1CAM-CAR T-Zellen, die eine 4-1BB kostimulierende Domäne beinhalten, beobachten konnten. Die Hochregulierung von PD-L1 in SK-N-BE(2) wurde gleichermaßen durch die Ko-Kultur mit L1CAM-CD28-CAR T-Zellen mit T<sub>CM</sub>- sowie T<sub>NS</sub>-Ursprung induziert und war vergleichbar mit den PD-L1-Expressionswerten nach der Ko-Kultur mit L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen (Abb. 9B, Seite 33).<sup>32</sup> Obwohl L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen unabhängig von ihrem Ausgangsmaterial vor Ko-Kultur mit Tumorzellen höhere PD-1-Werte exprimierten als die L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen ( $p < 0,01$ , Daten nicht gezeigt), wurde nach Ko-Kultur mit Tumorzellen kein signifikanter Unterschied in der PD-1/PD-L1-Expression zwischen L1CAM-CAR-T-Zellen mit CD28 oder 4-1BB kostimulatorischer Domäne festgestellt. Unabhängig von der kostimulatorischen Domäne unterschied sich die PD-1- und PD-L1-Expression signifikant zwischen den aus T<sub>CM</sub>- oder aus nicht selektierten T-Zellen generierten L1CAM-CAR-T-Zellen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die gewählte Ausgangs-T-Zell-Subpopulation für die CAR-T-Zellgenerierung einen erheblichen Einfluss auf die Nivolumab-Wirksamkeit hat und vor der Anwendung einer zusätzlichen PD-1-Inhibition berücksichtigt werden sollte.

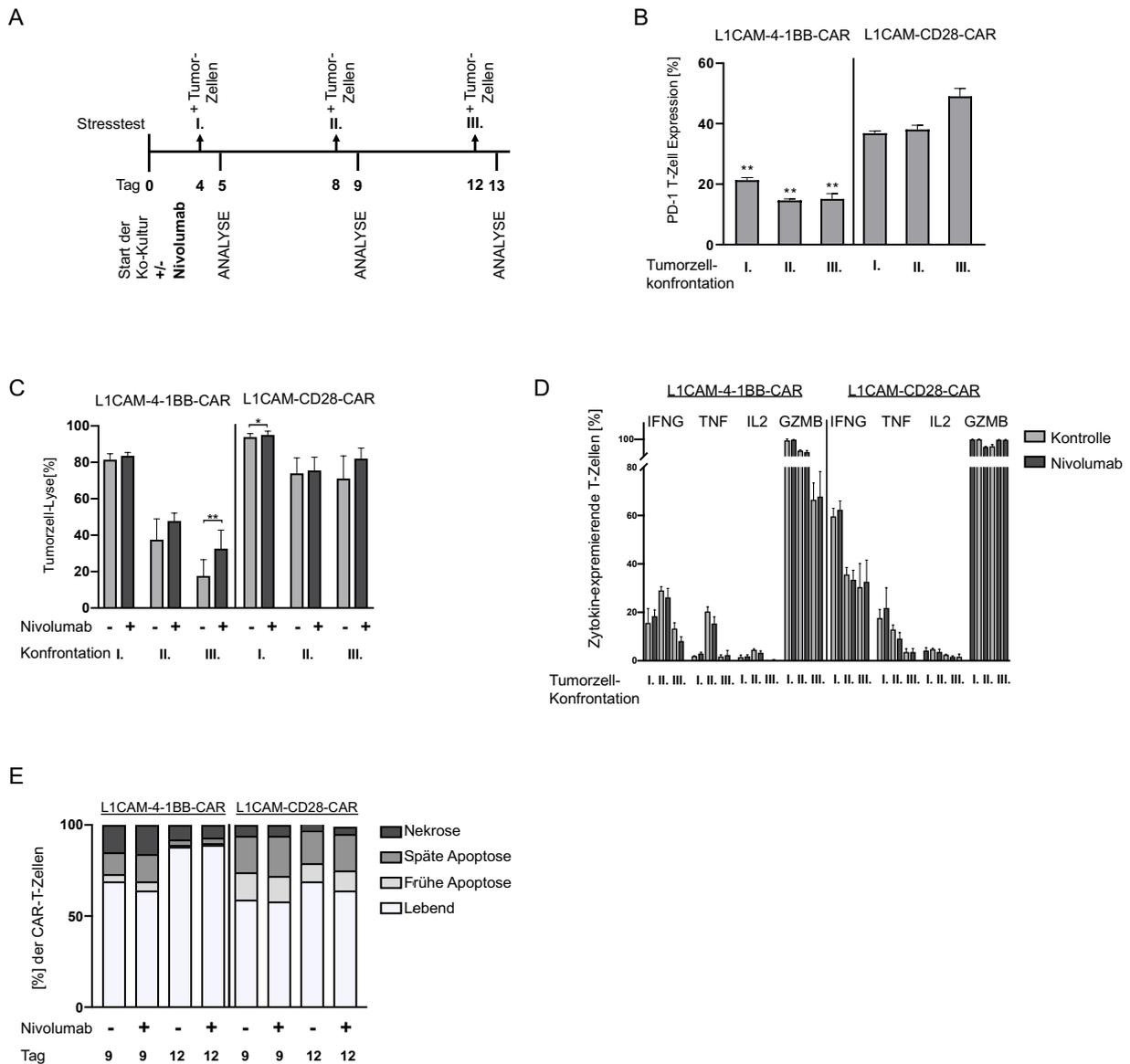


**Abbildung 9. Höhere PD-1/PD-L1 Expression der CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung ist unabhängig von kostimulatorischer Domäne.**<sup>32</sup> „A. PD-1- und PD-L1-Expression von aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Zellen generierten Kontroll- und L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen vor und nach Ko-Kultur mit SK-N-BE(2) bei einem E:Z-Verhältnis von 1:1 für 24 Std. Die Daten zeigen den Mittelwert von 2 Spendern von CAR-T-Zellen aus T<sub>NS</sub> bzw. 2 Spendern von CAR-T-Zellen aus der T<sub>CM</sub>-Zellen, wobei für jeden Spender 3 unabhängige Experimente ausgewertet wurden. \*P < 0,05 und \*\*P < 0,01 wurden mit einem zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test ermittelt, wobei die PD-1 und PD-L1-Expression der CAR- und Kontroll-T-Zellen mit T<sub>NS</sub> oder T<sub>CM</sub>-Ursprung verglichen wurde. B. PD-L1-Expression von SK-N-BE(2)-Neuroblastomzellen allein und nach Ko-Kultur mit entweder aus T<sub>NS</sub>- oder T<sub>CM</sub>-Zellen generierten L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen bei einem E:Z-Verhältnis von 1:5 für 24 Std. Die Daten stellen den Mittelwert von jeweils 2 Spendern für CAR-T-Zellen mit T<sub>NS</sub> oder T<sub>CM</sub>-Ursprung dar, wobei für jeden Spender 3 unabhängige Experimente ausgewertet wurden“ (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

#### 4.6 Erschöpfte L1CAM-CAR-T-Zellen profitieren stärker von PD-1-Checkpoint-Inhibition

Um eine vollständige Tumoreradikation zu erreichen, sind CAR-T-Zellen *in vivo* wiederholt mit Tumorzellen konfrontiert, resultierend in einer mehrfachen Tumorantigen-spezifischen CAR-T-Zellaktivierung. Es ist bekannt, dass dabei die PD-1/PD-L1-Achse zur Hypofunktion der CAR-T-Zellen und zur Beeinträchtigung der Wirksamkeit bei soliden Tumoren beiträgt. Wir untersuchten, wie die Blockade der PD-1-/PD-L1-Achse in diesem Szenario der Daueraktivität helfen könnte. Eine sich wiederholende Tumorkonfrontation wurde im Rahmen eines Stresstests nachgeahmt, indem die CAR-T- und Tumorzell-Interaktion über 13 Tage aufrechterhalten wurde.<sup>32</sup> Anlehnend an bereits veröffentlichte Protokolle wurden CAR-T-Zellen während der 13 Tage dreimal in einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:2 erneut mit frischen SK-N-BE(2)-Zellen ko-kultiviert (Abb. 10A, Seite 35).<sup>31,36</sup> In diesen Stresstests wurden nur aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen generierte CAR-T-Zellen verwendet, aufgrund ihrer höheren PD-1/PD-L1-Expression nach Ko-Kultur. Alle 3 erneuten Tumorzellkonfrontationen induzierten signifikant die PD-1-Expression in beiden L1CAM-CAR-T-Zellen der zweiten Generation. Im Gegensatz zu den vorherigen Daten, bei denen nach einmaliger Tumorzell-Ko-Kultur kein signifikanter

Unterschied in der PD-1-Expression zwischen L1CAM-CAR-T-Zellen mit CD28 oder 4-1BB kostimulatorischen Domäne beobachtet wurde, war die PD-1-Expression in L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen bei sich wiederholender Tumorzellkonfrontation persistent höher (36,8%, 38,0% und 49,0% in L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen gegenüber 21,3%, 14,6% bzw. 15,1% in L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen; Abb. 10B, Seite 35).<sup>32</sup> Anschließend wollten wir den verstärkenden Einfluss der PD-1-Blockade auf die L1CAM-CAR-T-Zellzytotoxizität im Kontext der T-Zell-Hypofunktion untersuchen, die durch den Stresstest imitiert wurde. Die zytotoxische Aktivität von L1CAM-CAR-T-Zellen wurde auch hier durch den Luciferase-basierte Reporter-Gen-Assay bestimmt. Hierfür wurden anschließend an jede erneute Tumorzellkonfrontation ein Teil der L1CAM-CAR-T-Zellen mit SK-N-BE(2) in einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 1:1 ko-kultiviert. Trotz der beobachteten höheren PD-1-Expression der L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen, wurde die zytotoxische Aktivität der CAR-T-Zellen durch die Nivolumab-vermittelte PD-1-Blockade nur signifikant für L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen nach der dritten Tumorzellkonfrontation verstärkt (Abb. 10C, Seite 35).<sup>32</sup> Bemerkenswert ist, dass die absolute zytotoxische Effektivität der L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen mit jeder erneuten Tumorkonfrontation um fast 50% abnahm, was wir bei L1CAM-CD28-CAR-T-Zellen in diesem Ausmaß nicht beobachteten. Nach jeder erneuten Tumorzellkonfrontation führten wir eine intrazelluläre Färbung für IFNG, Interleukin 2 (IL2), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Granzym B (GZMB) durch. Die Abnahme der zytotoxischen Aktivität mit kumulativen Tumorzellkonfrontationen spiegelte sich in einer verminderten Zytokinproduktion der L1CAM-CAR-T-Zellen wider. Ein signifikanter Einfluss von Nivolumab auf die zytotoxische Effektivität der CAR-T-Zellen spiegelte sich jedoch weder bei L1CAM-CAR-T-Zellen mit einer 4-1BB noch mit einer CD28 kostimulatorischen Domäne in einer erhöhten Anzahl Zytokin-exprimierender T-Zellen wider (Abb. 10D, Seite 35). Da nur lebende CAR-T-Zellen für die Analyse durchflusszytometrischer Daten in Betracht gezogen wurden, nahmen wir an, dass Nivolumab möglicherweise nicht die Anti-Tumor-Effektivität jeder einzelnen CAR-T-Zelle verbessert, sondern vielmehr CAR-T-Zellen vor dem Zelltod rettet, was zu einer höheren Anzahl lebender Zellen mit Anti-Tumor-Aktivität insgesamt führt. Daher führten wir einen Annexin V/7AAD-Apoptose-Assay durch, aber da es keine Unterschiede zwischen der mit Nivolumab behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe gab, konnte unsere Hypothese nicht bestätigt werden (Abb. 10E, Seite 35).



**Abbildung 10. CAR-T-Zell-Erschöpfung ist Voraussetzung für Nivolumab-Effektivität.**<sup>32</sup> (Abb.10A-C) „A.

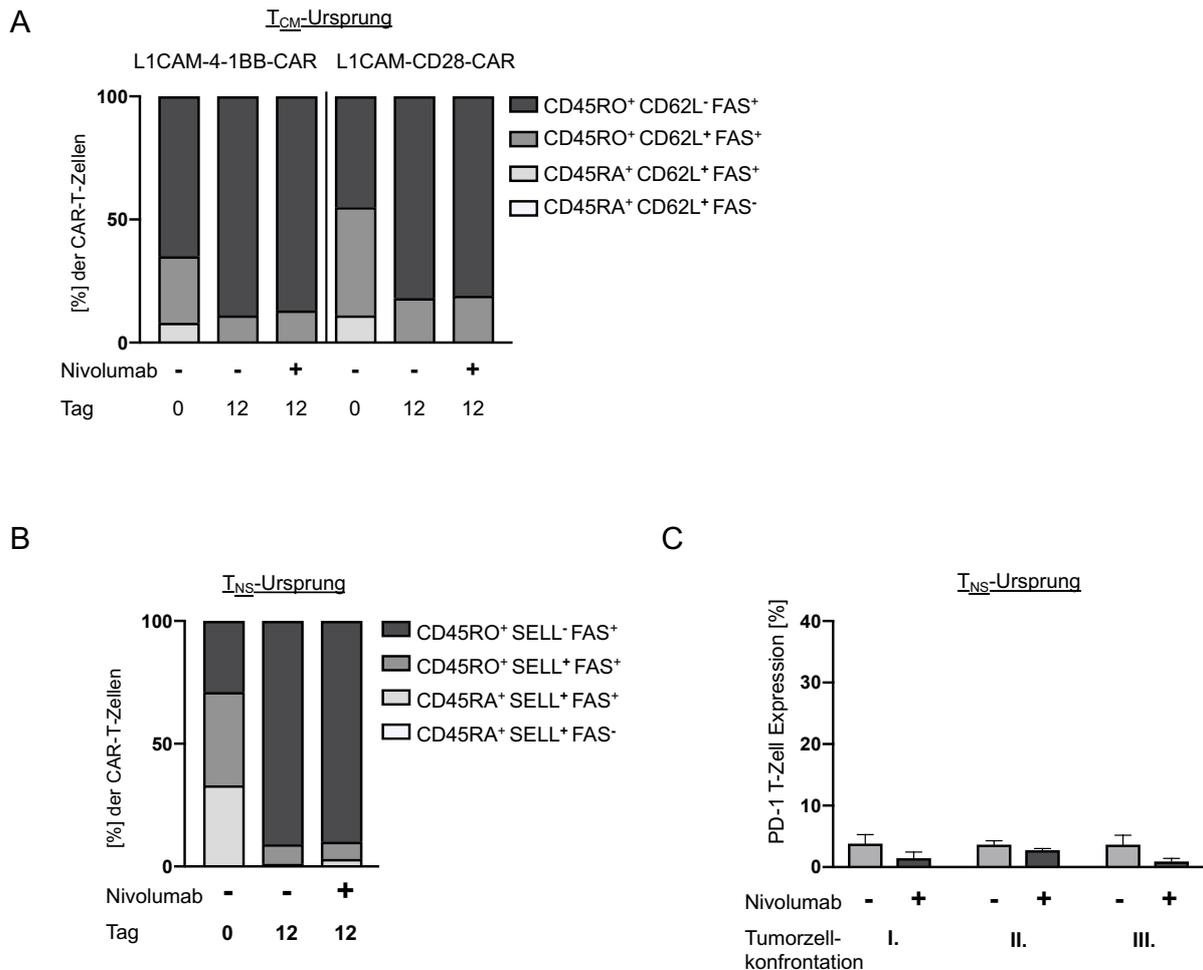
Ein schematischer Überblick des Stresstests mit 3 Tumorkonfrontationen mit neu hinzugefügten SK-N-BE(2)-Neuroblastomzellen im E:Z-Verhältnis 1:2. B. PD-1-Expression von L1CAM-4-1BB- und CD28-CAR T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung 24 Std. nach Tumorzellkonfrontation. \*\*P < 0,01 wurde mit einem zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test ermittelt, die PD-1-Expression der CAR- und Kontroll-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung vergleichend. C. Neuroblastomzelllyse von L1CAM-4-1BB- oder CD28-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung 24 Std. nach Konfrontation mit SK-N-BE(2)-Neuroblastomzellen in einem E:Z-Verhältnis von 1:1 und Zusatz von Nivolumab (oder NaCl als Kontrolle). Die Zelllyse wurde bestimmt und die statistische Analyse wurde wie in Abb. [7] beschrieben durchgeführt. [D. Durchflusszytometrisch erfasste intrazelluläre Expression von IFNG, TNF, IL2 und Granzym B von L1CAM-4-1BB- oder CD28-CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung 24 Std. nach Konfrontation mit SK-N-BE(2)-Neuroblastomzellen und Zusatz von Nivolumab (oder NaCl als Kontrolle). E. Annexin/7AAD-Apoptose-Färbung von aus T<sub>CM</sub>-Zellen generierten L1CAM-4-1BB- oder CD28-CAR-T-Zellen 24 Stunden nach der zweiten Tumorkonfrontation und 3 Tage später. Die gezeigten

Daten stellen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten mit L1CAM-4-1BB- und CD28-CAR-T-Zellen, die aus denselben  $T_{CM}$ -selektierten  $CD8^+$  T-Zellen des Spenders generiert wurden, dar]“ (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

Nichtsdestotrotz zeigt bei wiederholter Tumorzellkonfrontation im Rahmen eines Stresstests der Vergleich von L1CAM-CAR-T-Zellen mit einer 4-1BB oder CD28 kostimulatorischen Domäne, die aus  $T_{CM}$ -Zellen desselben Spenders generiert wurden, dass für eine erfolgreiche Kombinationstherapie mit Nivolumab zusätzlich zu einer hohen PD-1- und PD-L1-Expression eine CAR-T-Zell-Erschöpfung, definiert als Abnahme der zytotoxischen Effektivität und Zytokinproduktion, vorliegen muss.

#### 4.7 T-Zell-Subpopulation für CAR-T-Zell-Herstellung bestimmt PD-1/PD-L1 Expression anhaltend

Aufgrund des Einflusses der gewählten Ausgangs-T-Zell-Subpopulation für die CAR-T-Zellgenerierung auf die PD-1/PD-L1-Achse untersuchten wir im nächsten Schritt, ob eine Kombinationstherapie mit Nivolumab wiederum einen Einfluss auf den CAR-T-Zell-Phänotyp hat. Dafür wurden die CAR-T-Zellen während des Stresstest in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nivolumab ko-kultiviert und nach 12 Tagen der Phänotyp mittels Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl T-Zellpopulationen der L1CAM-CAR-T-Zellen mit CD28 als auch 4-1BB als kostimulatorischen Domäne verschoben sich im Verlauf des Stresstests unabhängig von der Nivolumabzugabe phänotypisch in Richtung des Effektor-Gedächtnis-T-Zelltyps (Abb. 11A, Seite 37).<sup>32</sup> Der Phänotyp von L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen, die aus vorab nicht selektierten T-Zellen generiert wurden, verschob sich nach mehrfacher Tumorkonfrontation ebenfalls in Richtung eines Effektor-Gedächtnis-T-Zelltyps (Abb. 11B, Seite 37), obwohl ihre PD-1-Expression konstant niedrig war (3,8%, 3,6% und 3,7%, Abb. 11C, Seite 37). Höchstwahrscheinlich verschiebt sich der Phänotyp der CAR-T-Zellen aufgrund der T-Zell-Aktivierung in Richtung Effektor Gedächtnis-T-Zellen unabhängig vom Ausgangsmaterial für die CAR-T-Zellgenerierung. Selbst bei phänotypisch konvergierenden L1CAM-CAR-T-Zellpopulationen war somit ihr initiales hohes oder niedriges PD-1-Expressionsniveau bei jeder erneuten Ko-Kultur konstant, und abhängig davon, ob die L1CAM-CAR-T-Zellen aus nicht selektierten oder  $T_{CM}$ -angereicherten T-Zellen generiert wurden. Dies unterstreicht den Einfluss des Ausgangsmaterials der CAR-T-Zellgenerierung auf die PD-1/PD-L1-Achse.



**Abbildung 11. Anhaltender Einfluss der T-Zell-Fraktion auf PD-1/PD-L1-Achse.**<sup>32</sup> (Abb.11A) „T-Zell-Subpopulationen der L1CAM-CAR-T-Zellpopulationen mit  $T_{CM}$  (A) [oder  $T_{NS}$ -Ursprung (B),] die am Tag 12 der Expansion mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert wurden. CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> FAS<sup>+</sup> für Effektor Gedächtnis-T-Zell-ähnliche, CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> FAS<sup>+</sup> für  $T_{CM}$ -ähnliche, CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> FAS<sup>+</sup> für Stamm-Gedächtnis-T-Zell- (*stem cell-like memory T cells*) ähnliche, CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> FAS<sup>-</sup> für naive T-Zellen. [C. PD-1-Expression von L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen mit  $T_{NS}$ -Ursprung 24 Std. nach Tumorzellkonfrontation und Zusatz von Nivolumab (oder NaCl als Kontrolle)]“ (Übersetzung durch die Autorin).<sup>32</sup>

## 5 Diskussion

### 5.1 Rationale für eine Kombinationstherapie von PD-1-Checkpoint-Inhibitoren und CAR-T-Zelltherapie beim Neuroblastom

Vielversprechende kürzlich veröffentlichte Ergebnisse einer klinischen Studie zu GD2-CAR-T-Zellen beim Neuroblastom zeigten eine Anti-Tumor-Aktivität mit klinischer Regression bei 3 von 12 Patienten.<sup>40</sup> Allerdings waren die gesehenen Erfolge nur transient. Straathof et al. konnten bei diesen 3 Patienten nach Therapie eine PD-L1-Expression entweder der wiederkehrenden Tumorzellen oder der Makrophagen und Myeloidzellen des Tumormikromilieus feststellen. Möglicherweise hatte die PD-1/PD-L1-

Achse somit einen negativen Einfluss auf die Aktivität und Persistenz der GD2-CAR-T-Zellen. Eine Kombinationstherapie aus CAR-T-Zellen und ergänzenden Immuntherapien wie der *PD-1-Checkpoint*-Inhibition ist ein vielversprechender Behandlungsansatz insbesondere für Neuroblastompatienten mit Therapie-refraktären Tumoren oder Rezidiv und aktuell weiterhin sich nur langsam verbessernden Prognosen. Für die Möglichkeit eines kombinatorischen Therapieansatzes mit *PD-1-Checkpoint*-Inhibitoren und Neuroblastom-spezifischer CAR-T-Zelltherapie, ist sowohl die PD-1-Expression auf den CAR-T-Zellen auf der einen Seite als auch die PD-L1-Expression der Neuroblastomzellen sowie vermutlich auch der Zellen des Tumormikromilieus auf der anderen Seite unerlässlich. Die in Studien berichtete PD-L1-Tumorexpression bei diagnostischen Neuroblastom-Biopsien war zuletzt uneinheitlich. Im Gegensatz zu vollständigem Fehlen von PD-L1 in allen 18 untersuchten Neuroblastom-Proben bei Diagnose,<sup>41</sup> konnten Forscher einer anderen Gruppe eine PD-L1-Expression in 14% von 118 Neuroblastom-Proben feststellen.<sup>42</sup> Unter den 118 Neuroblastom-Proben waren 7, die nach systemischer Therapie entnommen wurden. Welchen Anteil sie von den PD-L1-positiven Proben ausmachen, ist der Studie leider nicht zu entnehmen. Wir konnten zeigen, dass in 3 verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien, die vor Ko-Kultur nur geringe PD-L1-Expressionsspiegel aufwiesen, die PD-L1-Expression nach L1CAM-CAR-T-Zellexposition induziert wurde.<sup>32</sup> Niedrige oder gar negative PD-L1-Expressionsspiegel zum Zeitpunkt der Diagnose scheinen somit kein Ausschlusskriterium für einen kombinierten Ansatz mit *PD-1-Checkpoint*-Inhibitoren zu sein. Vielmehr lässt sich annehmen, dass die PD-L1-Expression auf Tumorzellen nach CAR-T-Zellexposition ansteigt.

Die Erkenntnisse zur PD-1/PD-L1-Achse und die Möglichkeit diese mittels *PD-1-Checkpoint*-Inhibitoren zu nutzen, hatten ihre Anfänge in der Forschung zum metastasierten Melanom. Hier zeigte sich, dass Tumor-reaktive tumorinfiltrierende Lymphozyten in Melanomen phänotypisch eine hohe PD-1-Expression aufwiesen.<sup>7</sup> Auch in Melanomläsionen von Patienten, die auf eine PD-1-Blockade ansprachen, wurden Populationen von tumorinfiltrierenden Lymphozyten gefunden, die überwiegend PD-1- und PD-L1 exprimierten.<sup>43</sup> In Übereinstimmung damit zeigten wir, dass hohe PD-1- und PD-L1-Expressionspegel auf den L1CAM-CAR-T-Zellen selbst mit dem Ausmaß des Nutzens der *PD-1-Checkpoint*-Inhibition für die zytotoxische L1CAM-CAR-T-Zelleffektivität korrelieren und als Indikatoren für den Nutzen einer kombinatorischen PD-1-Blockade dienen könnten.<sup>32</sup>

Gleichermaßen erwies sich die Unterbrechung der PD-1/PD-L1-Achse im Rahmen von präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen verschiedener solider Tumore, wie des Melanoms, Neuroblastoms und Prostatakarzinoms, bisher nur dann als vorteilhaft, wenn sie mit PD-1 hoch exprimierenden CAR-T-Zellen kombiniert wurde.<sup>44,45</sup> Der Nutzen einer Kombination aus monoklonalem PD-1-Antikörper und CAR-T-Zell-Therapie beim Neuroblastom verringerte sich in einer Studie nach Integration einer autokrin wirkenden IL-15-Domäne innerhalb des CAR-Konstrukts.<sup>46</sup> Die gleichzeitig beobachtete reduzierte PD-1-CAR-T-Zellexpression könnte hierfür eine Erklärung bieten, aufgrund der resultierenden verringerten Interaktionsmöglichkeit des PD-1-Antikörpers. Erste Ergebnisse einer laufenden Phase-1-Studie (NCT01822652) für Hochrisiko- und rezidierte Neuroblastome zeigten keinen positiven Effekt einer zusätzlichen PD-1-Blockade auf die Expansion oder Persistenz von iC9-GD2-CAR-T-Zellen der 3. Generation.<sup>24</sup> Die PD-1-Expressionsspiegel der transfundierten CD8<sup>+</sup>-CAR-T-Zellen waren mit einer durchschnittlichen Expression von unter 10 % niedrig im Vergleich zur PD-1-CAR-T-Zellexpression, die in den Studien mit präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen anderer solider Tumore gesehen wurde.<sup>44,45</sup> Zur PD-1-Expression der CAR-T-Zellen nach Transfusion gibt es leider keine Angabe, was allerdings den Rückschluss, dass die niedrige PD-1-Expression Grund für den fehlenden Nutzen einer zusätzlichen PD-1-Blockade sein könnte, zunächst nicht zulässt. Wir konnten zeigen, dass die PD-L1-Expression auf Neuroblastomzellen und die PD-1-Expression auf CAR-T-Zellen nach Ko-Kultur ansteigt und somit die Rationale für die Unterbrechung der PD-1/PD-L1-Achse gegeben ist.<sup>32</sup> Allerdings war eine erfolgreiche PD-1-*Checkpoint*-Inhibition vor allem von einer hohen PD-1-Expression der CAR-T-Zellen abhängig. Basierend auf unseren eigenen Ergebnissen, gehen wir davon aus, dass man PD-1-Expressionspegel der CAR-T-Zellen nach Tumorexposition und T-Zellaktivierung berücksichtigt muss, bevor man sich für oder gegen die kombinierte Therapie aus Checkpoint Inhibitor und CAR-T-Zelltherapie entscheidet.

Interessanterweise scheint auch die PD-L1-Expression von CAR-T-Zellen eine wichtige Rolle im Kontext der PD-1/PD-L1-Achse und ihrer Unterbrechung durch *Checkpoint*-Inhibitoren zu spielen. Wir konnten beobachten, dass die Ko-Kultur mit Tumorzellen und daraus resultierender CAR-T-Zellaktivierung mit einer erhöhten PD-L1-Expression der L1CAM-CAR-T-Zellen einherging.<sup>32</sup> Bei Ko-Kultur von L1CAM-CAR-T-Zellen mit PD-L1-*knock-out* SK-N-BE(2)-Zellen, blieb eine Tendenz der Erhöhung der L1CAM-CAR-T-

Zellytotoxizität durch Nivolumab bestehen, trotz geringer PD-L1-Expression auf den Tumorzellen und konsekutiver nur geringer PD-1/PD-L1-vermittelter Hemmung durch die Neuroblastomzellen. Für Zellen des Immunsystems wie myeloide Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells*) und Tumor-infiltrierende Lymphozyten, die selbst PD-L1 exprimieren, konnte bereits in Modellen solider Tumore gezeigt werden, dass sie nachweislich zur Immunevasion beitragen.<sup>47,48</sup> Auswertungen des Ansprechens auf einen monoklonalen PD-L1-Antikörper bei Patienten mit verschiedenen Krebsarten zeigten zudem, dass die PD-L1-Expression auf Tumorzellen zwar mit dem Therapieerfolg der PD-L1-Blockade korrelierte, aber auch die PD-L1-Expression tumorinfiltrierender Lymphozyten prädiktiv für besseres Ansprechen war.<sup>49</sup> Im Hinblick dieser Erkenntnisse und da die PD-L1-Expression in den L1CAM-CAR-T-Zellen im Vergleich zu den PD-L1-*knock-out* SK-N-BE(2)-Zellen nach Tumor- bzw. CAR-T-Zellkonfrontation fast 4-mal höher war,<sup>32</sup> betrachten wir eine CAR-durch-CAR-Inhibition und nicht nur die etablierte Inhibition der CAR-T-Zellzytotoxizität durch auf Tumorzellen exprimiertem PD-L1 als Erklärung für unsere Beobachtung. Diese wechselseitige Inhibition von CAR-T-Zellen untereinander bietet somit einen weiteren Grund für einen kombinatorischen Ansatz aus CAR-T-Zellen mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibition.

## 5.2 Regulierung der PD-1/PD-L1-Achse-Induktion

Die zytokinvermittelte Induktion der PD-1/PD-L1-Achse aufgrund der Anti-Tumor-Aktivität von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten wurde als adaptive Immunresistenz bezeichnet.<sup>8</sup> Dieser Mechanismus der Immunevasion von Tumorzellen konnte kürzlich auch beim Neuroblastom bestätigt werden.<sup>26</sup> In ähnlicher Weise konnten wir zeigen, dass PD-L1 in Neuroblastom-Zelllinien nach der Ko-Kultur mit L1CAM-CAR-T-Zellen hochreguliert wurde.<sup>32</sup> Weiterhin bestätigte unser experimentelles Set-up mit Medien, die durch Ko-Kultur oder alleine kultivierten Tumorzellen konditioniert wurden, dass lösliche Faktoren wie IFNG und nicht Zell-Zell-Interaktionen die PD-L1-Hochregulierung in Neuroblastomzellen induzieren. Ein tiefgreifendes Verständnis der Mechanismen der PD-L1-Induktion sind im Hinblick auf die Auswahl von Patienten für eine PD-1/PD-L1-*Checkpoint*-Inhibition unabdingbar. Sowohl inflammatorische Prozesse als auch die Induktion über Onkogene spielen bei der PD-L1-Regulation auf transkriptionaler, post-transkriptionaler und translationaler Ebene eine Rolle.<sup>50</sup> Unsere Ergebnisse unterstützen zunächst die Rationale CAR-T-Zellen mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren unabhängig von

der prätherapeutischen PD-L1-Tumorexpression zu kombinieren, da eine PD-L1-Hochregulation der Neuroblastomzellen nach CAR-T-Zellexposition zu erwarten ist. Zusätzlich muss auch der Einfluss von Onkogenen auf die PD-L1 Expression bedacht werden. Lungenkarzinompatienten deren EGF-Rezeptor mutiert ist, weisen eine höhere PD-L1-Expression auf.<sup>51</sup> Eine Studie konnte allerdings zeigen, dass diese nicht auf eine PD-1-*Checkpoint*-Inhibition ansprechen.<sup>52</sup> Das Onkogen MYC induziert die PD-L1-Expression über die Bindung an den CD274 Promotor und beeinflusst so das immunevasive Mikromilieu solider Tumore.<sup>53</sup> MYCN Amplifikationen finden sich beim Hochrisiko-Neuroblastom und sind mit einem T-Zell-armen Mikromilieu assoziiert, vermutlich durch die Unterdrückung pro-inflammatorischer Signalwege, wie der des IFN-Signalweges.<sup>54</sup> Bei einer der 3 hier verwendeten Neuroblastomzelllinien, den SK-N-BE(2), handelte es sich um eine MYCN-amplifizierte Tumorzelllinie.<sup>32</sup> Nichtsdestotrotz zeigte sie vor CAR-T-Zellkonfrontation zunächst eine niedrige PD-L1-Expression, die nach CAR-T-Zellexposition deutlich anstieg und somit zytokinvermittelt beeinflussbar war. Ob die PD-1/PD-L1-Achse von MYCN-amplifizierten Neuroblastomzellen auch *in vivo* beeinflussbar und somit empfänglich für eine PD-1-*Checkpoint*-Inhibition ist oder eine MYCN-Amplifikation ähnlich wie die EGFR-Mutation zu einem schlechteren Ansprechen auf PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren führt, bleibt klärungsbedürftig. Ergebnisse erster Studien zeigen allerdings, dass MYC-Inhibitoren insbesondere die IFNG-vermittelte PD-L1-Expression wieder erhöhen können.<sup>54,55</sup> Sie böten somit die Möglichkeit, die PD-1/PD-L1-Achse des immunsuppressiven Mikromilieus auch bei MYCN-Amplifikation für eine PD-1-*Checkpoint*-Inhibition zu re-sensibilisieren.

PD-1/PD-L1-Achsen-regulierende Prozesse auf Seiten der T-Zellen sind bisher weniger gut verstanden. Im Kontext der chronischen Inflammation konnte bereits früh gezeigt werden, dass die Zytokine Interleukin 2, 7 und 15, die eine entscheidende Rolle bei der peripheren T-Zellaktivierung und -proliferation spielen, auch unabhängig von einer Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor zur PD-1-T-Zellexpression führen.<sup>56</sup> Die Expression von PD-1 und PD-L1 der L1CAM-CAR-T-Zellen wurde in unseren Versuchen nur über den T-Zell-Rezeptor durch anti-CD3/CD28-*Beads* induziert und nicht durch das pro-inflammatorische Zytokin IFNG.<sup>32</sup> Somit war im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zur PD-L1-Tumorexpression eine direkte Zell-Zell-Interaktion über den T-Zell-Rezeptor oder aber CAR für die Induktion der PD-1/PD-L1-Achse der CAR-T-Zellen notwendig. Im Einklang mit unseren Ergebnissen zeigten Hakim et al kürzlich, dass pro-

inflammatorische Zytokine, die primär während der akuten Infektion relevant sind wie IFNG aber auch IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , keinen Einfluss auf die PD-1-Expression der T-Zellen hatten.<sup>57</sup> Nur eine anti-CD3 Stimulation und IL-15, Faktoren die essentiell für die Aktivierung und Proliferation sind, führten in ihren Untersuchungen zu einer PD-1-Induktion. Auch wenn weitere Forschung zum besseren Verständnis der PD-1/PD-L1-Achse auf Seiten der T-Zellen notwendig ist, unterstreicht dies, dass für eine erfolgreiche Kombinationstherapie von PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren und CAR-T-Zelltherapie sichergestellt werden muss, dass CAR-T-Zellen zum Tumor migrieren und dort über ihren CAR aktiviert werden. Nur dann folgt auf CAR-T-Zell-Seite die Induktion der PD-1-Expression und IFNG-vermittelt nach CAR-T-Zellaktivierung die Hochregulation von PD-L1 auf Tumorseite. Beides resultiert erst dann in einem Angriffspunkt zur Optimierung der CAR-T-Zelltherapie durch eine Kombination mit *Checkpoint*-Inhibitoren.

### 5.3 Einfluss auf die PD-1/PD-L1-Achse

CAR-T-Zellen, die aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen generiert wurden, persistieren nachweislich länger und proliferieren im Patienten stärker.<sup>37,38,58</sup> Wir zeigen, dass sich die PD-1-Expression von L1CAM-CAR-T-Zellen, die aus nicht selektierten oder für zentrale Gedächtnis-T-Zellen angereicherte Donor-T-Zellen generiert wurden, unterscheiden.<sup>32</sup> Die PD-1-Expressionsspiegel der CAR-T-Zellen mit T<sub>CM</sub>-Ursprung waren unabhängig von der kostimulatorischen Domäne höher und persistierten nach wiederholter Tumorzellkonfrontation im Rahmen des Stresstest. Enamorado et al. konnten in ihren Versuchen eine Subgruppe der verabreichten T-Zellen definieren, die durch eine hohe Anti-Tumor-Aktivität hervorstach. Bei dieser handelte es sich um zentrale Gedächtnis-T-Zellen mit hoher PD-1-Expression, die zudem nach wiederholter Tumorkonfrontation eine gewebeständige Gedächtnis-T-Zell-Population bildeten.<sup>59</sup> Interessanterweise steigerte eine PD-1-Blockade die Tumorerinfiltration der zentralen Gedächtnis-T-Zellen und verstärkte somit die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort. Die aktivierte PD-1/PD-L1-Achse in aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen generierten CAR-T-Zellen könnte sich somit nicht als Hindernis, sondern vielmehr als eine Eigenschaft erweisen, die wir nutzen können, um die therapeutische Effektivität der CAR-T-Zelltherapie weiter zu verbessern.

Unabhängig davon, ob die CAR-T-Zellen aus nicht selektierten oder für zentrale Gedächtnis-T-Zellen angereicherten Donor-T-Zellen generiert wurden, beobachteten wir

eine höhere PD-1- und PD-L1-Expression in L1CAM-CAR-T-Zellen mit inkorporierter CD28 als mit 4-1BB kostimulatorischen Domäne.<sup>32</sup> Es konnte bereits gezeigt werden, dass die CD28 kostimulierende Domäne die PD-1/PD-L1-Achse der CAR-T-Zellen beeinflusst. Wie und in welcher Richtung wird in der Literatur aber nach wie vor kontrovers diskutiert. Zolov et al. zeigten, dass eine CD28 kostimulatorische Domäne ihre CD123-CAR-T-Zellen anfälliger für die PD-1/PD-L1-vermittelte Hemmung der CAR-T-Zellaktivierung machte trotz geringerer PD-1-Expression der CAR-T-Zellen.<sup>29</sup> Übereinstimmend konnte für die PD-1/PD-L1-vermittelte Hemmung in nicht modifizierten T-Zellen festgestellt werden, dass bevorzugt der kostimulatorische CD28-Rezeptor durch die PD-1-aktivierte Shp2-Phosphatase inhibiert wird im Vergleich zu den T-Zellrezeptor nachgeschalteten Signalmolekülen.<sup>60</sup> In einem Mausmodell für chronische Infektion war die Proliferation erschöpfter CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch Antikörper-basierte PD-1-Blockade induziert wurde, CD28 abhängig.<sup>61</sup> Im Gegensatz dazu konnte die gezielte Deletion und Überexpression von CD28 in Ko-Kultursystemen mit T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen den direkten Einfluss der PD-1/PD-L1-vermittelten Inhibition auf das T-Zell-Rezeptor-Signal zeigen, für die der kostimulatorischen Rezeptoren nicht notwendig war.<sup>62</sup> Mizuno et al. zeigten außerdem, dass der kostimulatorische CD28-Signalweg die PD-1/PD-L1-vermittelte Inhibition der T-Zell-Aktivierung eher abschwächt. In ähnlicher Weise korrelierte eine höhere PD-1-Expression unserer L1CAM-CAR-T-Zellen mit CD28 kostimulatorsicher Domäne nicht mit einem größeren Nutzen der PD-1-*Checkpoint*-Inhibition für deren zytotoxische Effektivität, insbesondere nach rekursiver Tumorzellkonfrontation.<sup>32</sup> Im Gegensatz dazu war die PD-1-Blockade in der Lage, die abnehmende zytotoxische Aktivität unserer L1CAM-4-1BB-CAR-T-Zellen nach rekursiver Tumorzellkonfrontation signifikant zu steigern, trotz ihrer im Vergleich geringeren PD-1-Expression. Da die zytotoxische Aktivität dieser CAR-T-Zellen bei rekursiver Tumorzellkonfrontation geringer war und schneller abnahm, lies sich die PD-1/PD-L1-Achse hier instrumentalisieren, um der Erschöpfung der CAR-T-Zellen mittels Nivolumab vermittelter PD-1-Blockade entgegen zu wirken. Im Einklang mit früheren Publikationen beobachteten wir ebenfalls eine höhere PD-1-Expression in CAR-T-Zellen mit CD28 als kostimulatorischen Domäne. Jedoch stellen unsere Daten ein einfaches Verständnis des Zusammenspiels zwischen der kostimulatorischen Domäne und der PD-1/PD-L1-Signalachse in Frage. Neben der reinen Höhe der Expression der PD-1/PD-L1-Achse, die durch die kostimulatorische Domäne beeinflusst wird, spielten andere Faktoren, wie die Erschöpfung der zytotoxischen Aktivität der CAR-T-Zellen, eine Rolle.

Zusammenfassend hatte die Ausgangsfraction für die CAR-T-Zellgenerierung und in geringerem Maße die kostimulatorische Domäne einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die PD-1/PD-L1-Expression der L1CAM-CAR-T-Zellen, die in unseren Versuchen wiederum Bedingung für das Ansprechen auf Nivolumab und somit den Erfolg der PD-1 Blockade war.<sup>32</sup> In unseren *in vitro* Versuchen profitierten insbesondere CAR-T-Zellen, die aus zentralen Gedächtnis-T-Zellen generiert wurden, von einer Kombinationstherapie mit PD-1-*Checkpoint*-Inhibitoren. Die Auswahl der T-Zell-Fraktion und ein vorheriges Screening der PD-1/PD-L1-Expression generierter CAR-T-Zellen könnte die Effektivität der CAR-T-Zelltherapie durch eine fundierte Kombinationstherapie verbessern, indem nur bei CAR-T-Zellen, die höhere PD-1/PD-L1-Spiegel bereits nach Expansion oder erst im Rahmen eines *in vitro* Stresstest exprimieren, additiv Nivolumab gegeben wird.

#### 5.4 Limitationen

Erwähnt werden muss, dass alle Ergebnisse dieser Arbeit durch *in vitro* Ko-Kulturmodelle erhoben wurden.<sup>32</sup> Zwar ermöglichte der durchgeführte Stresstest mit rekursiver Tumorzellkonfrontation eine Annäherung an die Herausforderungen der CAR-T-Zellen in soliden Tumoren, doch sind *in vivo* Versuche notwendig, um den Einfluss der zur CAR-T-Zellgenerierung verwendeten T-Zell-Fraktion und der kostimulatorischen Domäne der CARs auf die PD-1/PD-L1-Achse innerhalb des realen immunsuppressiven Mikromilieus solider Tumore zu bestätigen. Nichtsdestotrotz können *in vitro* Ko-Kulturmodelle vorab eine erste Einschätzung zulassen, ob sich die PD-1/PD-L1-Achse zur Effektivitätssteigerung generierter CAR-T-Zellen eignen könnte und mit steigender Belastung der CAR-T-Zellen innerhalb des immunsuppressiven Mikromilieus ist hier ein größerer Nutzen einer zusätzlichen PD-1-*Checkpoint*-Inhibition denkbar. Insbesondere auch im Hinblick hier nicht untersuchter Einflussfaktoren der CAR-Konstrukte selbst wie etwa weitere kostimulatorische Domänen oder eine unterschiedliche Länge der Abstandssequenz, könnte ein *in vitro* Screening hilfreich sein. Weiterhin konnten wir den Einfluss der zur CAR-Zellgenerierung verwendeten T-Zell-Fraktion und der kostimulatorischen Domäne der CARs auf die PD-1/PD-L1-Achse für die Ko-Kultur mit verschiedenen Neuroblastomzelllinien bestätigen,<sup>32</sup> jedoch wären auch hier weitere Versuche mit anderen CARs und Tumorentitäten sinnvoll. Da sich das von unserer CAR-scFv adressierte Tumor-assoziierte Antigen L1CAM auch bei einer Vielzahl andere

solider Tumore wie Ovarial-, Pankreas- oder Kolorektalem Karzinom findet, sind unsere Erkenntnisse über die Therapie des refraktären Neuroblastoms oder dessen Rezidiv relevant.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16078.
2. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res* 2018;372:195-209.
3. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 2017;168:724-40.
4. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018;359:1361-5.
5. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.
6. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015;75:2139-45.
7. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, Wunderlich JR, Mixon A, Farid S, Dudley ME, Hanada K, Almeida JR, Darko S, Douek DC, Yang JC, Rosenberg SA. PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup> tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 2014;124:2246-59.
8. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127ra37.
9. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthy S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455-65.
10. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, Albright A, Cheng JD, Kang SP, Shankaran V, Piha-Paul SA, Yearley J, Seiwert TY, Ribas A, McClanahan TK. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 2017;127:2930-40.
11. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:1509-18.
12. Newick K, Moon E, Albelda SM. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16006.
13. Abate-Daga D, Hanada K, Davis JL, Yang JC, Rosenberg SA, Morgan RA. Expression profiling of TCR-engineered T cells demonstrates overexpression of multiple inhibitory receptors in persisting lymphocytes. *Blood* 2013;122:1399-410.
14. Moon EK, Wang LC, Dolfi DV, Wilson CB, Ranganathan R, Sun J, Kapoor V, Scholler J, Puré E, Milone MC, June CH, Riley JL, Wherry EJ, Albelda SM. Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20:4262-73.
15. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, Sadelain M, Adusumilli PS. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest* 2016;126:3130-44.
16. John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, Chow MT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the

eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res* 2013;19:5636-46.

17. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Düwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfußer S. Impact of a New Fusion Receptor on PD-1-Mediated Immunosuppression in Adoptive T Cell Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2015;107.

18. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, Newick K, Lo A, June CH, Zhao Y, Moon EK. A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors. *Cancer Res* 2016;76:1578-90.

19. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res* 2016.

20. Grosser R, Cherkassky L, Chintala N, Adusumilli PS. Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors. *Cancer Cell* 2019;36:471-82.

21. Miao L, Zhang Z, Ren Z, Tang F, Li Y. Obstacles and Coping Strategies of CAR-T Cell Immunotherapy in Solid Tumors. *Front Immunol* 2021;12:687822.

22. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008;14:1264-70.

23. Künkele A, Taraseviciute A, Finn LS, Johnson AJ, Berger C, Finney O, Chang CA, Rolczynski LS, Brown C, Mgebroff S, Berger M, Park JR, Jensen MC. Preclinical Assessment of CD171-Directed CAR T-cell Adoptive Therapy for Childhood Neuroblastoma: CE7 Epitope Target Safety and Product Manufacturing Feasibility. *Clin Cancer Res* 2017;23:466-77.

24. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, Liu H, Wu MF, Mei Z, Gee A, Mehta B, Zhang H, Mahmood N, Tashiro H, Heslop HE, Dotti G, Rooney CM, Brenner MK. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther* 2017;25:2214-24.

25. Trujillo JA, Sweis RF, Bao R, Luke JJ. T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer Immunol Res* 2018;6:990-1000.

26. Dondero A, Pastorino F, Della Chiesa M, Corrias MV, Morandi F, Pistoia V, Olive D, Bellora F, Locatelli F, Castellano A, Moretta L, Moretta A, Bottino C, Castriconi R. PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. *Oncoimmunology* 2016;5:e1064578.

27. Richards RM, Sotillo E, Majzner RG. CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol* 2018;9:2380.

28. Du H, Hirabayashi K, Ahn S, Kren NP, Montgomery SA, Wang X, Tiruthani K, Mirlekar B, Michaud D, Greene K, Herrera SG, Xu Y, Sun C, Chen Y, Ma X, Ferrone CR, Pylayeva-Gupta Y, Yeh JJ, Liu R, Savoldo B, Ferrone S, Dotti G. Antitumor Responses in the Absence of Toxicity in Solid Tumors by Targeting B7-H3 via Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Cell* 2019;35:221-37.e8.

29. Zolov SN, Rietberg SP, Bonifant CL. Programmed cell death protein 1 activation preferentially inhibits CD28.CAR-T cells. *Cytotherapy* 2018;20:1259-66.

30. Ausubel LJ, Hall C, Sharma A, Shakeley R, Lopez P, Quezada V, Couture S, Laderman K, McMahan R, Huang P, Hsu D, Couture L. Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors. *Bioprocess Int* 2012;10:32-43.

31. Künkele A, Johnson AJ, Rolczynski LS, Chang CA, Høglund V, Kelly-Spratt KS, Jensen MC. Functional Tuning of CARs Reveals Signaling Threshold above Which CD8+ CTL Antitumor Potency Is Attenuated due to Cell Fas-FasL-Dependent AICD. *Cancer Immunol Res* 2015;3:368-79.
32. Toews K, Grunewald L, Schwiebert S, Klaus A, Winkler A, Ali S, Zirngibl F, Astrahantseff K, Wagner DL, Henssen AG, Deubzer HE, Schulte JH, Ochsenreither S, Eggert A, Künkele A. Central memory phenotype drives success of checkpoint inhibition in combination with CAR T cells. *Mol Carcinog* 2020;59:724-35.
33. Wang X, Naranjo A, Brown CE, Bautista C, Wong CW, Chang WC, Aguilar B, Ostberg JR, Riddell SR, Forman SJ, Jensen MC. Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8+ central memory T cells manufactured at clinical scale. *J Immunother* 2012;35:689-701.
34. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157:1262-78.
35. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8:2281-308.
36. Shum T, Omer B, Tashiro H, Kruse RL, Wagner DL, Parikh K, Yi Z, Sauer T, Liu D, Parihar R, Castillo P, Liu H, Brenner MK, Metelitsa LS, Gottschalk S, Rooney CM. Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells. *Cancer Discov* 2017;7:1238-47.
37. Berger C, Jensen MC, Lansdorf PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 2008;118:294-305.
38. Wang X, Berger C, Wong CW, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood* 2011;117:1888-98.
39. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature* 2017;545:423-31.
40. Straathof K, Flutter B, Wallace R, Jain N, Loka T, Depan S, Wright G, Thomas S, Cheung GW, Gileadi T, Stafford S, Kokalaki E, Barton J, Marriott C, Rampling D, Ogunbiyi O, Akarca AU, Marafioti T, Inglott S, Gilmour K, Al-Hajj M, Day W, McHugh K, Biassoni L, Sizer N, Barton C, Edwards D, Dragoni I, Silvester J, Dyer K, Traub S, Elson L, Brook S, Westwood N, Robson L, Bedi A, Howe K, Barry A, Duncan C, Barone G, Pule M, Anderson J. Antitumor activity without on-target off-tumor toxicity of GD2-chimeric antigen receptor T cells in patients with neuroblastoma. *Sci Transl Med* 2020;12.
41. Aoki T, Hino M, Koh K, Kyushiki M, Kishimoto H, Arakawa Y, Hanada R, Kawashima H, Kurihara J, Shimojo N, Motohashi S. Low Frequency of Programmed Death Ligand 1 Expression in Pediatric Cancers. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63:1461-4.
42. Majzner RG, Simon JS, Grosso JF, Martinez D, Pawel BR, Santi M, Merchant MS, Georger B, Hezam I, Marty V, Vielh P, Daugaard M, Sorensen PH, Mackall CL, Maris JM. Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues. *Cancer* 2017.
43. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568-71.
44. Gargett T, Yu W, Dotti G, Yvon ES, Christo SN, Hayball JD, Lewis ID, Brenner MK, Brown MP. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following

Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. *Mol Ther* 2016;24:1135-49.

45. Serganova I, Moroz E, Cohen I, Moroz M, Mane M, Zurita J, Shenker L, Ponomarev V, Blasberg R. Enhancement of PSMA-Directed CAR Adoptive Immunotherapy by PD-1/PD-L1 Blockade. *Mol Ther Oncolytics* 2017;4:41-54.

46. Chen Y, Sun C, Landoni E, Metelitsa L, Dotti G, Savoldo B. Eradication of Neuroblastoma by T Cells Redirected with an Optimized GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and Interleukin-15. *Clin Cancer Res* 2019;25:2915-24.

47. Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, Arthur CD, Lee SH, Hundal J, Selby MJ, Graziano RF, Mardis ER, Korman AJ, Schreiber RD. Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res* 2017;5:106-17.

48. Lau J, Cheung J, Navarro A, Lianoglou S, Haley B, Totpal K, Sanders L, Koeppen H, Caplazi P, McBride J, Chiu H, Hong R, Grogan J, Javinal V, Yauch R, Irving B, Belvin M, Mellman I, Kim JM, Schmidt M. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun* 2017;8:14572.

49. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrinn A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-7.

50. Yi M, Niu M, Xu L, Luo S, Wu K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol* 2021;14:10.

51. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, Mikse OR, Cherniack AD, Beauchamp EM, Pugh TJ, Wilkerson MD, Fecci PE, Butaney M, Reibel JB, Soucheray M, Cohoon TJ, Janne PA, Meyerson M, Hayes DN, Shapiro GI, Shimamura T, Sholl LM, Rodig SJ, Freeman GJ, Hammerman PS, Dranoff G, Wong KK. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013;3:1355-63.

52. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, Huynh TG, Zhao L, Fulton L, Schultz KR, Howe E, Farago AF, Sullivan RJ, Stone JR, Digumarthy S, Moran T, Hata AN, Yagi Y, Yeap BY, Engelman JA, Mino-Kenudson M. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res* 2016;22:4585-93.

53. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gutgemann I, Eilers M, Felsher DW. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* 2016;352:227-31.

54. Layer JP, Kronmuller MT, Quast T, van den Boorn-Konijnenberg D, Effern M, Hinze D, Althoff K, Schramm A, Westermann F, Peifer M, Hartmann G, Tuting T, Kolanus W, Fischer M, Schulte J, Holzel M. Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *Oncoimmunology* 2017;6:e1320626.

55. Han H, Jain AD, Truica MI, Izquierdo-Ferrer J, Anker JF, Lysy B, Sagar V, Luan Y, Chalmers ZR, Unno K, Mok H, Vatapalli R, Yoo YA, Rodriguez Y, Kandela I, Parker JB, Chakravarti D, Mishra RK, Schiltz GE, Abdulkadir SA. Small-Molecule MYC Inhibitors Suppress Tumor Growth and Enhance Immunotherapy. *Cancer Cell* 2019;36:483-97 e15.

56. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, Fauci AS. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 2008;181:6738-46.

57. Hakim MS, Jariah ROA, Spaan M, Boonstra A. Interleukin 15 upregulates the expression of PD-1 and TIM-3 on CD4(+) and CD8(+) T cells. *Am J Clin Exp Immunol* 2020;9:10-21.
58. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell SR. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 2016;30:492-500.
59. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martínez-Cano S, Mejías-Pérez E, Esteban M, Melero I, Hidalgo A, Sancho D. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8. *Nat Commun* 2017;8:16073.
60. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, Sasmal DK, Huang J, Kim JM, Mellman I, Vale RD. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 2017;355:1428-33.
61. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, Konieczny BT, Daugherty CZ, Koenig L, Yu K, Sica GL, Sharpe AH, Freeman GJ, Blazar BR, Turka LA, Owonikoko TK, Pillai RN, Ramalingam SS, Araki K, Ahmed R. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 2017;355:1423-7.
62. Mizuno R, Sugiura D, Shimizu K, Maruhashi T, Watada M, Okazaki IM, Okazaki T. PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation. *Front Immunol* 2019;10:630.

## 7 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Karin Töws, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation des Einflusses der PD-1-Inhibition auf die Effektivität der CAR-T-Zelltherapie im Neuroblastom“; „Evaluation the Influence of PD-1-Inhibition on CAR T Cell Therapy Efficacy in Neuroblastoma“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 7.2 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Karin Töws hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: **Toews K**, Grunewald L, Schwiebert S, Klaus A, Winkler A, Ali S, Zirngibl F, Astrahantseff K, Wagner DL, Henssen AG, Deubzer HE, Schulte JH, Ochsenreither S, Eggert A, Künkele A. *Central memory phenotype drives success of checkpoint inhibition in combination with CAR T cells*. Mol Carcinog. 2020 Jul;59(7):724–735.

Die vorliegende Arbeit entstand im international hochkompetitiven Forschungsfeld der Onkologie und wurde bei *Molecular Carcinogenesis* des angesehenen Wiley Verlags publiziert. Die Arbeit verlangte die Etablierung, Durchführung und Auswertung vielfältiger und komplexer Experimente. Unter Betreuung der Letztautorin Annette Künkele hat die Erstautorin entscheidend an der Gewinnung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse beigetragen. Die nachfolgende Anteilserklärung stellt die Schwerpunkte der Erstautorin Karin Töws detailliert dar. Sie enthält keine Aussagen zu den spezifischen Beiträgen der anderen Autoren.

Beitrag im Einzelnen:

Die Schwerpunkte der Arbeit von Karin Töws liegen vor allem in der Etablierung und Durchführung der funktionalen Assays, sowie deren Auswertungen. Auf CAR-Konstrukte und Lentiviren konnte innerhalb der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. CAR-T-Zell-Sets wurden etwa zu gleichen Teilen selbständig transduziert oder lagen bereits vor Antritt der Promotionsarbeit vor. CRISPR/ Cas9 gRNAs und Vektoren wurden innerhalb der Arbeitsgruppe generiert, die Etablierung dieser und die Generierung der *knock-out* Neuroblastomzelllinien erfolgte durch Karin Töws. Anschließend funktionale Assays wurden von Karin Töws ausgeführt. Die Auswertungen wurden von Karin Töws für alle Experimente vorgenommen.

*Konzept:*

- Beteiligung an der konzeptionellen Planung

*Experimente:*

- *CAR-T-Zellgenerierung:* Transduktion und Selektion noch nicht bestehender CAR-

T-Zell-Sets (ca. 50%)

- *Neuroblastomzelllinien-Modelle*: Transfektion mit CRISPR/ Cas9 gRNAs bzw. Transduktion mit dem Vektor PDL1-T2A-CD19t\_epHIV7.2
- *In vitro Experimente und funktionale Assays mit CAR-T-Zellen und verschiedenen Neuroblastomzelllinien*: Planung und Ausführung (ELISA, Luciferase-basierte Reporter-gen-Assays, Apoptose-Assays, Durchflusszytometrische Färbungen und Analysen)
- *Durchflusszytometrie*: Bearbeitung der Proben und durchflusszytometrische Analysen mit z.T. etablierten oder selbständig weiterentwickelten Panels

*Auswertungen, statistische Bearbeitung, graphische Darstellung:*

- Auswertung sämtlicher verwendeter experimenteller Rohdaten
- Ausführung der statistischen Auswertung
- Erstentwurf und Erstellung der Endversion der graphischen Darstellungen

*Text:*

- Struktur und Erstentwurf des Manuskripts und Mitarbeit bei dessen Überarbeitung
- Bearbeitung und Fertigstellung der Revision

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 8 Auszug aus der *Journal Summary List – Oncology*

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
Selected Categories: **“ONCOLOGY”** Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 229 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	32,410	223.679	0.077370
2	NATURE REVIEWS CANCER	50,529	51.848	0.074080
3	LANCET ONCOLOGY	48,822	35.386	0.146770
4	Nature Reviews Clinical Oncology	9,626	34.106	0.031890
5	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	154,029	28.245	0.281750
6	Cancer Discovery	13,715	26.370	0.064810
7	CANCER CELL	36,056	23.916	0.091050
8	JAMA Oncology	9,488	22.416	0.048340
9	ANNALS OF ONCOLOGY	40,751	14.196	0.103620
10	Journal of Thoracic Oncology	16,601	12.460	0.038810
11	Molecular Cancer	11,626	10.679	0.021350
12	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	36,790	10.211	0.051650
13	NEURO-ONCOLOGY	11,858	10.091	0.029150
14	LEUKEMIA	24,555	9.944	0.054750
15	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	6,992	9.658	0.010730
16	CLINICAL CANCER RESEARCH	78,171	8.911	0.134870
17	Trends in Cancer	1,420	8.884	0.006040
18	Journal of Hematology & Oncology	5,366	8.731	0.013620
19	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	2,716	8.676	0.011350
20	Cancer Immunology Research	5,420	8.619	0.025380
21	CANCER RESEARCH	130,932	8.378	0.123870

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	CANCER TREATMENT REVIEWS	8,419	8.332	0.016930
23	Blood Cancer Journal	2,247	7.895	0.009060
24	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	5,746	7.570	0.019940
25	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,226	6.887	0.008260
26	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	30,731	6.680	0.055220
27	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	6,011	6.667	0.006220
28	ONCOGENE	63,249	6.634	0.074600
29	CANCER LETTERS	30,146	6.508	0.043780
30	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	45,833	6.203	0.046810
31	Cancers	5,196	6.162	0.011780
32	CANCER	67,408	6.102	0.071820
33	Oncogenesis	2,016	5.995	0.006360
34	Molecular Oncology	5,016	5.962	0.013590
35	Liver Cancer	769	5.944	0.002210
36	JOURNAL OF PATHOLOGY	15,994	5.942	0.021030
37	Molecular Therapy-Oncolytics	486	5.710	0.001990
38	BREAST CANCER RESEARCH	10,943	5.676	0.017310
39	Therapeutic Advances in Medical Oncology	1,377	5.670	0.003110
40	JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH	6,309	5.646	0.010260
41	STEM CELLS	21,467	5.614	0.030220
42	Gastric Cancer	4,454	5.554	0.008650
43	Clinical Epigenetics	2,900	5.496	0.009690

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
44	BRITISH JOURNAL OF CANCER	45,886	5.416	0.062950
45	OncolImmunology	7,790	5.333	0.025470
46	ONCOLOGIST	11,831	5.252	0.021610
46	RADIOTHERAPY AND ONCOLOGY	17,873	5.252	0.027470
48	CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION	19,542	5.057	0.031380
49	CELLULAR ONCOLOGY	1,382	5.020	0.001960
50	CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY HEMATOLOGY	7,401	5.012	0.012890
51	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	50,955	4.982	0.072280
52	BIODRUGS	1,685	4.903	0.003370
53	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	7,779	4.900	0.012870
54	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	18,062	4.856	0.029010
55	Translational Lung Cancer Research	1,542	4.806	0.005080
56	ENDOCRINE-RELATED CANCER	6,958	4.774	0.012150
57	CANCER SCIENCE	12,382	4.751	0.016610
58	American Journal of Cancer Research	4,359	4.737	0.010100
59	CANCER GENE THERAPY	2,842	4.681	0.003200
60	BONE MARROW TRANSPLANTATION	12,031	4.674	0.020710
61	Advances in Cancer Research	2,355	4.667	0.003750
62	ONCOLOGY RESEARCH	2,368	4.634	0.003170
63	PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASES	2,144	4.600	0.005380
64	LUNG CANCER	11,738	4.599	0.020200
65	MOLECULAR CANCER RESEARCH	7,899	4.484	0.013800

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
66	Cancer Biology & Medicine	1,043	4.467	0.003040
67	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,863	4.425	0.005460
68	GYNECOLOGIC ONCOLOGY	22,766	4.393	0.032090
69	Pigment Cell & Melanoma Research	4,249	4.172	0.006340
70	Frontiers in Oncology	8,031	4.137	0.025730
71	Clinical Lung Cancer	2,655	4.117	0.005970
72	CARCINOGENESIS	19,651	4.004	0.017920
73	Current Oncology Reports	1,961	3.949	0.004260
74	Cancer Prevention Research	5,130	3.866	0.009020
75	CURRENT TREATMENT OPTIONS IN ONCOLOGY	1,406	3.851	0.003650
76	NEOPLASIA	6,599	3.837	0.007700
77	ORAL ONCOLOGY	9,033	3.730	0.013340
78	CURRENT PROBLEMS IN CANCER	525	3.698	0.000880
79	Annals of Translational Medicine	3,430	3.689	0.010900
80	Targeted Oncology	1,135	3.683	0.002830
81	ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY	28,017	3.681	0.050930
82	Chinese Journal of Cancer	2,222	3.620	0.003930
83	SEMINARS IN ONCOLOGY	4,987	3.606	0.006590
84	INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTHERMIA	3,552	3.589	0.004020
85	Journal of Cancer Survivorship	2,658	3.585	0.008310
86	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY	15,977	3.571	0.021770

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
87	JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART C-ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS & ECOTOXICOLOGY REVIEWS	994	3.517	0.000780
88	Brain Tumor Pathology	739	3.509	0.001470
89	BREAST	4,845	3.494	0.011240
90	BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT	20,102	3.471	0.032350
91	JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY	3,142	3.455	0.004000
92	Cancer Cell International	2,825	3.439	0.005500
92	HEMATOLOGICAL ONCOLOGY	1,224	3.439	0.003850
94	PSYCHO-ONCOLOGY	11,194	3.430	0.020160
95	MOLECULAR CARCINOGENESIS	5,257	3.411	0.008000
96	EJSO	8,540	3.379	0.016660
97	Cancer Research and Treatment	2,241	3.363	0.005550
98	Cancer Medicine	4,337	3.357	0.014330
99	JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY	7,358	3.332	0.011130
100	EXPERIMENTAL CELL RESEARCH	19,656	3.329	0.019220
101	ACTA ONCOLOGICA	7,632	3.298	0.014940
102	American Journal of Translational Research	5,434	3.266	0.012240
103	CURRENT OPINION IN ONCOLOGY	2,721	3.261	0.005220
104	MEDICAL ONCOLOGY	6,653	3.252	0.011800
105	Journal of Cancer	3,923	3.182	0.009360
106	Clinical Colorectal Cancer	1,508	3.176	0.003400
107	Journal of Geriatric Oncology	1,068	3.164	0.004200

## 9 Druckexemplar der Originalpublikation

(aus Urheberrechtlichen Gründen herausgenommen)

Toews K, Grunewald L, Schwiebert S, Klaus A, Winkler A, Ali S, Zirngibl F, Astrahantseff K, Wagner DL, Henssen AG, Deubzer HE, Schulte JH, Ochsenreither S, Eggert A, Kunkle A. Central memory phenotype drives success of checkpoint inhibition in combination with CAR T cells. *Mol Carcinog* 2020;59:724-35.

DOI-Verlinkung: <https://doi.org/10.1002/mc.23202>























## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht



## 11 Vollständige Publikationsliste

**Toews K**, Grunewald L, Schwiebert S, Klaus A, Winkler A, Ali S, Zirngibl F, Astrahantseff K, Wagner DL, Henssen AG, Deubzer HE, Schulte JH, Ochsenreither S, Eggert A, Künkele A. *Central memory phenotype drives success of checkpoint inhibition in combination with CAR T cells*. Mol Carcinog. 2020 Jul;59(7):724–735.

Ali S, **Toews K**, Schwiebert S, Klaus A, Winkler A, Grunewald L, Oevermann L, Deubzer HE, Tüns A, Jensen MC, Henssen AG, Eggert A, Schulte JH, Schwich E, Rebmann V, Schramm A, Künkele A. *Tumor-Derived Extracellular Vesicles Impair CD171-Specific CD4+ CAR T Cell Efficacy*. Front Immunol. 2020; 11:531.

**Toews K**, Klaus A, Schwiebert S, Winkler A, Schulte JH, Jensen MC, Eggert A, Künkele A. *PD-L1 expression in donor CAR T cells predicts the benefit from co-treatment with nivolumab*. Poster präsentiert auf der *Advances in Neuroblastoma Research (ANR) Conference*, 9.-12. Mai 2018, San Francisco, USA.

Kaebisch E, Fuss TL, Vandergrift LA, **Toews K**, Habel P, Cheng LL. Applications of high-resolution magic angle spinning MRS in biomedical studies I - cell line and animal models. NMR Biomed, 2017; 30(6).

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation und während dieser Zeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Eggert danken, als Teil ihrer großen Arbeitsgruppe, die Möglichkeit bekommen zu haben im Feld der pädiatrischen Onkologie forschen zu können sowie für ihre stets gegenwärtige Unterstützung und Expertise.

Besonders möchte ich PD Dr. Annette Künkele danken, die mich nicht nur mit ihrer Freude für ihr eigenes Forschungsfeld für dieses und die Forschung selbst begeistert hat, sondern auf deren Unterstützung durch Ratschläge, hilfreiche Anregungen und wissenschaftlichen Austausch ich immer zählen konnte. Auch der Rat und die Unterstützung bei weitergehenden Fragen zu anstehenden persönlichen Entscheidungen und Zielen machten ihre Betreuung zu weitaus mehr als das.

Für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden und ihre Hilfestellungen, möchte ich besonders Silke Schwiebert, Anika Klaus, Annika Winkler und Laura Grunewald sehr herzlich danken. Ihre Hilfsbereitschaft und auch die der immer wachsender AG Künkele machte meine Arbeit erst möglich und das stets sehr nette Arbeitsklima machte es zu einer besonderen Zeit.

Danken möchte ich zudem dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung für die Unterstützung in Form eines Stipendiums, welches mir ermöglichte, mich voll und ganz der Forschung zu widmen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und Freunden bedanken, die mir während meiner Arbeit eine große Stütze waren.