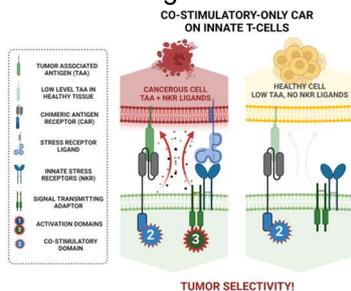


# Induzierte angeborene CD8+T-Zellen (BKO, BCKO), die eine neue Klasse von chimären Anti-GD2-Antigenrezeptoren für die Neuroblastom-therapie exprimieren

Bjoern N. Lode<sup>1,2</sup>, Piotr Grabarczyk<sup>1</sup>, Sascha Troschke-Meurer<sup>2</sup>, Hannes Forkel<sup>1</sup>, Maren Depke<sup>1</sup>, Maxi Zumpe<sup>2</sup>, Nikolai Siebert<sup>2</sup>, Christian A. Schmidt<sup>1</sup>, Holger N. Lode<sup>2</sup>

## Hintergrund

- Angeborene Effektorzellen sind essenziell für die Immuntherapie des Neuroblastoms (NK-Zellen)
- Deletion von BCL11B (B-ko) und in Kombination mit CISH (BC-ko) in CD8+ T Zellen führt zu angeborenen Eigenschaften und wirksamen Abtöten von therapieresistenten Neuroblastomzellen in vitro (1)
- CARs, die nur eine kostimulatorische Domäne (co-CAR) tragen, könnten in Kombination mit angeborenen Stressrezeptoren eine höhere Spezifität aufweisen und toxische Nebenwirkungen in vivo verringern
- Hier evaluieren wir die Verwendung von BC-ko Zellen, welche CAR-Konstrukte exprimieren, denen die stimulierende CD3-zeta-Domäne fehlt und ermitteln die Selektivität dieser neuartigen Zellen

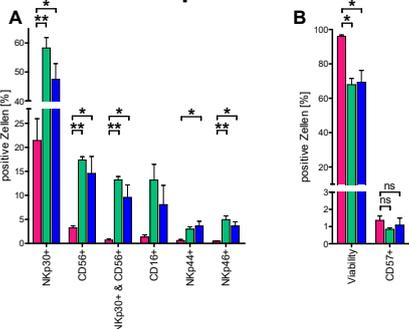


## Methoden

- BCL11B oder in Kombination mit CISH wurde in CD8+ T-Zellen mit CRISPR/Cas9 entfernt, gefolgt von einer Kultivierung unter Einfluss von IL-7 und IL-15
- Die Rezeptoren wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen, und die Funktion wurde mit Hilfe eines CD107a/IFN- $\gamma$  Assays bestimmt.
- Co-CAR-Konstrukte wurden mithilfe der GD2-spezifischen variablen Domäne von ch14.18 in Verbindung mit den kostimulatorischen Domänen CD28, OX40, 41BB, DAP10 und DAP12 hergestellt
- Ein konventionelles CAR der 4. Generation mit 41BB wurde als Kontrolle verwendet
- Zytotoxizitätstests wurden mit GD2-positiven Neuroblastomzellen (LAN-1, CHLA-136) durchgeführt, die Nahinfrarotprotein (iRFP) exprimieren, um die Viabilität der Zellen zu analysieren (IncuCyte®)
- Die Selektivität gegenüber Tumorzellen wurde durch Deletion des B7H6-Stress-Liganden in der CHLA-136 Zelllinie mittels CRISPR/Cas9 nachgewiesen

## Ergebnisse

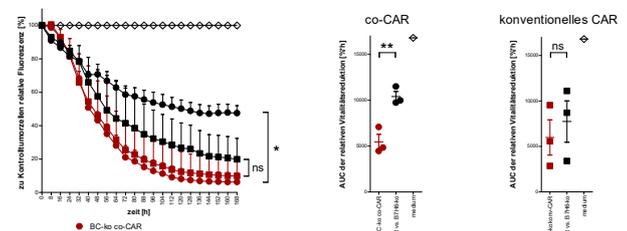
### T-Zellen exprimieren NK-Zell spezifische Stressrezeptoren nach Deletion von BCL11B



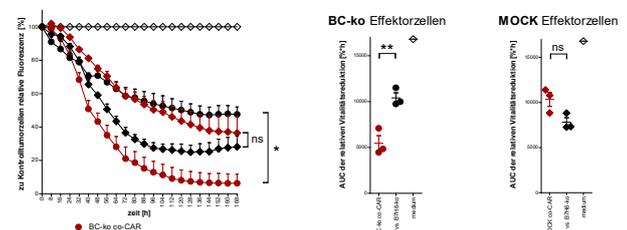
**Abb1.** Umprogrammierung des Zellphänotyps nach Knock-out und zweiwöchiger In-vitro-Expansion mit IL-7 und IL-15. (A) Expression von aktivierenden angeborenen Rezeptoren und Oberflächenmarkern und (B) Vitalität und Erschöpfung für jede Effektorzelle dargestellt als Prozentsatz der positiven Zellen. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3. MOCK: mock gRNA transizierte Kontrolle, B-ko: BCL11B Knock-out, BC-ko: kombinierter BCL11B und CISH Knock-out. Die statistische Signifikanz wurde anhand eines One-way-ANOVA mit Korrektur durch Tukey's multiplen Vergleichstest berechnet. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01.

### BC-ko Zellen mit co-CARs zeigen eine starke Selektivität gegen Neuroblastome mit Stress-Liganden

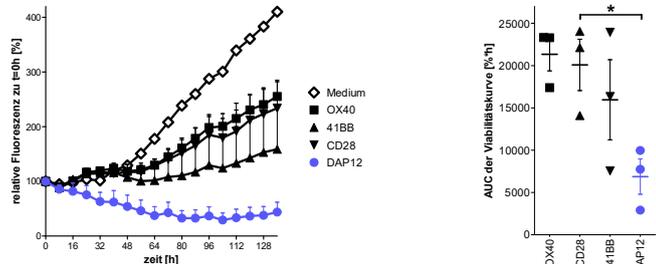
Selektivität des co-CAR vs. konventionelles CAR



Selektivität des co-CAR auf BC-ko Effektorzellen vs. auf MOCK Effektorzellen



### DAP12 co-CAR zeigt die höchste kostimulatorische Aktivität

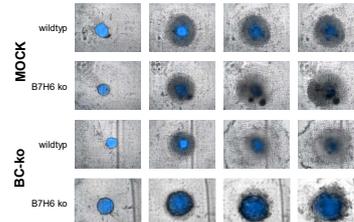


**Abb2.** Zytotoxische Aktivität von Anti-GD2-spezifischen kostimulatorischen CAR-Konstrukten, die entweder die kostimulatorische OX40-, 41BB-, CD28- oder DAP12-Domäne enthalten exprimiert von BCL11B Knock-out CD8+ T Zellen, gegen die Neuroblastom-Tumorzelllinie CHLA-136. Die linke Seite zeigt die Vitalität der Tumorzelllinie im Zeitverlauf, während die rechte Seite die entsprechende Fläche unter der Kurve (AUC) der linken Seite zeigt. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3. Medium: CHLA-136-Tumorzellen ohne Effektorzellen. Die statistische Signifikanz wurde durch einen One-way-ANOVA mit Dunnett's multiplen Vergleichstest berechnet. \*P  $\leq$  0,05.

## Schlussfolgerung

Die BC-ko Zellen, die das neuartige DAP12 co-CAR exprimieren, versprechen eine überlegene Selektivität gegen GD2- und Stressligand-positive Tumorzellen und könnten somit die Nebenwirkungen in vivo verringern.

**Abb3.** Zytotoxische Aktivität von Anti-GD2-spezifischen *costimulatory-only* (co-CAR) oder konventionellen CAR-Konstrukten der 4. Generation, exprimiert durch MOCK- oder kombinierte BCL11B und CISH Knock-out CD8+ T Zellen gegen CHLA-136-Wildtyp oder B7H6 Knock-out Neuroblastom Tumorzelllinien. Die linke Seite zeigt die relative Verringerung der Viabilität der Tumorzelllinien durch verschiedene Effektorzellen im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle von Tumorzellen ohne Effektorzellen über die Zeit. Die rechte Seite zeigt die entsprechende Fläche unter der Kurve von der linken Seite. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3. B7H6-ko: CHLA-136 mit B7H6 Knock-out. Die statistische Signifikanz wurde für die Vitalitäts Kurven durch einen One-way-ANOVA mit Tukey's multipler Vergleichstest-Korrektur und für die AUC-Werte durch einen ungepaarten t-Test berechnet. \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01.



**Abb4.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHLA-136 wildtyp- oder B7H6 Knock-out Tumorsphäroiden zu ausgewählten Zeitpunkten in Co-Kultur mit co-CAR-tragenden MOCK oder BC-ko Effektorzellen von einem repräsentativen Spender. Wildtyp: CHLA-136, B7H6-ko: CHLA-136 mit B7H6 Knock-out.