

Aus dem Institut für Translationale Epigenetik  
der Universität zu Köln  
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Dr. med. Michal-Ruth Schweiger

# **Transkriptionelle Plastizität als Resistenzmechanismus der B-ALL gegen CD19 CAR T Zellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Nam Gyu Im  
aus Köln

promoviert am 12. Juni 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. M. R. Schweiger
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. D. Eichenauer
3. Gutachter: Professor Dr. med. H. Abken

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Prof. Dr. Dr. Michal-Ruth Schweiger

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Das Design des *in-house* produzierten chimären Antigen Rezeptors stammt von Prof. Dr. Dr. Jens Lohr, Prof. Dr. Dr. Birgit Knoechel und Dr. Megha Wal (Supplementary Fig. S1a). Die Produktion von Lentiviren und CAR T Zellen wurde von Frau Dr. Amy Guillaumet-Adkins zusammen mit Laborassistentin Anna Rogers und Laborassistent Jordan Voisine in der Arbeitsgruppe etabliert. Nach entsprechender Anleitung in die Methodik wurden die für diese Arbeit verwendeten Lentiviren und CAR T Zellen von mir produziert (Supplementary Fig. S1b).

Die Kokulturrexperimente, die mit den Tumorzelllinien KOPN8 und REH durchgeführt wurden (Supplementary Fig. S3), wurden von Frau Dr. Amy Guillaumet-Adkins durchgeführt.

Die Kokulturrexperimente zur Dektektion von intrazellulärem CD19, deren Daten in Supplementary Fig. S4 dargestellt sind, wurden von Frau Dr. Jing Yang und Laborassistentin Claire Havig mit Vorarbeit durch Laborassistentin Leili Niu durchgeführt.

In die Methodik der Inhibitor-Titration wurde ich von Dr. Johannes Waldschmidt eingearbeitet. Die Titration von Ibrutinib, sowie die Inhibitor-Zytotoxizitätsexperimente in Figure 4D und Supplementary Figure S11 wurden von mir durchgeführt. Die Inhibitor-Zytotoxizitätsexperimente wurden von Frau Dr. Amy Guillaumet-Adkins in eigenen Replikaten validiert.

Alle weiteren Kokulturrexperimente wurden von mir selbstständig geplant, entwickelt und durchgeführt. Dies beinhaltet die dargestellten Kokulturrexperimente in Figure 1B-G und Supplementary Fig. S2, S5, S9, die Experimente zur Untersuchung von intrazellulärem CD19 in Figure 2C und die Trans-Well Experimente in Figure 2E. Die Daten der oben genannten Experimente wurden von mir mit der Software FlowJo V10 und GraphPad Prism 9 ausgewertet und graphisch dargestellt.

Der Aufbau und die Etablierung des dreidimensionalen Mikroskops geschah durch Prof. Dr. Clemens Grassberger und Laborassistentin Anna Rogers. Die dreidimensionalen Zeitraffer Mikroskopierexperimente wurden von mir nach Einweisung in das Mikroskop durch Laborassistentin Anna Rogers durchgeführt. Die Aufnahmen wurden von mir mit der Auswertungssoftware STEVE v1.6.3496 prozessiert (Figure 1A).

In den Umgang und die Benutzung der Fluoreszenzmikroskope wurde ich von Dr. Julia Frede eingewiesen. Die Fluoreszenzmikroskopie-Experimente an lebenden Zellen wurden von mir geplant, entwickelt, durchgeführt und analysiert. Die Auswertung der Aufnahmen habe ich mit der Bildauswertungssoftware ImageJ 1.52p durchgeführt (Figure 2A-B, 2D, Supplementary Fig. S6). Die Auswertung der Einzelzell-Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen wurde durch Frau Sarah Stegmann validiert.

In die Bedienung des Sony SH800 Zellsortierers wurde ich durch John Daley, Leiter der Durchflusszytometrie-Core Facility, eingewiesen. Die Experimente zur Sortierung von resistenten und Kontroll-Leukämiezellen wurden von mir geplant, entwickelt, durchgeführt und analysiert (Supplementary Fig. S7a, Supplementary Table S1, S4).

In die weitergehende Verarbeitung der sortierten Zellen zur Einzelzell-RNA Sequenzierung wurde ich von Frau Dr. Amy Guillaumet-Adkins methodisch eingeführt. Die Bearbeitung von 96 Zellen (1x 96-Well Plate) wurde von Frau Dr. Amy Guillaumet-Adkins in meiner Anwesenheit durchgeführt. Alle weiteren Zellen wurden von mir bearbeitet.

Die Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten wurde von mir durchgeführt in Rücksprache mit Herrn Dr. Praveen Anand und Herrn Dr. Noori Sotudeh. Die Datenaufbereitung, Annotation, bioinformatische Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse wurden von mir mit folgenden Software-Anwendungen ausgeführt: trimmomatic, STAR aligner, HTSeq, RSEM, R version 4.0.1, python 2.7.2, PAGODA2, MONOCLE2, SingleR, scan, SCENIC, Seurat (Figure 3A-F, 4A-C, Supplementary Figure S7b, S8, Supplementary Table S2-S7, S9).

Die Einzel ATAC Sequenzierung Experimente wurden von Frau Dr. Julia Frede und mir gemeinsam durchgeführt. Die Analyse der ATAC-Sequenzierungsdaten wurde von mir in Rücksprache mit Frau Dr. Julia Frede durchgeführt. Die Datenaufbereitung, Annotation, bioinformatische Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse wurden von mir mit folgenden Software-Anwendungen ausgeführt: nf-core ATAC, chromVAR, cisTopic (Figure 4A, Supplementary Fig. S10, Supplementary Table S8).


Die Aufbereitung und Visualisierung der oben aufgeführten experimentellen Daten und das Erstellen der Abbildungen und Ergänzungsmaterialien wurden von mir in Rücksprache mit Frau Prof. Dr. Dr. Birgit Knoechel und Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Lohr mit den folgenden Programmen durchgeführt: GraphPad Prism 9, Adobe Illustrator, Adobe Premiere Pro, Microsoft Excel.

Die erste Version des Manuskripts wurde von Frau Prof. Dr. Dr. Birgit Knoechel, Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Lohr und mir geschrieben. Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und kommentiert.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 30.01.2023

Unterschrift: .....  .....

<sup>1</sup>Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich während der Promotionsarbeit unterstützt haben. Besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Michal-Ruth Schweiger, Frau Prof. Dr. Dr. Birgit Knoechel und Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Lohr für die Betreuung der Arbeit aussprechen, die mich in meiner wissenschaftlichen Ausbildung gefördert haben. Außerdem möchte ich allen Laborkollegen für ihre Unterstützung, Zusammenarbeit und anregende Diskussionen danken. Ich danke der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung für die Förderung dieser Arbeit.

Meiner Freundin danke ich für die grenzenlose persönliche und fachliche Unterstützung und für ihre Begleitung während der anspruchsvollen, forschungsintensiven Zeit. Ebenso danke ich meinen Freunden für den fachlichen und persönlichen Austausch und die Begleitung meiner Promotion. Meiner Familie danke ich für die bedingungslose Unterstützung, die ich während meiner gesamten akademischen Ausbildung erfahren habe und aus der ich immerzu Motivation schöpfen konnte.

Für meine Mutter und meinen Bruder  
für meine Freundin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. B Zellreihe	12
2.2. B-Akute Lymphoblastische Leukämie	13
2.2.1. Symptome	13
2.2.2. Diagnostik und Klassifikation	13
2.3. Therapie der ALL	15
2.3.1. Erstlinientherapie	15
2.3.2. Therapieevaluation und Prognose	16
2.4. Rezidiv der ALL	17
2.4.1. Konventionelle Therapie des Rezidivs	17
2.4.2. Immuntherapeutische Ansätze für die B-ALL	17
2.4.3. Gezielte Therapieansätze für die T-ALL	19
2.5. CAR T Zellen	19
2.5.1. CAR T-Zell Biologie	19
2.5.2. Nebenwirkungen der CAR T Zellen	20
2.5.3. Resistenz gegen CAR T Zellen	21
2.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit	23
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>24</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>38</b>
4.1. CAR T-Zell Versagen	38
4.2. Aktivierungsfähigkeit	39
4.3. Therapieansatz des Resistenzmechanismus	40
4.4. Dual Targeting	41



<b>4.5.</b>	<b>Andere Immuntherapien</b>	<b>41</b>
<b>4.6.</b>	<b>Zusammenfassende Limitierungen der Arbeit</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>54</b>
<b>6.1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>6.2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>54</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AIEOP-BFM	(Studienkonsortium) Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica - Berlin-Frankfurt-Münster
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
ATAC	Assay for Transposase-Accessible Chromatin, deutsch: Assay für Transposase-zugängliches Chromatin
BTK	Bruton Tyrosinkinase
BZR	B-Zell Rezeptor
CAR T Zellen	Chimäre Antigen Rezeptor T Zellen
CD	Cluster of Differentiation, deutsch: Unterscheidungsgruppen
CoALL	Cooperative ALL(-Studiengruppe)
CR	Complete Remission, deutsch: Komplette Remission
CRS	Cytokine Release Syndrome, deutsch: Zytokinfreisetzungssyndrom
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, deutsch: Europäische Gruppe für die immunologische Charakterisierung von Leukämien
FAB	French-American-British(-Klassifikation)
GMALL	German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
MALT	Mucosa Associated Lymphatic Tissue, deutsch: Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	Major Histocompatibility Complex, deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex
MRD	Minimal Residual Disease, deutsch: Minimale Resterkrankung
NFAT	Nuclear Factor of the Activated T cell, deutsch: Nukleärer (Transkriptions-)Faktor der aktivierten T Zelle
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells', deutsch: Nukleärer (Transkriptions-)Faktor κB
ICANS	Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome, deutsch: Immuneffektorzell-assoziiertes Neurotoxizitätssyndrom
ICE	Immune effector Cell-associated Encephalopathy, deutsch: Immuneffektorzell-assoziierte Enzephalopathie
IL	Interleukin
IFNγ	Interferon gamma
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PLCγ2	Phospholipase C gamma 2

scFv	single chain variable Fragment, deutsch: einkettige Antikörperfragmente
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRUCK	T cells Redirected for antigen-Unrestricted Cytokine-initiated Killing, deutsch: gerichtete T Zellen für Antigen-uneingeschränktes Zytokin-initiiertes Abtöten
WHO	World Health Organization, deutsch: Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Gegen das Antigen Cluster of Differentiation 19 (CD19) gerichtete Chimäre Antigen Rezeptor T Zellen (CAR T Zellen) konnten eindruckliche Erfolge bei der Therapie der rezidierten B-Zell Akuten Lymphoblastischen Leukämie erzielen. Bis zu 90% der mehrfach vorbehandelten Patienten sprechen auf diese Therapie an<sup>1-7</sup>, jedoch erleiden 30-50% dieser Patienten ein weiteres Rezidiv<sup>2-5,8</sup>. In vorherigen Studien konnten bereits langfristige Resistenzmechanismen identifiziert werden, die das Auftreten von CD19-negativen Rezidiven aufgrund von Mutationen und alternativen Spleißvorgängen auf DNA-Ebene aufklärten<sup>9-11</sup>. Weitestgehend unklar blieb jedoch die Entstehung von CD19 niedrig-exprimierenden sowie kurzfristig auftretenden Rezidiven. In dieser Arbeit wurde daher die CD19-Regulation während der frühen Phase der Interaktion zwischen CAR T Zellen und Leukämiezellen untersucht.

Mithilfe von Durchflusszytometrie und Einzelzell-Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CAR T und Leukämiezellen zu einer raschen Bildung von CD19-Clustern und einer darauffolgenden Internalisierung des CD19-Corezeptors resultiert. Dies führte in Leukämiezellen, die die Interaktion überlebten, zu einer Reduktion der CD19-Oberflächenexpression um mehr als 95% im Vergleich zu Kontroll-Leukämiezellen. Die niedrige Expression von CD19 resultierte in eine Refraktärität der Leukämiezellen - auch gegenüber neuen, „frischen“ CAR T Zellen.

Durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung der refraktären Leukämiezellen konnte eine Subpopulation identifiziert werden, die Aktivitätsmarker exprimierten. Eine Gen Set Anreicherungsanalyse der RNA-Sequenzierungsdaten offenbarte außerdem die Aktivierung von NFκB- und CD40-Signalwegen, die beide physiologisch in aktivierten B Zellen eine führende Rolle spielen. Die Aktivierung von B Zellen führt physiologisch zur Initiierung der Keimzentrumsreaktion. Sowohl in RNA- als auch ATAC-Sequenzierungsdaten der refraktären Leukämiezellen konnte die Genmarker-Expression von Zentrozyten der hellen Zone des Keimzentrums sowie die erhöhte Zugänglichkeit von Regulatoren der Keimzentrumsreaktion auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Da die Initiierung der Aktivierungs- und Keimzentrumsreaktionsprogramme gleichzeitig eine erniedrigte Expression von *CD19* auf RNA-Ebene bedingt, wird auf diese Weise die niedrige Oberflächenexpression von CD19 aufrechterhalten. Die Inhibition dieser Aktivierungsprogramme durch Vorbehandlung mit dem Bruton Tyrosinkinase (BTK)-Inhibitor Ibrutinib führte zu einer erhöhten CAR T-Zell Zytotoxizität.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass CAR T Zellen die Aktivierung physiologischer Regulationsprogramme in ihren Zielzellen auslösen können und wie das Versagen der CAR T Zellen, ihre Zielzellen bei der ersten Interaktion abzutöten, das Überleben der Zielzellen fördern kann.

## 2. Einleitung

### 2.1. B Zellreihe

Wie jede Blutzelle entstammen B Zellen ursprünglich der hämatopoietischen Stammzelle<sup>12,13</sup>. Deren Nachkomme, die multipotente Progenitorzelle, kann in eine myeloische oder lymphatische Progenitorzelle differenzieren. Die lymphatische Progenitorzelle entwickelt sich im Thymus zur Pro T Vorläuferzelle oder im Knochenmark zu einer Pro B Vorläuferzelle. Die Pro B Vorläuferzelle reift weiter heran zur Prä B Zelle, welche über transitionelle Entwicklungsstadien schließlich zur naiven B Zelle reift<sup>12,13</sup>.

Das Repertoire ausgereifter naiver B Zellen beinhaltet Marginalzonen B Zellen sowie Follikuläre B Zellen. Diese werden bei Bindung des B-Zell Rezeptors (BZR) mit einem Antigen aktiviert. Marginalzonen B Zellen entwickeln sich daraufhin zu kurzlebigen Plasmazellen, die überwiegend Antikörper der Klasse IgM sezernieren<sup>12,13</sup>. Follikuläre B Zellen internalisieren den BZR-Antigen-Komplex und prozessieren das Antigen, um es über Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex (MHC)) II-Proteine wieder an der Zelloberfläche zu präsentieren. Eine komplementäre T Helferzelle kann über ihren T-Zell Rezeptor das MHC II-präsentierte Antigen erkennen und binden. Über die Interaktion von kostimulatorischen Domänen führt die sogenannte T-Zell abhängige B-Zell Aktivierung zur Initiierung der Keimzentrumsreaktion. Hierbei bilden sich die aktivierten B-Zellen zu Zentroblasten aus, die in der sogenannten dunklen Zone des Keimzentrums proliferieren. Durch somatische Hypermutationen wird die Affinität des B-Zell Rezeptors (BZR) zum Antigen optimiert. Zentrozyten mit optimal passenden BZR werden selektiert und treten in die helle Zone des Keimzentrums ein. Am Ende der Keimzentrumsreaktion reifen diese dann entweder zu antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen aus (Abbildung 1)<sup>12,13</sup>.

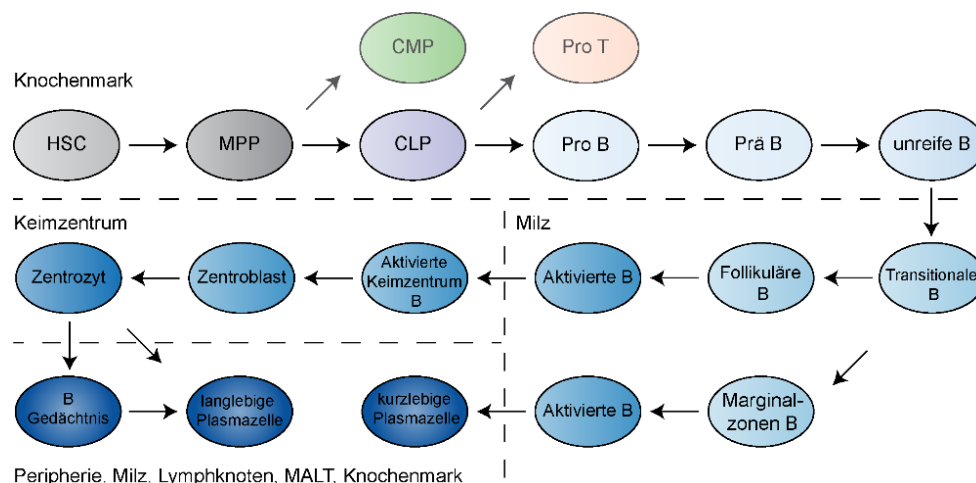


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema – B-Zell Entwicklung (frei adaptiert nach Lüllmann-Rauch<sup>12</sup> und Pieper et al.<sup>13</sup>)

## 2.2. B-Akute Lymphoblastische Leukämie

Der Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL) liegt eine Reifestörung und eine unkontrollierte Proliferation von lymphatischen Vorläufer-Zellen zugrunde. Sie ist mit einem Anteil von ca. 30% die häufigste maligne Tumorerkrankung im Kindesalter<sup>14</sup>. Die höchste Inzidenz tritt bei Kindern unter 5 Jahren auf mit 5,3 Neuerkrankungen/100.000 Einwohnern/Jahr<sup>15</sup>.

Sind die Entwicklungsstufen der T-Zellreihe betroffen, so handelt es sich um eine T-ALL; entsprechend bei der B-Zellreihe um eine B-ALL. Da diese Vorläuferzellen im Knochenmark beheimatet sind, liegt der Ursprung der Leukämie dort. Der Anteil der Blasten im Knochenmark beträgt bei der Erkrankung über 25%. Über diesen Grenzwert grenzen sich die Leukämien definitionsgemäß von den Lymphomen ab<sup>16</sup>.

### 2.2.1. Symptome

Durch die primäre Aktivität im Knochenmark kommt es zu einer Verdrängung der regulären Hämatopoese und im weiteren Verlauf zu einer Ausbreitung der malignen Zellen in periphere Organe. Typische Symptome leiten sich daher von der insuffizienten Hämatopoese in Form von Anämie, Infektneigung sowie Blutungsneigung ab. Häufig infiltrierte Organe sind die Lymphknoten, die Milz, das Mediastinum sowie das zentrale Nervensystem (ZNS). Etwa 20% der pädiatrischen Patienten weisen außerdem Knochen- und Gelenkschmerzen auf<sup>16</sup>.

### 2.2.2. Diagnostik und Klassifikation

Zur Diagnose der ALL muss ein Nachweis von Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark erfolgen. Darauf folgt die immunphänotypische Einteilung der ALL. Diese unterscheidet die Zugehörigkeit zur B- oder T-Zellreihe, wobei 75% der Fälle der B-ALL angehören<sup>17</sup>. Im Weiteren werden die Subtypen anhand der Reife der malignen Zellen klassifiziert. Die immunphänotypische Einteilung basiert auf durchflusszytometrischen Untersuchungen und orientiert sich in Deutschland an den AIEOP-BFM (Studienkonsortium Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica – Berlin-Frankfurt-Münster) Konsensus Richtlinien bei Kindern<sup>18</sup>, welche wiederum auf den Vorgaben der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) basieren<sup>19</sup>. Diese werden bei der Diagnostik der Erwachsenen-ALL angewandt.

Im Folgenden wird die **immunphänotypische Klassifizierung** der pädiatrischen ALL nach AIEOP-BFM Konsensus Richtlinien aufgezeigt<sup>18</sup> (Tabelle 1-2):

Die Linienzugehörigkeit der ALL wird folgendermaßen ermittelt:

	Kriterien	Marker
Vorläufer B-ALL	Mindestens zwei Kriterien erfüllt	CD19 <sup>pos</sup> , CD10 <sup>pos</sup> , (i)CD22 <sup>pos</sup> , iCD79a <sup>pos</sup>
T-ALL	Alle drei Kriterien erfüllt	(i)CD3 <sup>pos</sup> , CD7 <sup>pos</sup> , iMPO <sup>neg/low</sup>
Akute Myeloische Leukämie (AML)	Mindestens zwei Kriterien erfüllt und ALL Kriterien nicht erfüllt	CD13 <sup>pos</sup> , CD33 <sup>pos</sup> , CD64 <sup>pos</sup> , CD65 <sup>pos</sup> , CD117 <sup>pos</sup> , iMPO <sup>pos</sup>

Tabelle 1: Immunphänotypische Klassifizierung – Linienzugehörigkeit<sup>18</sup>

Nicht immer gelingt eine eindeutige Zuordnung zu diesen Linien, da die unreifen Vorläuferzellen hämatopoetische bzw. stammzellähnliche Eigenschaften vorweisen können. Wenn sich die Leukämiezellen mit sowohl myeloischen als auch lymphatischen Markern und Eigenschaften präsentieren, so werden diese als Leukämien mit gemischtem bzw. ambivalentem Phänotyp klassifiziert. Die Therapieentscheidung richtet sich dann regelhaft nach der dominanten Linie<sup>16</sup>.

Ist eine Linienzugehörigkeit festzustellen wird im Weiteren der Subtyp bestimmt, welcher den Reifegrad der ALL zuordnet:

		Häufigkeit <sup>17</sup>	Marker
Vorläufer B-ALL (70%)	B-I (Pro B)	20%	CD10 <sup>neg</sup>
	B-II (Common)	40%	CD10 <sup>pos</sup>
	B-III (Pre B)	10%	iIgM <sup>pos</sup>
Reife B-ALL (Burkitt) (5%)	B-IV (Mature B)	5%	k- oder lambda-Kette <sup>pos</sup>
T-ALL (25%)	T-I (Pro T)	6%	Nur (i)CD3 <sup>pos</sup> und CD7 <sup>pos</sup>
	T-II (Pre T)		CD2 <sup>pos</sup> und/oder CD5 <sup>pos</sup> und/oder CD8 <sup>pos</sup>
	T-III (Cortical T)	13%	CD1a <sup>pos</sup>
	T-IV (Mature T)	6%	CD1a <sup>neg</sup> und sCD3 <sup>pos</sup>

Tabelle 2: Immunphänotypische Klassifizierung – ALL-Subtyp<sup>18</sup>

Die seltene reife B-ALL (Burkitt-ALL), die in etwa 5% aller ALL-Fälle auftritt<sup>17</sup>, ähnelt in ihren Eigenschaften den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, weshalb ihre Therapie sich an deren Richtlinien orientiert und sich somit von denen der ALL unterscheidet. Sie kann auch anhand ihrer morphologischen Eigenschaften nach der ansonsten historischen French-American-British (FAB)-Klassifikation identifiziert werden<sup>20</sup>.

Wiederkehrende **zytogenetische** und **molekulargenetische** Merkmale werden in der WHO-Klassifikation berücksichtigt und sind relevant für die Risikostratifizierung (Tabelle 3):

B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma not otherwise specified with high hyperdiploidy with hypodiploidy with iAMP21 with BCR::ABL1 fusion with BCR::ABL1-like features with KMT2A rearrangement with ETV6::RUNX1 fusion with ETV6::RUNX1-like features with TCF3::PBX1 fusion with IGH::IL3 fusion with TCF3::HLF fusion with other defined genetic abnormalities
T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma	T-lymphoblastic leukaemia / lymphoma not otherwise specified  Early T-precursor lymphoblastic leukaemia / lymphoma

Tabelle 3: WHO-Klassifikation 5. Edition<sup>21</sup>

Ungünstige Prognosefaktoren stellen hierbei die BCR::ABL1 Translokation sowie KMT2A Rekombination dar<sup>16</sup>. Beide genetischen Hintergründe können auch bei dem oben genannten gemischten Phänotypen zu Grunde liegen.

## 2.3. Therapie der ALL

### 2.3.1. Erstlinientherapie

#### Chemo- und Strahlentherapie

Die Therapie der ALL erfolgt nach Studienprotokollen mit einer risikoadaptierten Kombinationschemo- und Strahlentherapie. Für die Risikostratifizierung werden sowohl die oben genannte immunphänotypische und zyto-/molekulargenetische Klassifizierung als auch der Krankheitsverlauf bzw. das Ansprechen auf die Therapie berücksichtigt<sup>16,22</sup>. Kinder und Adoleszente werden in Deutschland hauptsächlich nach den AIEOP-BFM oder den CoALL (Cooperative ALL)-Studien behandelt, bei Erwachsenen im Rahmen der GMALL (German Multicenter Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia)-Studiengruppe.

Die Therapiestruktur dieser Studien ist im Grundsatz gleich und besteht aus folgenden Phasen<sup>16,22</sup>:

1. Eine circa einwöchige Vorphase-Therapie beispielsweise mit Prednison oder Dexamethason wird vor der Induktion vorgenommen, um eine schrittweise Tumor-Zellreduktion zu gewährleisten und damit einem Tumorlyse-Syndrom vorzubeugen.
2. Die darauffolgende Induktionstherapie dauert etwa fünf Wochen und besteht aus einer Hochdosischemotherapie, in der Regel mit Prednison oder Dexamethason, Vincristin und einem Anthrazyklin-Derivat wie Daunorubicin.



3. Auf die Induktionstherapie folgt die Konsolidierung, dessen Intensität und Dauer sich nach der Risikostratifizierung des einzelnen Patienten richtet. Beispielhaft zu nennen sind hierbei der Einsatz von Methotrexat, Cytarabin sowie Asparaginase.
4. Bei erwachsenen Patienten kann auf die Konsolidierungsphase bereits die Erhaltungsphase folgen, bei pädiatrischen Patienten erfolgt jedoch in der Regel die Intensivierungsphase mit der Extrakompartiment-Therapie, die vordergründlich das ZNS und ggf. die Hoden behandelt. Die Intensität und Dauer dieser Therapieabschnitte ist ebenfalls von der Risikostratifizierung abhängig. Für die Behandlung des ZNS wird neben intrathekalen Methotrexatgaben eine Ganzhirn-Strahlenbehandlung von 12 Gy bei pädiatrischen bzw. 24 Gy bei erwachsenen Patienten durchgeführt.
5. Schließlich folgt die Erhaltungstherapie mit einer Dauer von bis zu zwei Jahren bei Kindern bzw. 2,5 Jahren nach Diagnosestellung bei Erwachsenen mit Methotrexat und Mercaptopurin.

### Personalisierte Medizin - Targeted therapy

Die BCR::ABL1 Translokation taucht bei etwa 2-5% der pädiatrischen ALL auf und hat eine höhere Inzidenz mit steigendem Alter, sodass sie bei etwa 20-40% der erwachsenen Patienten auftritt<sup>23-26</sup>. Sie geht mit der Expression einer aberranten Tyrosinkinase einher. Diese Patienten erhalten den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib entweder parallel zur Standardhochdosis-Chemotherapie oder in Kombination mit einer weniger aggressiven Chemotherapie. Wie oben bereits erwähnt ist die Prognose von an BCR::ABL1 Translokation erkrankten ALL-Patienten ungünstig und die Behandlung mit Imatinib führt – anders als bei der CML – nicht regelhaft zur Kuration<sup>27,28</sup>.

### **2.3.2. Therapieevaluation und Prognose**

Der Therapieerfolg wird anhand der Reduktion von Leukämiezellen gemessen. Eine komplette Remission (engl. Complete Remission (CR)) ist erreicht, wenn in der mikroskopischen Untersuchung von Knochenmarkausstrichen keine Leukämiezellen mehr nachgewiesen werden können (M1-Mark), die reguläre Hämatopoese wieder eintritt und kein extramedullärer Befall (mehr) vorliegt<sup>16</sup>. Bleibt eine komplette Regeneration der Hämatopoese aus, liegt eine unvollständige Remission (engl. incomplete CR (CRi)) vor. 98% der pädiatrischen Patienten erreichen durch die oben genannten Chemotherapieprotokolle eine komplette Remission<sup>29</sup>.

Die Nachweisgrenze für mikroskopische Untersuchungen liegt bei 5%, sodass auch bei kompletter Remission noch eine sogenannte minimale Resterkrankung (engl. Minimal Residual Disease (MRD)) vorliegen kann<sup>22</sup>. Diese minimale Resterkrankung wird mit sensitiveren Nachweismethoden wie der Polymerasekettenreaktion (Untersuchung auf klonspezifischen T-Zell Rezeptor oder Immunglobulin Genarrangements) oder der Durchflusszytometrie (immunphänotypisch) untersucht, die eine Sensitivität von 1:10 000

haben<sup>30</sup>. Werden auch bei diesen Untersuchungen keine Leukämiezellen nachgewiesen, besteht eine sogenannte molekulare CR.

In allen Therapieprotokollen ist eine Evaluation des Therapieansprechens nach der Induktionsphase vorgesehen, denn das Erreichen einer (molekularen) kompletten Remission nach der Induktionsphase ist prognostisch günstig. Andersherum ist das Nicht-Erreichen einer CR prognostisch ungünstig, was vor allem bei älteren Patienten häufiger auftritt (20-30%)<sup>31</sup>. Dies hat in der Regel eine längere und intensivere weiterführende Therapie zur Konsequenz<sup>16,32</sup>. Weitere ungünstige Prognosefaktoren unabhängig vom Alter der Patienten sind eine hohe Leukozytenzahl bei Diagnosestellung, der Subtyp der ALL sowie oben genannte molekulare und zytogenetische Aberrationen<sup>16,32</sup>.

## **2.4. Rezidiv der ALL**

Die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Kindern 85%<sup>14</sup> und fällt mit steigendem Lebensalter des Erkrankten, sodass bei über 65-Jährigen nur noch eine Langzeitüberlebensrate von 20% erreicht wird<sup>22</sup>. Typischerweise erfolgt eine regelmäßige und engmaschige Nachsorge in den ersten fünf Jahren, da 98% der pädiatrischen Patienten innerhalb dieses Zeitraums rezidivieren. Dabei wird unterschieden zwischen einem Frührezidiv und Spätrezidiv. Je früher das Rezidiv auftaucht, desto unwahrscheinlicher ist das Erreichen einer zweiten kompletten Remission<sup>33</sup>. Insgesamt erreichen zwar 84% der pädiatrischen Patienten eine zweite CR, die Langzeitüberlebensrate liegt nach einem Rezidiv aber trotzdem nur bei 35-40%<sup>34</sup>; für Erwachsene weniger als 10%<sup>35-37</sup>.

### **2.4.1. Konventionelle Therapie des Rezidivs**

Nur pädiatrische Patienten mit einem günstigen Risikoprofil (Spätrezidiv) haben in einer erneuten Chemotherapie eine kurative Behandlungsoption, wenn sie auf diese mit einer kompletten Remission und einer MRD unter  $10^{-3}$  ansprechen<sup>38-40</sup>. Für alle anderen pädiatrischen und erwachsenen Patienten galt lange, dass sie nur Aussicht auf Heilung haben, wenn sie eine darauffolgende Stammzelltransplantation erhalten<sup>36,37,40,41</sup>. Diese Therapieoption ist jedoch mit Risiken und potentiell letalen Nebenwirkungen verbunden, sodass nicht jeder Patient dafür geeignet ist.

In den letzten Jahren sind neue Therapieansätze eingeführt worden, die bessere Ergebnisse vor allem bei der Behandlung von Patienten mit aggressiveren Frührezidiven bzw. mit nicht auf die Therapie ansprechenden (=refraktären) Rezidiven gezeigt haben.

### **2.4.2. Immuntherapeutische Ansätze für die B-ALL**

#### CD22

CD22 ist ein inhibitorischer Korezeptor des BZR<sup>42</sup>, welcher bei Antigenbindung des BZR phosphoryliert wird<sup>43</sup> und mit dem BZR assoziiert<sup>44</sup>. Dies führt unter anderem zur Rekrutierung

der SHP-1 Phosphatase, welche den Signalweg des BZR negativ reguliert<sup>45</sup>. CD22 ist ein attraktives Zielantigen, da es grundsätzlich in allen Entwicklungsstufen der B-Zellreihe bis auf die Plasmazelle exprimiert wird<sup>46</sup>. Dadurch sind eine überwiegende Mehrheit (>90%) der B-ALL Patienten CD22 positiv<sup>47</sup>. Die Expression nimmt jedoch ab, je unreifer die Zellen der B-Zellreihe sind - sowohl in gesunden als auch malignen Zellen<sup>46,47</sup>, sodass vor allem in unreifen Pro B-ALL Patienten bei 16% kein und bei 31% nur einem Teil der Leukämiezellpopulation CD22 exprimiert wird<sup>47</sup>.

Inotuzumab ozogamizin (Inotuzumab) ist eine gegen CD22 gerichtete Antikörperverbindung, welches mit dem Zellgift Calcheamicin konjugiert ist. Mit dem Einsatz von Inotuzumab wurden im Vergleich zur Chemotherapie höhere CR Raten erreicht (81% vs. 29%), jedoch war das mediane Überleben nicht signifikant erhöht<sup>48</sup>. Daher ist auch Inotuzumab nur als Ersatz für die Chemotherapie vor Stammzelltransplantation eine Behandlungsoption zum Erreichen einer zweiten Remission. Es ist aktuell nur für Erwachsene zugelassen und schwere Nebenwirkungen treten ähnlich häufig auf wie bei der Chemotherapie<sup>48</sup>.

### CD19

CD19 ist ein stimulatorischer Korezeptor des BZR-Komplexes. Bei Kontakt mit einem komplementären, membrangebundenen Antigen wird das Signalosom des BZR initiiert, welches unter anderem Kinasen und Signalmoleküle wie die Spleen Tyrosine Kinase (SYK), Bruton Tyrosinkinase (BTK) und Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) umfasst<sup>49,50</sup>. Nach der Bindung akkumulieren die BZR-Antigen Komplexe. CD19 kolokalisiert mit diesen Komplexen, bildet dabei Cluster aus<sup>51</sup> und rekrutiert Signalmoleküle wie Vav und Phosphoinositid-3-kinase (PI3K), welche das BZR Signal verstärken<sup>50-54</sup> (Abbildung 2). Schließlich wird das gebundene Antigen internalisiert und prozessiert<sup>52</sup>.

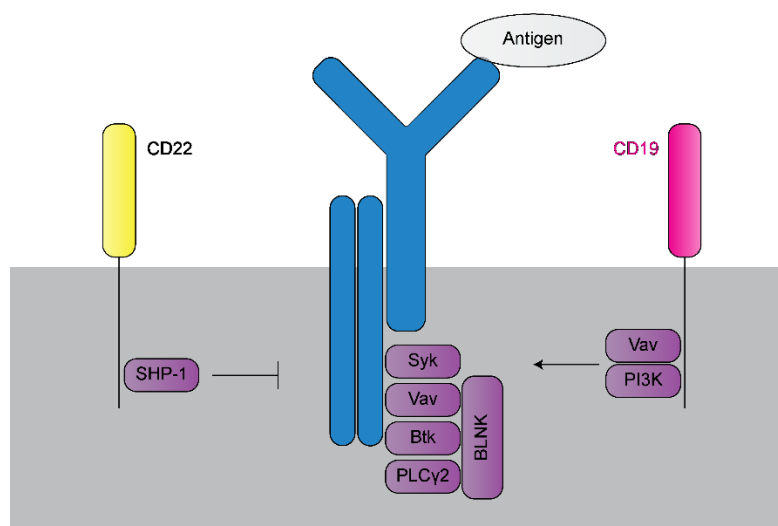


Abbildung 2: B-Zell Rezeptor Signalosom und Korezeptoren (stark vereinfachtes Schema frei adaptiert nach Harwood und Batista 2008<sup>52</sup>, Harwood und Batista 2010<sup>50</sup>, Walker und Smith 2008<sup>55</sup>)

CD19 wird wie CD22 in allen Reifungsstadien der B-Zellreihe bis zur Plasmazelle exprimiert. Im Gegensatz zu CD22 wird CD19 aber in allen B-ALL Subtypen bzw. Reifungsstufen hoch exprimiert<sup>47</sup>, weswegen CD19 als ein universelles Zielantigen für B-ALL Patienten zu Nutzen kommen kann.

Blinatumomab ist ein bispezifischer Antikörper, der B-ALL Zellen über eine CD19 Bindungsstelle und T Zellen über CD3 bindet, was zur zytotoxischen Aktivität der T Zellen gegenüber den Leukämiezellen führt. Im Vergleich zur Standardchemotherapie zeigt Blinatumomab eine signifikant höhere CR-Rate (34% vs. 16%) und auch eine signifikant verlängerte mediane Überlebenszeit bei weniger schweren Nebenwirkungen<sup>56</sup>. Diese ist jedoch mit 7,7 vs. 4 Monaten weiterhin relativ niedrig<sup>56</sup>, sodass auch Blinatumomab nicht als kurative Therapieoption sondern als Ersatz der Standardchemotherapie nach Rezidiv und vor Stammzelltransplantation angewandt wird<sup>57,58</sup>. Vor allem bei Rezidiven mit hohem Blastenanteil oder extramedullärem Geschehen zeigt Blinatumomab nur niedrige Erfolgsraten<sup>59-61</sup>.

### **2.4.3. Gezielte Therapieansätze für die T-ALL**

Auch für die T-ALL bestehen neuartige Therapieansätze mit dem CD38-Antikörper Daratumumab<sup>16</sup>, dem T-Zell spezifischen Purinanalogon Nelarabin oder dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib<sup>22</sup>, welche der Vollständigkeit halber an dieser Stelle genannt, aber nicht näher erörtert werden, da sie über den thematischen Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

## **2.5. CAR T Zellen**

Oben genannte neuartige Immuntherapieansätze haben zwar eine Überlegenheit gegenüber der Standardchemotherapie gezeigt, ihnen ist aber gemein, dass sie keine kurativen Behandlungsoptionen sind, sondern vielmehr eine Überbrückungstherapie zur Stammzelltransplantation darstellen.

Bemerkenswerte Erfolge konnten dagegen die 2017 in den USA und 2018 in Europa zugelassenen T Zellen mit chimärem Antigen Rezeptor (CAR T Zellen) erzielen. Mit der CAR T Zell-Therapie sind CR-Raten von bis zu 90% in zuvor mehrmals rezidivierten/refraktären und intensiv vortherapierten B-ALL Patienten erreicht worden - teilweise mit anhaltenden Remissionen<sup>1-7</sup>. Eines der aktuell längsten verfügbaren Datensätze stammt von der ELIANA-Zulassungsstudie, aus der eine 5 Jahresgesamtüberlebensrate von 55% herausgeht<sup>62</sup> und somit bei gut der Hälfte der Patienten auf eine Heilung deuten.

### **2.5.1. CAR T-Zell Biologie**

CAR T Zellen sind gentechnisch modifizierte T Zellen, die Tumorzellen MHC-unabhängig erkennen und angreifen können. Dafür werden T Zellen vom Patienten entnommen und die für den Rezeptor kodierende Gensequenz wird über einen viralen Vektor in das Genom eingefügt<sup>63</sup>.

Es gibt unterschiedliche Entwicklungsgenerationen von CAR T Zellen<sup>63</sup>. Allen gemeinsam ist, dass sie ein single chain variable Fragment (scFv) tragen, das gegen das spezifische Antigen gerichtet ist, sowie aus einer intrazellulären CD3  $\zeta$  Aktivierungsdomäne bestehen. Die zweite Generation CAR T Zellen sind außerdem mit einer kostimulatorischen Domäne, 4-1BB (Tisagenlecleucel) oder CD28 (Axicabtagen-Ciloleucel) ausgestattet, die zur Aktivierung der CAR T Zellen bei Antigenbindung beitragen. Drittgeneration CAR T Zellen tragen beide kostimulatorischen Domänen. Viertgeneration CAR T Zellen, auch TRUCKs (T cells Redirected for antigen-unrestricted Cytokine-initiated Killing) genannt, sind neben dem CAR auch mit einer nuclear factor of the activated T cell (NFAT)-abhängigen Expressionskassette ausgestattet, welche bei CAR T Zell Aktivierung die Produktion von transgenen Zytokinen induzieren kann. Beispielsweise könnte so über die Produktion und Ausschüttung von transgenem Interleukin (IL)-12 das Tumormikromilieu moduliert und andere Immunzellen zur Abtötung der Tumorzellen rekrutiert werden (Abbildung 3)<sup>63,64</sup>.

Schließlich gibt es weitere Modifikationen, die aktuell in präklinischen und klinischen Studien getestet werden, die zur Verbesserung der Zytotoxizität sowie der klinischen Beherrschbarkeit beitragen sollen. Die aktuell zugelassenen CAR T-Zell Produkte sind Zweitgeneration CAR T Zellen.

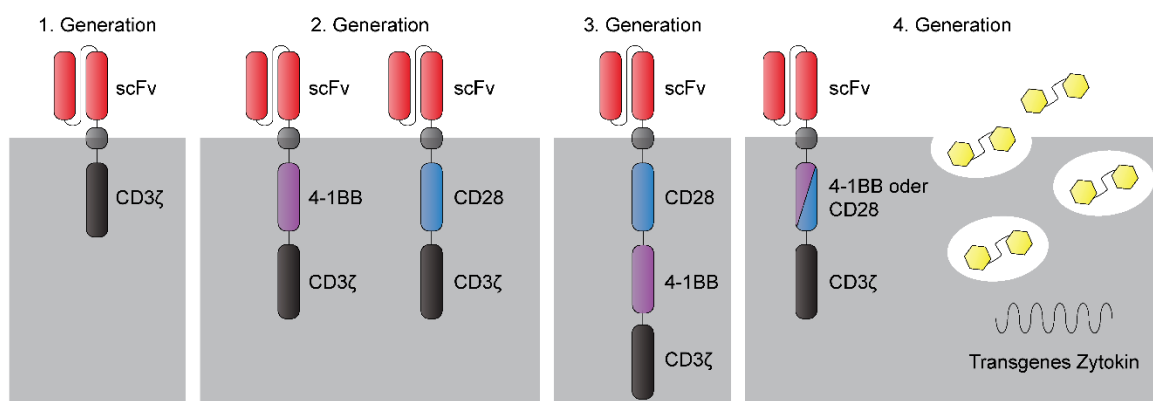


Abbildung 3: Entwicklungsgenerationen von CAR T Zellen  
(adaptiert nach Brentjens et al.<sup>63</sup> und Subklewe et al.<sup>65</sup>)

### 2.5.2. Nebenwirkungen der CAR T Zellen

Nach dem Einbau des Rezeptors werden die entnommenen T Zellen vermehrt und dem Patienten anschließend zurückgegeben. Bei Kontakt mit dem Antigen werden diese daraufhin aktiviert und töten Tumorzellen durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen ab. Neben der Initiierung zytotoxischer Prozesse werden Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)  $\alpha$  und Interferon (IFN)  $\gamma$  freigesetzt, die wiederum Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Monozyten zur Aktivierung und Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6 anregen<sup>66</sup>. Die kaskadenartige Ausschüttung von Zytokinen führt zum sogenannten Zytokinfreisetzungssyndrom (engl.: Cytokine Release Syndrom (CRS))<sup>66</sup>.

Das Auftreten von CRS ist sehr häufig - in Studien wurden Inzidenzen von über 90% angegeben<sup>1,2,4,67,68</sup>. Schwere Verläufe äußern sich durch Fieber, Hypoxie und Hypotonie sowie nachfolgende Organschädigungen<sup>69</sup>. Mit dem Einsatz vom Anti-IL6-Antikörper Tocilizumab kann das CRS kontrolliert werden, ohne dass es den antileukämischen Effekt der CAR T Zellen negativ beeinflusst<sup>70</sup>. Präklinische Studien zur Kontrollierbarkeit von CAR T Zellen haben darüber hinaus den Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib identifiziert, welcher die Aktivierung von CAR T Zellen bei Auftreten eines CRS reversibel unterdrücken kann<sup>71,72</sup>. Außerdem ist die Entwicklung von CAR T Zellen mit kontrollierbaren Komponenten, welche im Falle schwerer unerwünschter Nebenwirkungen zum Abschalten der CAR T Zellen genutzt werden können, Gegenstand der aktuellen Forschung<sup>73</sup>.

Nach dem CRS ist die zweithäufigste Nebenwirkung das Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom (ICANS). Dieses kann sich sehr heterogen anhand von neurologischen Dysfunktionen zeigen. Frühe Symptome, die im sogenannten immune effector cell associated encephalopathy (ICE-) score zur Identifikation des ICANS erfasst werden, sind ein verändertes Schriftbild, Orientierungsstörung, Aufmerksamkeitsstörung, Aphasie sowie die eingeschränkte Fähigkeit, Aufforderungen zu befolgen<sup>69</sup>. Die Pathophysiologie des ICANS ist noch unklar, ein potentieller Mechanismus ist mit der Entdeckung von CD19 exprimierenden zerebralen Perizyten beschrieben worden<sup>74</sup>. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Zielantigen von CAR T Zellen einzigartig exprimiert werden muss, um ungewünschte *on-target*, *off-tumor* Reaktionen zu vermeiden.

### **2.5.3. Resistenz gegen CAR T Zellen**

Trotz der eindrucksvollen Erfolge der CAR T-Zell Therapie bei den mehrfach rezidierten und intensiv vorbehandelten Patienten, erleiden ca. 30-50% dieser Patienten ein weiteres Rezidiv<sup>2-5,8</sup> und ein Teil der Patienten spricht auf die CAR T-Zell Therapie nicht oder nur mäßig an. Ähnlich wie beim Rezidiv nach Erstlinienchemotherapie lässt sich der Krankheitsverlauf grob danach einteilen, wann das Rezidiv auftritt:

Spätrezidive erscheinen in der Regel nach Ansprechen auf die Therapie und Erreichen einer kompletten Remission. Der Tumor präsentiert sich dann häufig mit einem veränderten<sup>9</sup> oder fehlenden<sup>75-77</sup> CD19 Protein, sodass CAR T Zellen diese Rezidivtumore nicht erkennen können. Folgende Mechanismen konnten in diesem Rahmen aufgeschlüsselt werden:

#### Mutationen

Ein Großteil der Rezidive präsentiert sich aufgrund von Mutationen im CD19-Gen CD19 negativ<sup>10,11</sup>. Je nach Studie werden Raten von 39-68% für CD19 negative Rezidive nach

Erreichen einer CR berichtet<sup>2,4,5,8</sup>. Zur Entwicklung der Resistenz ist hierbei entscheidend, ob das vom Rezeptor erkannte Epitop exprimiert wird. So können weiterhin Isoformen von CD19 exprimiert werden - wenn das für die Proteinsequenz kodierende Exon aufgrund von alternativen Spleißmechanismen fehlt, führt dies trotzdem zur Resistenzentwicklung<sup>9</sup>.

### Lineage Switch

Wie oben erwähnt, können ALL-Erkrankungen, beispielsweise mit dem genetischen Hintergrund der KMT2A-Rekombination, sich sowohl lymphatisch als auch myeloisch präsentieren. In diesen Patienten kann ein sogenannter *Lineage Switch* beobachtet werden. Die vormals CD19 positive B-ALL rezidierte nach CAR T Zelltherapie mit einem myeloischen, CD19 negativen Phänotyp<sup>75,76</sup>.

### Maskierung

Auch die Maskierung des CD19 Antigens kann dazu führen, dass CAR T Zellen nicht an das entsprechende Epitop binden können. Bei einem Patienten wurde bei der Herstellung der CAR T Zellen versehentlich auch eine Leukämiezelle mit dem Rezeptor versehen. Das CD19 Antigen wurde vom eigens in der Leukämiezelle exprimierten Rezeptor gebunden und konnte deshalb nicht von CAR T Zellen erkannt werden<sup>78</sup>.

### Selektion

Auch wenn es aufgrund der universellen Expression<sup>47</sup> selten ist, kann bereits vor Beginn der CAR T-Zell Therapie ein CD19 negativer Zellklon vorliegen, der durch die CAR T-Zell Therapie selektiert wird und zum Rezidiv führt<sup>77</sup>.

Frührezidive bzw. refraktäre ALL-Erkrankungen sprechen mäßig oder nicht auf die CAR T-Zell Therapie an. Typischerweise präsentieren sich solche Rezidive bzw. refraktäre Leukämiezellen CD19 positiv. Solche resistenten/refraktären Verläufe sind bis jetzt nur unvollständig verstanden. Doch auch hier kann die CD19 Expression eine Rolle spielen<sup>79</sup>:

### Niedriges Antigen

Um Resistenzen zu entwickeln, müssen Leukämiezellen nicht vollständig CD19 bzw. das entsprechende Epitop verlieren oder maskieren. Auch eine zu niedrige Expression des Zielantigens führt dazu, dass CAR T Zellen die Leukämiezellen nicht angreifen<sup>79</sup>. Erst bei einer gewissen Antigendichte, werden direkte zytotoxische Prozesse von CAR T Zellen ausgelöst; für eine Aktivierung der Zytokinproduktion in CAR T Zellen liegt dieser Grenzwert sogar zehnmal höher<sup>79</sup>. So kann eine teilweise CD19 Runterregulation bereits zu Resistenzphänomen führen. Genaue Antigengrenzwerte sind jedoch

abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie zum Beispiel CAR-Konstrukt<sup>80</sup>, Tumorentität<sup>81</sup> und Zielantigen<sup>82,83</sup>.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich eine niedrige Antigenexpression zu einer weniger effizienten CAR T Zell-Zytotoxizität führt<sup>79,80,82-84</sup>. Die Mechanismen, die zu einer niedrigen, aber nicht negativen, Expression von CD19 führen sind jedoch bis jetzt nur unzulänglich verstanden. Eine Studie, die das gleiche Phänomen einer erniedrigten Expression von CD22 nach anti-CD22 CAR T Zellen untersuchte, konnte zwar keinen Mechanismus aufklären, kam jedoch zu dem Ergebnis, dass eine Runterregulation des Zielantigens ohne genomische oder phänotypische Veränderungen einhergeht<sup>83</sup>. Als eine T-Zell vermittelte Ursache wurde die Trogozytose identifiziert, in der es zum Transfer von Membranfragmenten mit CD19 Proteinen von der Leukämiezelle zur CAR T Zelle kommt<sup>84</sup>.

## **2.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Diese Arbeit soll sich mit der frühen Resistenzentwicklung von malignen Vorläufer B-ALL Zellen gegenüber CAR T Zellen beschäftigen. Dabei soll untersucht werden, ob und wie sich resistente von therapie-empfindlichen Leukämiezellen unterscheiden.

Bisherige Studien haben sich bei der Resistenzentwicklung vor allem auf CD19 negative Rezidive konzentriert, die im Rahmen von tiefgreifenden, langfristigen Mechanismen wie Mutationen auf DNA-Ebene entstehen. Im Kontrast dazu zeigt die klinische Erfahrung, dass CD19 positive Rezidive früh auftreten, sodass im Rahmen dieser Arbeit hypothetisiert wird, dass bei diesen Resistenzen andere, kurzfristige und nicht-genomische Mechanismen zugrunde liegen könnten.

Da bisherige Studien die Expression von CD19 nur im Langzeitvergleich erforschten, soll im ersten Schritt der Arbeit untersucht werden, ob und wie CD19 in der Frühphase der Therapie reguliert wird. Folgende Forschungsfragen sollen untersucht werden:

Ändert sich die Expression von CD19 kurzfristig nach Interaktion mit CAR T Zellen?

Führen kurzfristige Veränderungen der CD19 Expression zu einer Refraktärität von Leukämiezellen?

Sind kurzfristige Veränderungen von CD19 auf Regulationsmechanismen der Leukämiezellen zurückzuführen und welche Mechanismen werden dabei engagiert?

Somit soll das Verständnis über das Auftreten von frühzeitigen und/oder CD19 positiven Rezidiven aufgeklärt werden, was potentiell genutzt werden könnte, um einen solchen Resistenzmechanismus einer Therapie zugänglich zu machen.



### 3. Publikation

CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH | RESEARCH ARTICLE

## Regulatory Programs of B-cell Activation and Germinal Center Reaction Allow B-ALL Escape from CD19 CAR T-cell Therapy



Nam Gyu Im<sup>1,2,3,4,5</sup>, Amy Guillaumet-Adkins<sup>1,2,3</sup>, Megha Wal<sup>1,2,3</sup>, Anna J. Rogers<sup>1</sup>, Julia Frede<sup>2,3,6</sup>, Claire C. Havig<sup>1</sup>, Jing Yang<sup>1,2,3</sup>, Praveen Anand<sup>1,2,3,6</sup>, Sarah K. Stegmann<sup>2</sup>, Johannes M. Waldschmidt<sup>2,3,6</sup>, Noori Sotudeh<sup>1,2,3</sup>, Leili Niu<sup>1</sup>, Jordan Voisine<sup>1</sup>, Michal R. Schweiger<sup>4,5</sup>, Clemens Grassberger<sup>7</sup>, Jens G. Lohr<sup>2,3,6</sup>, and Birgit Knoechel<sup>1,2,3,8</sup>

### ABSTRACT

Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy has led to tremendous successes in the treatment of B-cell malignancies. However, a large fraction of treated patients relapse, often with disease expressing reduced levels of the target antigen. Here, we report that exposing CD19<sup>+</sup> B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells to CD19 CAR T cells reduced CD19 expression within hours. Initially, CD19 CAR T cells caused clustering of CD19 at the T cell-leukemia cell interface followed by CD19 internalization and decreased CD19 surface expression on the B-ALL cells. CD19 expression was then repressed by transcriptional rewiring. Using single-cell RNA sequencing and single-cell assay for transposase-accessible chromatin using

sequencing, we demonstrated that a subset of refractory CD19<sup>low</sup> cells sustained decreased CD19 expression through transcriptional programs of physiologic B-cell activation and germinal center reaction. Inhibiting B-cell activation programs with the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib increased the cytotoxicity of CD19 CAR T cells without affecting CAR T-cell viability. These results demonstrate transcriptional plasticity as an underlying mechanism of escape from CAR T cells and highlight the importance of combining CAR T-cell therapy with targeted therapies that aim to overcome this plasticity.

See related Spotlight by Zhao and Melenhorst, p. 1040

### Introduction

The application of CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapies has shown remarkable success in treating relapsed CD19<sup>+</sup> B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL; refs. 1, 2). Up to 90% of the heavily pretreated patients who receive this therapy enter into remission (2–6). However, a large fraction of patients relapse (3–6). Loss of CD19 expression via mutations (7, 8), lineage switch (9, 10), and loss of the targeted epitope through alternative splicing (11) are causes of resistance to CD19 CAR T-cell therapy

and relapse. Additional studies have shown that intercellular processes, such as trogocytosis whereby membrane fragments transfer between cells, can result in emergence of CD19<sup>low</sup> B-ALL cells (12) and low expression of the target antigen can lead to resistance (13) and less effective killing (12, 14). Antigen density thresholds, however, are difficult to define and depend on CAR constructs (14), tumor type (15), and target antigens (13, 16). Other resistance mechanisms that have been described include CD19<sup>+</sup> resistance through antigen masking (17) and impaired death receptor signaling (18).

CD19 is a coreceptor of the B-cell receptor (BCR) complex and is expressed throughout the B-cell lineage until the plasma-cell stage. CD19 clusters upon antigen binding (19) and forms BCR-antigen complexes, which are internalized and processed thereafter, thus contributing to B-cell activation (19). Although CD19 targeting by and resistance to CAR T cells has been well established (7, 8, 11), the dynamics of CD19 antigen expression and its regulation during the early phases of interactions between CAR T cells and CD19<sup>+</sup> target cells remain unclear. These early dynamics may have important implications for initial treatment failures.

In this study, we hypothesized that the early interactions of CAR T cells and CD19<sup>+</sup> target cells trigger discrete regulatory programs that allow for escape of some target cells. By combining live single-cell microscopy with single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and single-cell assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (scATAC-seq), we show that the interaction between CD19 CAR T cells and CD19-expressing B-ALL cells caused clustering and internalization of CD19 in all leukemia cells that resulted in reduced surface expression of CD19. We found that a subpopulation of target cells employed physiologic B-cell activation programs reminiscent of germinal center reactions in normal B cells that caused sustained transcriptional downregulation of *CD19*. Initiation of these programs was inhibited by pretreating leukemic cells with the Bruton's

<sup>1</sup>Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts. <sup>2</sup>Harvard Medical School, Boston, Massachusetts. <sup>3</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts. <sup>4</sup>Institute for Translational Epigenetics, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>5</sup>Center for Molecular Medicine Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. <sup>6</sup>Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts. <sup>7</sup>Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts. <sup>8</sup>Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts.

N.G. Im and A. Guillaumet-Adkins contributed equally to this article.

J.G. Lohr and B. Knoechel contributed equally to this article.

**Corresponding Authors:** Birgit Knoechel, Department of Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215. Phone: 617-632-2072; E-mail: Birgit\_Knoechel@dfci.harvard.edu; and Jens G. Lohr, Division of Hematologic Neoplasia, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Avenue, Boston, MA 02215. Phone: 617-632-2069; E-mail: JensG\_Lohr@dfci.harvard.edu

Cancer Immunol Res 2022;10:1055–68

doi: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0626

©2022 American Association for Cancer Research

tyrosine kinase (BTK) inhibitor ibrutinib, providing a mechanistic explanation for how ibrutinib increases effectiveness of CD19 CAR T-cell cytotoxicity.

## Materials and Methods

### Cell lines

293T and Jurkat cell lines were obtained from ATCC in 2016 and 2015, respectively, NALM-6, REH, and KOPN-8 cell lines were obtained from the Broad Institute's Cancer Cell Line Encyclopedia in 2016. ALL cell lines were cultured in RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific, 11875119) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gemini, 900-208) and 100  $\mu\text{mol/L}$  penicillin/streptomycin (Invitrogen, 15140122). 293T cells were cultured in DMEM (Life Technologies, 11995073) supplemented with 10% FBS and 100  $\mu\text{mol/L}$  penicillin/streptomycin. Cell line authentication was performed by short tandem repeat profiling and reauthentication was performed within the past year. Cultures were tested for *Mycoplasma* contamination and found to be negative. Cells were used for experiments before 20 passages.

Ibrutinib (Selleckchem, S2680) was dissolved in DMSO (Thermo Fisher, BP231100) and titrated.  $\text{IC}_{10}$  concentration for NALM-6 cells was determined after 72 hours using CellTiter-Glo (Promega, G1781) on a Spectramax M5 microplate reader (Molecular devices).

### CD19 CAR T-cell Production

#### Vector and lentivirus production

Two third-generation CD19 CAR constructs containing a single chain variable fragment targeting the FMC63 locus of the CD19 antigen with an intracellular CD3 $\zeta$  as well as 4-1BB and CD28 costimulatory domains were used. Constructs contained a truncated epidermal growth factor receptor (tEGFR), separated from the CAR by a T2A sequence. Construct 1 was obtained from Creative Biolabs (pCAR-T-h; anti-CD19 scFv-CD28-4-1BB-CD3 $\zeta$ ) and consisted of an anti-CD19 single-chain variable fragment, CD8 hinge, CD28 transmembrane domain, 4-1BB/CD3 zeta signaling module, T2A sequence, and a tEGFR. Construct 2 was designed in-house, custom-ordered at Genewiz and cloned in a pLVX-CMV100 vector backbone (Addgene, 110718). The components of construct 2 are displayed in Supplementary Fig. S1A. Construct 1 was used in the experiments unless stated differently. 293T cells were cotransfected with the CAR lentiviral construct, psPAX2 (Addgene, 12260) and pCMV-VSV-G (Addgene, 8454) packaging vectors using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000015) according to the manufacturer's protocol. Lentivirus-containing medium was collected, and fresh medium added after 12 hours, 24 hours, and 36 hours. Virus-containing media was filtered and concentrated by ultracentrifugation for 2 hours at 49,000  $g$  at 4°C.

#### T-cell isolation and transduction

Human blood from healthy donors was obtained from Research Blood Components, LLC, or the Crimson Core of the Brigham and Women's Hospital. Mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque PLUS (Global Life Sciences Solutions USA LLC, 45001750). PBMCs were further processed by isolating CD3 $^{+}$  T cells with the EasySep Human T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies, 19051) with an EasySep Magnet (STEMCELL Technologies, 18000) according to the manufacturer's protocol. For CD4 $^{+}$  T-cell purification, selection was performed using EasySep Release Human CD4 Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies, 17752) according to the manufacturer's protocol.

Isolated T cells were activated by Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific, 11132D) and cultured in X-VIVO 15 Media (Lonza, 04-418Q) supplemented with 5% human serum (Sigma-Aldrich, H4522). 50 IU/mL IL2 (Miltenyi Biotec, 130-097-743) was added every other day. One day after isolation, T cells or Jurkat cells were infected by spinoculation at multiplicity of infection (MOI) = 5. After 7 days, infection efficiencies were determined by flow cytometry as described below using a hEGFR-specific antibody (Biotinylated, Cetuximab; R&D Systems, FAB9577B-100) and a secondary allophycocyanin (APC) streptavidin-conjugated antibody (BD Biosciences, 554067). CAR-expressing cells were isolated by magnetic isolation using the EasySep Release Human Biotin Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies, 17653) according to the manufacturer's protocol. Persistent expression of the CAR construct (detected using biotinylated anti-hEGFR - Cetuximab, R&D Systems; and secondary APC Streptavidin-conjugated antibody; BD Biosciences) and CD8 percentage (HIT8a, BioLegend, 300912) was assessed by flow cytometry prior to coculture (Supplementary Fig. S1B). Activation beads were removed after 10 days with restimulations according to the manufacturer's protocol. Uninfected T cells from the same donor or uninfected Jurkat cells were maintained in parallel and used as controls.

#### Flow cytometry and single-cell sorting

CAR T cells were stained for CD3 phycoerythrin (PE; HIT3a, BioLegend, 300308), CD8 APC (HIT8a, BioLegend, 300912) and hEGFR (Biotinylated, Cetuximab; R&D Systems, FAB9577B-100) using a secondary APC Streptavidin-conjugated antibody (BD Biosciences, 554067). B-ALL target cells were stained for CD19 PE (HIB19, BioLegend, 302208), CD40 PE (5C3, BioLegend, 334307) or, where applicable, a primary unconjugated CD19 (HIB19, BioLegend, 302202) and a secondary PE-conjugated goat anti-mouse IgG (Poly4053, BioLegend, 405307). Fixation and permeabilization for intracellular staining were performed using the BD Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences, 555028) according to the manufacturer's protocol. Cells were stained with 7-AAD (Thermo Fisher Scientific, A1310) to exclude dead cells. Cell nuclei were stained with DAPI (1  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma-Aldrich, D9542). B-ALL target cells were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Thermo Fisher Scientific, C34554), as indicated.

Samples were analyzed on a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) or BD FACSMelody (BD Biosciences) with compensation being performed by AbC Total Antibody Compensation Bead Kit (Thermo Fisher Scientific, A10497) or single-stained controls. Where applicable, absolute cell counts were measured with Precision Count Beads (BioLegend, 424902).

Flow cytometric analyses were performed with FlowJo V10 (BD Biosciences). CD19 fluorescence signal was normalized to the mean fluorescence intensity of CD19 in control leukemia cells that were not cocultured with any effector cells.

For scRNA-seq and scATAC-seq experiments, NALM-6 cells were stained for CD19 and the 30% highest CD19-expressing cells (CD19 $^{\text{high}}$  cells) were sorted and rested overnight. The next day, sorted CD19 $^{\text{high}}$  cells were labeled with CFSE (Thermo Fisher Scientific, C34554), counted and cocultured at  $1 \times 10^5$  target cells with CAR T cells or uninfected T cells in a 5E:1T ratio for 24 hours in 96-well round bottom plates. After coculture, cells were stained with 7-AAD (Thermo Fisher Scientific, A1310) and anti-CD19 PE (HIB19, BioLegend, 302208) antibody. Subsequently, 7-AAD-negative and CFSE $^{+}$  NALM-6 cells were sorted into 96-well plates (Thermo Fisher, E0030129504) containing TCL buffer (Qiagen, 1031576) and 1% 2-Mercaptoethanol (Life Technologies, 21985023) based on CD19

expression (Supplementary Table S1) using a Sony SH800 sorter. Plates were spun down immediately, flash frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing.

### Coculture experiments

NALM-6, REH and KOPN-8 cells were labeled with CFSE (Thermo Fisher Scientific, C34554) and used as target cells (Target, T).  $1 \times 10^5$  target cells were cocultured with CAR T cells or CAR Jurkat cells (Effector, E) at an E:T ratio of 1:1, 2:1, and 5:1 in a 96-well round bottom plate for 1, 2, 4, 6, 12, and 24 hours in X-VIVO 15 media supplemented with 5% human serum. After coculture, cells were stained with 7-AAD (Thermo Fisher Scientific, A1310) and an anti-CD19 PE (HIB19, BioLegend, 302208) and analyzed on a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) or BD FACSMelody (BD Biosciences) with compensation being performed by AbC Total Antibody Compensation Bead Kit (Thermo Fisher Scientific, A10497) or single-stained controls. Cytotoxicity was calculated as number of 7-AAD-positive (dead) target cells divided by total number of target cells.

Where applicable, 7-AAD-negative target cells were isolated from effector cells after 24 hours of coculture using a Sony SH800 sorter. Sorted target cells were taken back into culture and viability was assessed by trypan blue staining using a Neubauer cell counting chamber (Fisher Scientific, 026716) after 24 hours, 48 hours, and 72 hours.

For reexposure experiments, NALM-6 cells were cocultured with CAR T cells or uninfected T cells at an E:T ratio of 2:1 in a 96-well round bottom plate overnight. Cells were then pooled and NALM-6 cells were isolated from effector cells using the EasySep Human CD3-Positive Selection Kit II (STEMCELL Technologies, 17851) according to the manufacturer's protocol. Successful isolation was assessed by positivity of CFSE-labeling via flow cytometry. NALM-6 cells were subsequently reexposed to fresh effector cells at an E:T ratio of 2:1 in a 96-well round bottom plate for 6 hours. After coculture, cells were stained with 7-AAD and analyzed as described above.

For transwell experiments, cytotoxicity assays were performed in a Corning HTS Transwell-96 system with  $0.4 \mu\text{m}$  pore size (Sigma-Aldrich, CLS3381). For ibrutinib experiments, NALM-6 cells were pretreated with ibrutinib for 72 hours at  $\text{IC}_{10}$  dosing. To exclude dead cells, NALM-6 cells were then ficolled, washed, counted, and cocultured with effector cells either in presence of DMSO (Thermo Fisher, BP231100) or ibrutinib at  $\text{IC}_{10}$  dosing for 6 hours. After coculture, cells were stained with 7-AAD and analyzed as described above.

### Microscopy

Live cell imaging was performed in X-VIVO 15 media without phenol red (Lonza, 04-744Q) supplemented with 5% human serum. NALM-6 cells were labeled with CFSE or an AF647-conjugated anti-CD19 (HIB19, BioLegend, 302220). A stage top incubator was used to maintain constant humidified  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  flow at  $37^{\circ}\text{C}$  (Okolab).  $1 \times 10^6$  cells were seeded on a Petri dish and allowed to settle for at least 30 minutes before starting the timelapse. CAR T cells were carefully added at a 1:1 ratio. Where applicable, SYTOX Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, S11348) was added to the media at 1 mmol/L.

For holotomography-based three-dimensional live microscopy, interactions were recorded by measurement of refractive index and CFSE fluorescence signal using a 3D Cell Explorer microscopy system with a  $60\times$  magnifying objective at  $512 \times 512$  resolution (Nanolive). Images were further processed with Nanolive's software STEVE v1.6.3496 to display three-dimensional timelapses.

For CD19 antigen movement tracking, a Nikon Eclipse Ti microscope system recorded interaction sites every 10 minutes for 6 hours with a  $20\times$  magnifying objective at  $2048 \times 2048$  resolution. Z-stack images were recorded focusing on the middle layer of the cells as well as  $2 \mu\text{m}$  above and below using Nikon's Perfect Focus System. Four-dimensional hyperstacks (x-, y-, z-, and time axis) were assembled using the Fiji distribution of ImageJ 1.52p. For representative still images, effector cells were pseudo-colored in orange. Cells were first analyzed qualitatively with respect to CD19 clustering and internalization. Interactions were characterized as "cluster formation," when CD19 clustering was observed in at least two sequential frames or if CD19 clustering was followed by CD19 internalization in two sequential frames. Interactions that did not meet these criteria but lasted for at least two sequential frames were characterized as "no cluster." Dead cells were determined by positivity of SYTOX Blue Stain. Analysis only included NALM-6 cells that were SYTOX Blue-negative at time of analysis unless stated differently. Mean fluorescence intensity of the three Z-stack images was then quantified in the Fiji distribution of ImageJ 1.52p. Photobleaching was accounted for by normalizing to the mean loss of fluorescence after 6 hours in NALM-6 cells that did not interact with any effector cells in the recorded frames during the same experiment. Analysis was performed in a blinded manner.

### scRNA-seq library preparation

Full-length scRNA-seq libraries were prepared using the SMART-seq2 protocol (20). As described above, cells were sorted into 96-well plates containing  $10 \mu\text{L}$  TCL buffer (Qiagen, 1031576) and 1% 2-mercaptoethanol. RNA was purified using RNAClean XP beads (Beckman Coulter, A63987) according to the manufacturer's protocol and reverse transcribed using Maxima RNase H-minus (Thermo Fisher Scientific, FEREP0752) in the presence of oligo-dT30VN (Integrated DNA Technologies, (/5BiosG/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN), template-switching oligonucleotides (Qiagen, /5BiosG/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G), and betaine (Sigma-Aldrich, B0300-5VL). cDNA was then amplified using the KAPA HiFi Hotstart ReadyMix (Kapa Biosystems, KK2602) with ISPCR primers (Integrated DNA Technologies, (/5BiosG/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT). After purification with Agencourt Ampure XP beads (Beckmann Coulter, A63881), product size distribution was assessed on a Bioanalyzer using a High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, 5067-4626) and quantified by Qubit (Thermo Fisher Scientific, Q32854), followed by fragmentation and indexing using Nextera XT, and Nextera PCR primers (Illumina, FC-131-1096). Libraries were pooled and paired-end sequencing was performed on a NextSeq 500 (Illumina) aiming for sequencing depth of 1 million reads per single cell.

### scATAC-seq library preparation

Single-cell ATAC-seq libraries were prepared following the protocol by Chen and colleagues (21). NALM-6 cells were presorted, cocultured, and processed as described above (see Flow cytometry and single-cell sorting), followed by DAPI-staining ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma-Aldrich, D9542) and sorting into 96-well plates containing lysis buffer [recipe as described by Chen and colleagues (21): 2X lysis buffer - 100 mmol/L Tris.HCl, pH 8.0 (Boston BioProducts, BM-320); 100 mmol/L NaCl (Sigma-Aldrich, 71386); 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K (Ambion, AM2546); 0.4% SDS (Boston BioProducts, BM-230A)] and Nextera XT indexes (Illumina, FC-131-1096). Libraries were pooled and purified using a Qiagen MinElute PCR purification kit (Qiagen, 28004) followed by size selection using

Agencourt Ampure XP beads, (Beckman Coulter, A63881). Paired-end sequencing was performed on a NextSeq 500 aiming for sequencing depth of 1 million reads per single cell.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9. Normal distribution was tested using the D'Agostino and Pearson test or the Shapiro–Wilk test unless otherwise indicated. For parametric data, the two-tailed unpaired Student *t* test was used, or an ordinary one-way ANOVA with Tukey multiple comparisons in data with more than two groups. For nonparametric data, the two-tailed Mann Whitney test was used, or Kruskal–Wallis test with Dunn multiple comparisons testing in data with more than two groups.

### Processing of scRNA-seq data and quality filtering

Raw sequencing reads were trimmed using trimmomatic and aligned to the hg19 genome using STAR (22) with the following parameters ‘-twopassMode Basic -alignIntronMax 100000 -alignMatesGapMax 100000 -alignSJDBoverhangMin 10 -alignSJstitchMismatchNmax 5 -1 5 5. HTSeq (23) and RSEM (24) were used to calculate raw counts and normalized transcript per kilobase million (TPM) values from the aligned bam files.

Four different parameters were used to filter out low quality cells – library size, number of detected genes, percentage of reads mapping to mitochondrial genes, and percentage of reads mapping to house-keeping genes. Cells were distributed according to these parameters and determined as low quality when falling beyond three median absolute deviations.

### Analysis of scRNA-seq profiles

Clustering of high-quality cells was performed using PAGODA2 (ref. 25; <https://github.com/kharchenkolab/pagoda2>). Due to batch effects, one cluster was uniquely formed by cells from one well plate, and thus excluded from further analysis. Seven clusters were identified using multilevel graph-based clustering within PAGODA2.

Each individual cell was analyzed for expression of G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>–M, and S phase markers to predict the cell-cycle phase using Seurat2 (ref. 26; <https://github.com/satijalab/seurat>). The findMarkers function in the scran package (<https://github.com/elswob/SCRAN>) was used to identify differentially regulated genes in each of these clusters. The mean log<sub>2</sub>FC of differentially regulated genes in each cluster compared with all other clusters was used to perform gene set enrichment analysis (GSEA) on all hallmark gene sets. Monocle2 (refs. 27, 28; <http://cole-trapnell-lab.github.io/monocle-release/>) was employed to discover distinct transcriptional states within the NALM-6 cells cocultured with CAR T cells. Transcriptional regulons associated with each Monocle2 state were determined using SCENIC (ref. 29; <https://github.com/aertslab/SCENIC>).

Signatures for hematopoietic cell types were derived from previously published literature comprising bulk RNA-seq studies on purely sorted immune populations (30, 31). The preB signature was taken from the Human Cell Atlas (32). The germinal center signatures were derived from Holmes and colleagues (33). The genes in each of these signatures were scored using the AUCell package (<https://github.com/aertslab/AUCell>). The mean Z-scores of a cell type of each state were chosen for further visualization.

### Analysis of published RNA-seq datasets

Gene expression data from bulk-sorted populations of human naïve B cells and germinal center B cells from Holmes and colleagues (33) were analyzed. All three datasets for the naïve B cells and for the

germinal center B cells from three independent donors were used. The gene expression count matrix (TPM) was analyzed using R version 4.0.1 and the ggplot2 package (<https://github.com/tidyverse/ggplot2>).

### Processing of scATAC-seq data

The reads from scATAC-seq samples were aggregated by each 96-well plate prior to peak calling and analyzed using the nf-core ATAC pipeline (34) with the ‘-narrowPeak’ parameter, employing MACS2 for peak calling and HOMER for annotation of peaks. In total, the union of all peak calls resulted in 33,125 consensus peaks. For gene-enhancer relationships, annotations were derived from GREAT (35). Raw fastq files from individual scATAC-seq samples were processed using the snapATAC pipeline (<https://github.com/r3fang/SnapATAC>). Briefly, single-cell bam files were processed to obtain read counts in the consensus peaks. Peaks were resized to a fixed width of 500 bp, centered at the summit and overlapping peaks were removed. Filtering was performed using the parameters ‘min\_depth = 1,500, min\_in\_peaks = 0.15’. Clustering of cells was performed using cisTopic (36) (<https://github.com/aertslab/cisTopic>) and densityClust (37) and visualization of clusters using uniform manifold approximation and projection (UMAP). Differential motif accessibility was investigated using ‘chromVAR’ (38) (<https://github.com/GreenleafLab/chromVAR>). Motifs were imported from the JASPAR database and differential accessibility was determined using the ‘differentialDeviations’ function. Bias-corrected deviation and mean Z-scores were calculated and used for visualization.

### Data availability

Sequencing data are deposited in GEO under accession number GSE176418. All other data are available within the manuscript and its accompanying Supplementary Data files or from the corresponding author upon reasonable request.

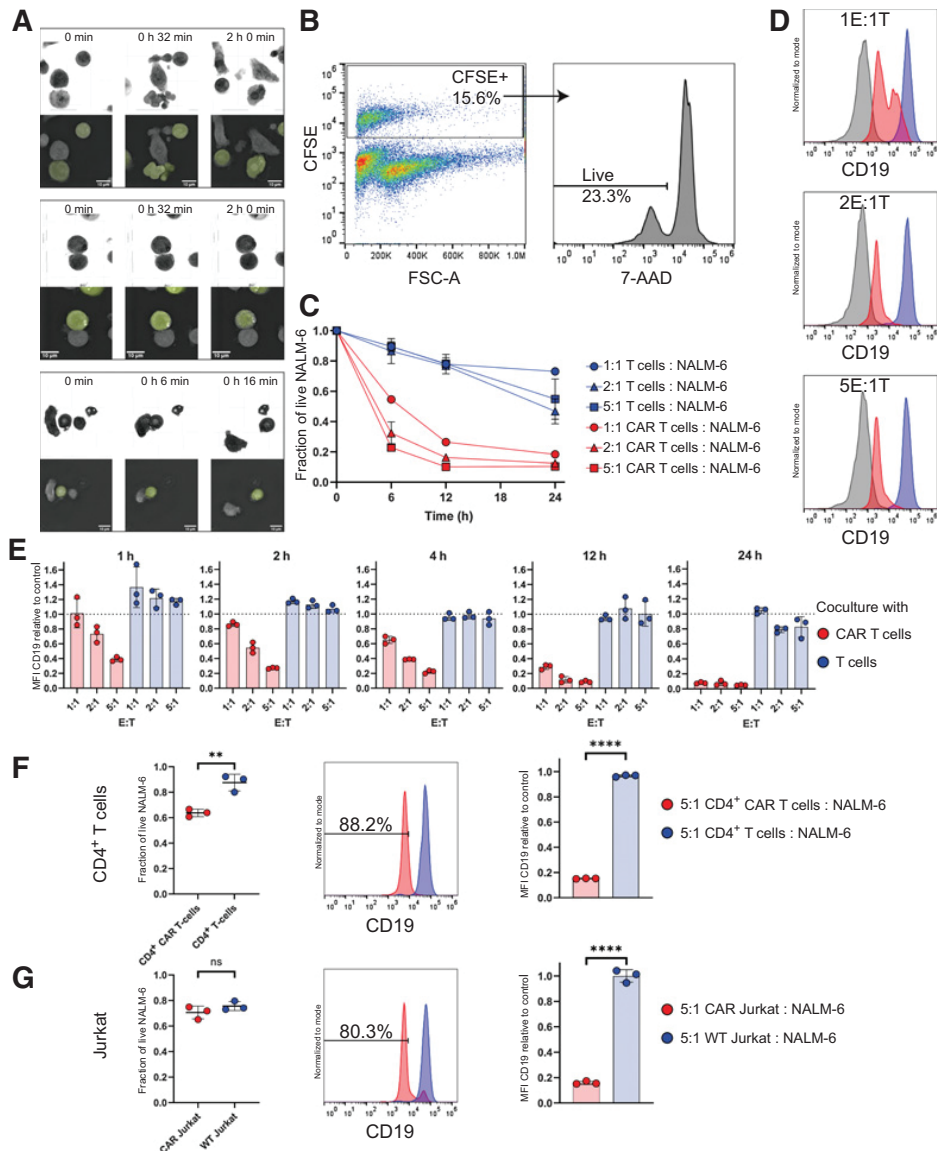
### Code availability

For processing of sequencing data, we used trimmomatic, STAR aligner, HTSeq, RSEM and the nf-core ATAC pipeline, and for downstream analysis R version 4.0.1, python 2.7.2 and the following packages: PAGODA2, MONOCLE2, SingleR, scran, SCENIC, Seurat, chromVAR, cisTopic, all of which are available on github.

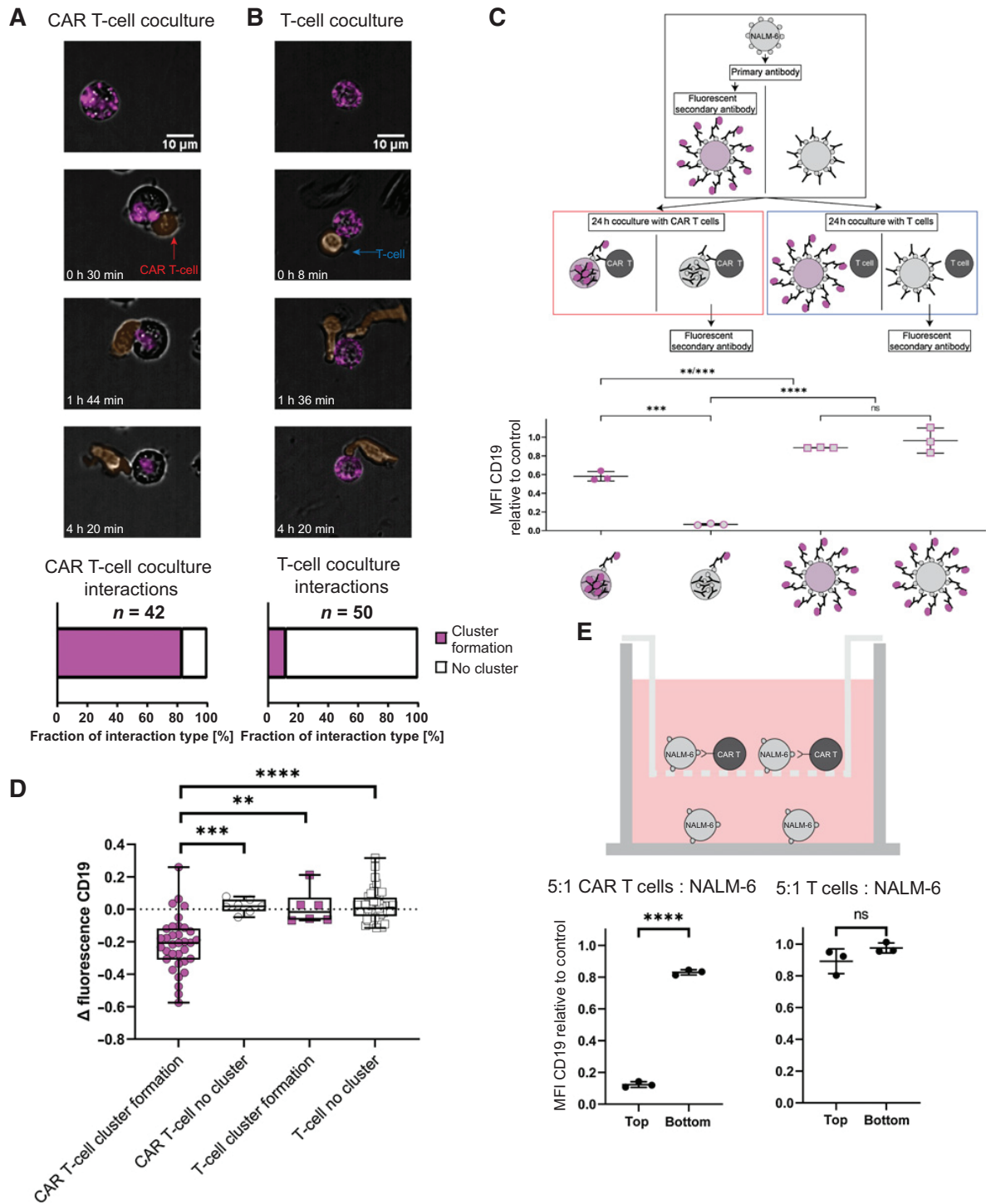
## Results

### CD19 CAR T cells cause CD19 internalization, reducing surface expression on CD19<sup>+</sup> B-ALL cells

To investigate possible early escape of CD19-expressing B-ALL leukemic cells from CD19 CAR T cells, we first analyzed interactions between CD19 CAR T cells and NALM-6, a CD19<sup>+</sup> B-ALL cell line. For these studies, we used commercially available or in-house designed third-generation CD19 CAR constructs containing 4–1BB and CD28 costimulatory domains, which we expressed in T cells isolated from blood of normal donors. Using holotomography-based three-dimensional live microscopy, CAR T-cell engagement with the NALM-6 cells was identified by cell–cell contacts suggesting immunologic synapse formation, as has previously been reported (39). We identified three major types of interactions between CAR T cells and B-ALL cells (Fig. 1A; Supplementary Movies S1–S3): (i) Effective cytotoxic killing was shown by the leukemia cell blebbing after approximately 20 minutes and subsequent nuclear condensation within 1 hour (Supplementary Movie S1); (ii) “Scanning interactions” were characterized by CAR T-cell–



**Figure 1.** CD19 CAR T-cell treatment induces rapid reduction of CD19 surface protein on B-ALL cells. **A**, Three-dimensional holotomography-based live cell microscopy reveals different types of interactions between CD19 CAR T cells and NALM-6 B-ALL cells (60× magnification). Upper sections show refractive index, lower sections show selected two-dimensional Z-stack slice (slice 0, 0 and 15 respectively) for identification of CFSE-labeled NALM-6 target cells. Top, productive interaction with cell-cell contacts suggesting immunologic synapse formation, target-cell blebbing and nuclear condensation (Supplementary Movie S1). Middle, sustained immunologic synapse without cytotoxicity (Supplementary Movie S2). Bottom, leukemia cell escape after interaction (Supplementary Movie S3). **B–E**, CFSE-labeled B-ALL NALM-6 cells (Target, T) were cocultured with either CD19 CAR T cells or uninfected T cells (Effector, E). Quantification of 7-AAD-negative live cells and CD19 expression performed by flow cytometry. Data are representative of at least two independent experiments from two different T-cell donors,  $n = 3$ . **B**, Gating strategy to identify CFSE<sup>+</sup> (left) and 7-AAD<sup>-</sup> live (right) target cells in a representative 5E:1T CAR T cell coculture sample. **C**, Cell viability of NALM-6 B-ALL cells after 6, 12, and 24 hours coculture with CD19 CAR T cells (red) compared with the viability of NALM-6 B-ALL cells cocultured with uninfected T cells (blue). **D**, Representative histograms demonstrating CD19 expression on live NALM-6 cells (target cell population) with increasing E:T ratios after 6 hours of coculture with CAR T cells (red histogram) or uninfected control T cells (blue histogram). Gray histograms show CD19<sup>negative</sup> T cells from the same experiment. **E**, Normalized mean fluorescence intensity (MFI) for CD19 expression on live NALM-6 B-ALL cells cocultured at the indicated E:T ratios for 1, 2, 4, 12, and 24 hours (data normalized to triple-stained (CD19-PE, CFSE, 7-AAD) control cells that have not been cocultured with effector cells). **F–G**, Reduced CD19 expression on B-ALL cells after exposure to CD4<sup>+</sup> CAR T (**F**) or CAR Jurkat (**G**) cells is independent of CAR effector killing efficacy. CD4<sup>+</sup> CAR T-cells or CAR Jurkat cells cocultured with NALM-6 B-ALL target cells at an E:T ratio of 5:1 for 24 hours. Left, remaining fraction of live NALM-6 cells; middle, CD19 expression (MFI) on live NALM-6 cells; right, relative mean CD19 surface expression. Data representative of two independent experiments with  $n = 3$  each (red = NALM-6 cells from CAR T-cell coculture, blue = NALM-6 cells from uninfected T-cell coculture).  $P$  values determined by unpaired two-tailed Student  $t$  test. ns =  $P > 0.05$ ; \*\*, =  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*, =  $P < 0.0001$ . Data are mean  $\pm$  SD.



**Figure 2.**

CD19 CAR T cells promote target receptor clustering and internalization in B-ALL cells. **A** and **B**, Time lapse of CD19 distribution in NALM-6 B-ALL cells interacting with CAR T cells (**A**) or uninfected control T cells (**B**). Effector and target cells were cocultured at a 1:1 ratio for 6 hours (end point), at 20x magnification. Scale bar length 10  $\mu$ m. Effector cells pseudo-colored in orange, CD19 labeled with an AF647-conjugated anti-CD19. (Continued on the following page.)

leukemia cell interactions in which contacts were sustained over at least two hours without subsequent cytotoxic activity (Supplementary Movie S2); (iii) “Escape interactions” occurred when leukemia cells moved away within an hour of initial contact with a CAR T cell (Supplementary Movie S3).

We hypothesized that these differences in interactions may be related to heterogeneous expression of the target antigen CD19. To address this question, we used flow cytometry to measure CD19 expression by NALM-6 cells after coculture with CD19 CAR T cells and compared CD19 expression levels with cytotoxicity. Increased time of coculture and increased E:T ratio led to more killing of leukemia cells (Fig. 1B and C). However, among the remaining live leukemia cells in these conditions, we detected progressively reduced levels of CD19 expression with higher E:T ratios and longer periods of coculture, resulting in more than 95% downregulation of CD19 expression compared with CD19 expression of control NALM-6 cells that had not been cocultured with any effector cells after 24 hours (Fig. 1D and E). To confirm that the remaining leukemia cells were viable, we sorted live NALM-6 cells and monitored cell viability for 24 hours, 48 hours, and 72 hours after removal from coculture. Viability of CAR T-cell exposed leukemia cells remained relatively stable over the course of 72 hours (50% after 48 hours, 58% after 72 hours), and the expression of CD19 recovered, underscoring that a significant fraction of the leukemia cells that survive CAR T-cell cytotoxicity are viable (Supplementary Fig. S2A and S2B). We next assessed whether these CD19<sup>low</sup> expressing leukemic cells were refractory to CAR T-cell killing. Indeed, NALM-6 cells that had been cocultured with CD19 CAR T cells overnight and were reexposed to fresh CD19 CAR T-cells escaped CAR T cell-mediated killing (viability 98.85% vs. 63.91%; Supplementary Fig. S2C).

To ensure that CD19 downregulation was induced by CAR T-cell – leukemia cell interactions and not due to selection of preexisting CD19<sup>low</sup> leukemia cells, we performed coculture experiments using either CD4<sup>+</sup> CAR T cells or Jurkat cells transfected with the CAR construct, both of which are less cytotoxic than CD8<sup>+</sup> CAR T cells. Using a mixture of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CAR T cells at a 5:1 E:T ratio, only 10% of NALM-6 cells survived after 24 hours of coculture (Fig. 1C). Using the same coculture conditions, 64% and 71% of leukemia cells survived in the CD4<sup>+</sup> CAR T cell and CAR Jurkat cell cocultures, respectively (Fig. 1F and G). Although the majority of leukemia cells survived in these cocultures, the degree of CD19 downregulation was similar to that observed among leukemia cells cocultured with a mixture of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CAR T cells (Fig. 1F and G compared with Fig. 1E) and leukemia cells exhibited an 85% and 84% downregulation of CD19 expression when exposed to CD4<sup>+</sup> CAR T cells or CAR Jurkat cells, respectively, (Fig. 1F and G right) compared with CD19 expression of NALM-6 cells without coculture of any effector

cells (control). Experiments using two other B-ALL cell lines, REH and KOPN-8, provided similar results (Supplementary Fig. S3). These data suggest that the occurrence of CD19<sup>low</sup> expressing cells is mediated by active processes induced by CAR T cells causing CD19 downregulation rather than by selection of preexisting CD19<sup>low</sup> cells.

### Reduced CD19 surface expression is accompanied by CD19 internalization

To analyze the kinetics of decreased CD19 expression, we recorded time-lapse images of CAR T-cell–leukemia cell interactions using live microscopy tracking the CD19 protein in the leukemia cells. When interacting with the CAR T cells, CD19 first clustered at the interface of the interaction with CAR T cells (Fig. 2A; Supplementary Movie S4; Supplementary Image File S1). These clusters were primarily seen in leukemia cells interacting with CAR T cells; in cocultures with uninfected T cells, there was no change in CD19 antigen distribution (Fig. 2B; Supplementary Movie S5).

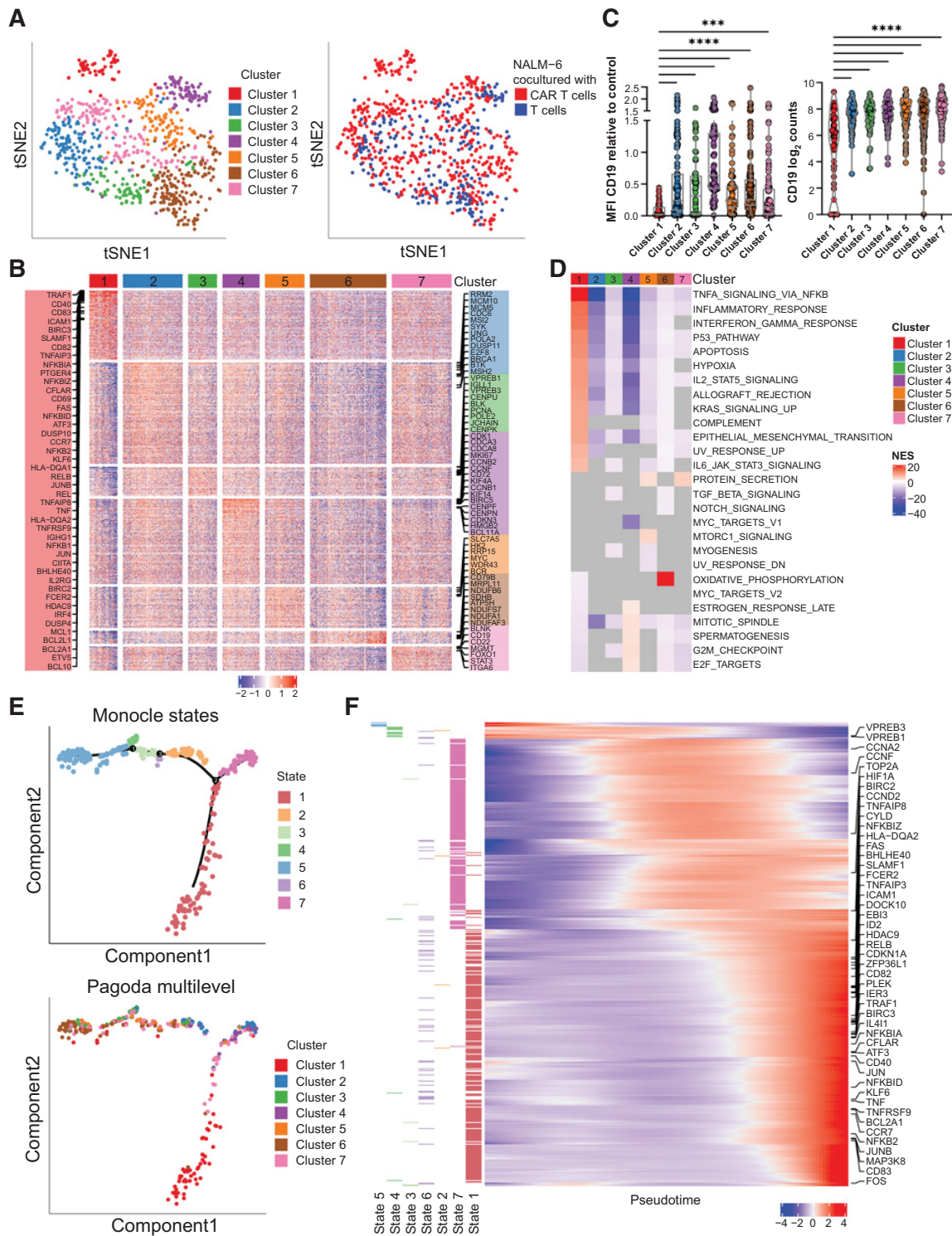
During and after interaction with CAR T cells, CD19-specific antibody fluorescence was detectable inside the leukemia cell, indicating that CD19 is internalized after cluster formation (Fig. 2A). To further evaluate this hypothesis, we stained NALM-6 cells with an anti-CD19 prior to coculture with subsequent staining using a fluorescently tagged secondary antibody either before or after the 24 hours coculture (Fig. 2C). Staining with the secondary antibody after coculture led to significantly decreased surface fluorescence intensity compared with staining before coculture (58.16% vs. 6.61%,  $P$  value = 0.0001), consistent with CD19 internalization (Fig. 2C), which we confirmed by intracellular flow cytometry for CD19 (Supplementary Fig. S4). Cytotoxicity of the CAR T cells was not affected by the presence of the anti-CD19 during coculture, thus excluding interference of the CD19-specific antibody with target epitope recognition by the CAR T cells (Supplementary Fig. S5).

When accounting for antibody bleaching, we observed a significant reduction of CD19 signal within the cells that formed clusters when interacting with CAR T cells (Fig. 2D), suggesting that these leukemia cells may degrade CD19 after internalization. In contrast, leukemia cells that interacted with CAR T cells without cluster formation or leukemia cells that interacted with uninfected T cells did not show changes in fluorescence intensity on either the cell surface or intracellularly.

Leukemia cells that were killed by CAR T cells demonstrated reduced CD19 expression after six hours of coculture (Supplementary Fig. S6), implying that internalization of CD19 is triggered by CD19–CAR interactions independent of cytotoxic or apoptotic outcomes.

To exclude the possibility that soluble mediators such as cytokines were causing CD19 internalization, we performed coculture assays in

(Continued.) **A**, Representative interaction of a CAR T cell and a NALM-6 B-ALL cell with CD19 clustering and internalization characterized as “cluster formation” (Supplementary Movie S4) with quantification below (83.33% of CAR T – NALM-6 interactions showed CD19 cluster formations during interactions). **B**, Representative interaction of a control uninfected T cell and a NALM-6 B-ALL cell with no change in CD19 distribution characterized as “no cluster” (Supplementary Movie S5) with quantification below (88% of T cell – NALM-6 interactions do not show a change of CD19 distribution). **C**, Experimental work-flow to quantify CD19 internalization. Target cells stained with primary unconjugated anti-CD19 and secondary PE-conjugated antibody either before or after 24 hours of coculture. PE-conjugated antibody staining after 24 hours of coculture only stains CD19 molecules on the cell surface that were not internalized [data normalized to triple-stained (CD19 PE, CFSE, 7-AAD) control cells that have not been cocultured with effector cells, representative of two independent experiments,  $n = 3$ .  $P$  values determined by Tukey multiple comparisons test]. **D**, Fluorescence intensity decreases in CAR T cell-exposed NALM-6 cells with CD19 “clustering” over 6 hours compared with uninfected control T cell-exposed NALM-6 cells. Boxplots show minimum, 25th percentile, median, 75th percentile and maximum values.  $P$  values determined by two-tailed Mann Whitney test. **E**, Top, schematic of transwell assay to determine influence of soluble mediators for CD19 internalization. Bottom, mean fluorescence intensity of CD19 expression by live target cells in bottom well after 24 hours of coculture (data normalized to triple-stained (CD19 PE, CFSE, 7-AAD) control cells that have not been cocultured with target cells).  $P$  values determined by unpaired  $t$  test,  $n = 3$ . \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns = not significant. Data are mean  $\pm$  SD.





transwells, where leukemia cells that did not interact with CAR T cells shared the same media with leukemia cells cocultured with CAR T cells (Fig. 2E). In this scenario, CD19 expression by the leukemia cells not able to contact CAR T cells did not change.

Taken together, these data demonstrate that direct interaction between the CAR and CD19 is necessary for CD19 clustering, internalization, and downregulation.

### scRNA-seq reveals B cell-activation signatures in a subset of B-ALL cells interacting with CAR T cells

CD19 cluster formation is a well-described phenomenon of B-cell activation in response to BCR stimulation by ligand (19). We hypothesized that CD19 clustering and internalization may lead to transcriptional programs of B-cell activation, similar to what has been described upon BCR stimulation-induced CD19 clustering in normal B cells. To address this question, we performed scRNA-seq of surviving leukemic cells after coculture with CAR T cells for 24 hours and compared these data with scRNA-seq of leukemic cells cocultured with uninfected T cells. For these experiments, leukemic cells were presorted for high CD19 expression to exclude preexisting cells expressing low CD19 prior to coculture.

A total of 1,039 cells were sorted and sequenced based on CD19 expression after coculture, with 831 cells remaining after quality filtering steps (Supplementary Fig. S7A and S7B). Pagoda2 clustering and visualization by t-Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) revealed a total of 7 clusters. Clusters 2 to 7 contained a mixture of leukemic cells cocultured with CAR T cells and uninfected T cells (Fig. 3A; Supplementary Table S2). In contrast, cluster 1 solely consisted of leukemic cells that had been cocultured with CAR T cells (Fig. 3A).

To understand how the clusters differed from each other, we first assessed differences in cell cycle, a known driver of cluster formation in single-cell analysis (40) using Seurat2 (26). We found that clusters 2 and 3 were enriched for cells in S-phase and clusters 4 and 5 for cells in G<sub>2</sub>-M phase (Supplementary Fig. S8). Cluster 7 was enriched for cells in G<sub>1</sub>, whereas clusters 1 and 6 showed a mixture of cell-cycle phases. Accordingly, marker gene analysis of the respective clusters revealed expression of genes involved in cell-cycle regulation, such as *CDK1*, *CDC20*, *CCNB1/B2*, *CCNF*, *CDCA2/3/5/8*, *MKI67*, *HMGB2*, *TOP2A* in cluster 4, and *MYC* and *RRP15* in cluster 5 (Fig. 3B; Supplementary Table S3). Consistent with cells in S-phase, clusters 2 and 3 showed high expression of DNA synthesis and repair genes such as *RRM2*, *MCM5/10*, *PCNA*, and *POLE2*, *BRCA1*, *MSH2*. Cells in cluster 6 expressed various genes of the NADH:ubiquinone oxidoreductase and ATP synthase subunits, both of which are involved in the mitochondrial respiratory chain. In addition, clusters 2 to 6 expressed genes that are part of several known signaling pathways in B cells – *SYK* and *BTK* expression were highest in cluster 2; *VPREB1/3*, *IGLL1*, *BLK*, and *JCHAIN* highest in cluster 3; *CD72* highest in cluster 4; *BCR*

highest in cluster 5; *CD79B* highest in cluster 6; and *BLNK*, *CD19* and *CD22* highest in cluster 7 (Supplementary Table S3).

Cluster 1, which was the only cluster consisting exclusively of leukemic cells exposed to CD19 CAR T cells, demonstrated the lowest CD19 expression of all clusters, both at the protein (Fig. 3C, left; Supplementary Table S4) and transcript level (Fig. 3C, right). We therefore hypothesized that this cluster might represent a unique population of leukemic cells refractory to CAR T cells. This cluster demonstrated strong enrichment of B-cell activation signatures with expression of *CD69*, *CD40*, and *CCR7*. To test whether these transcriptional changes reflected protein expression, we assessed CD40 protein expression by flow cytometry. We observed increased CD40 expression in NALM-6 cells that survived CAR T-cell coculture (Supplementary Fig. S9). Cluster 1 also expressed genes involved in the NFkB- and CD40-signaling pathway (*NFKB2*, *NFKBIA/D/Z*, *RELB*, *TRAF1*, *TNF*, *TNFAIP3/8*, *BCL2A1*; Fig. 3B and D). GSEA revealed enrichment for NFkB signatures, several other immune response signatures related to cytokines (IFN $\gamma$  response, IL2-STAT5 signaling, and IL6-JAK-STAT3 signaling) and inflammatory response signatures, indicating the activation of immunomodulatory pathways in cluster 1 cells (Fig. 3D; Supplementary Table S5). These data suggest that CAR-mediated CD19 crosslinking causes transcriptional programs of B-cell activation in a subset of B-ALL cells.

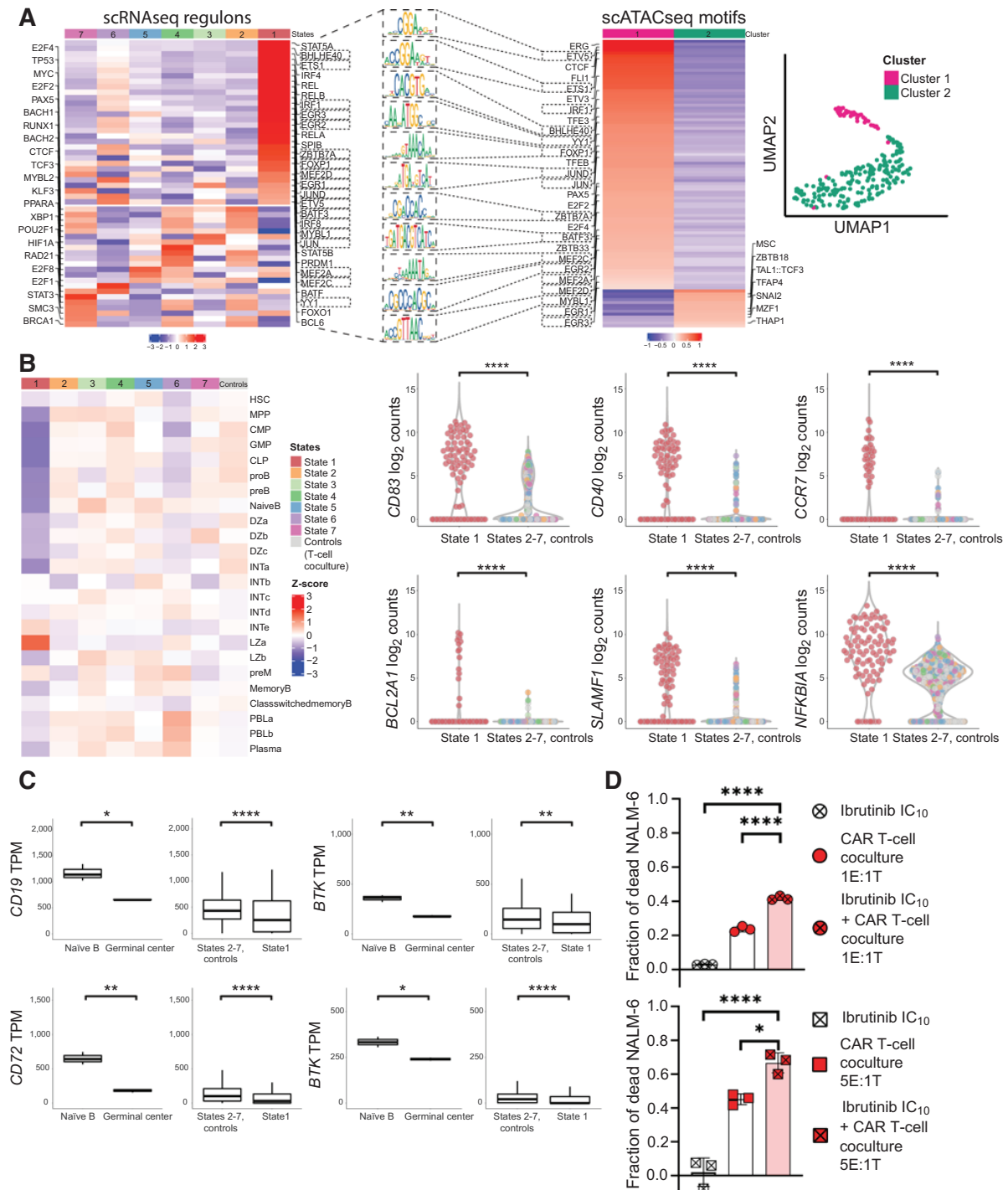
To gain further insights into the transcriptional dynamics of CAR T cell-exposed B-ALL cells, we employed pseudotime analysis by Monocle2. This analysis revealed seven distinct states distributed along a single common trajectory (Fig. 3E, top). State 5 cells at one end of the trajectory showed high expression of two genes, *VPREB1* and *VPREB3*, that are normally expressed in preB cells (Fig. 3F; ref. 41). Genes informing the pseudotemporal distribution were also involved in cell-cycle regulation (*CCNA2*, *CCNF*, *TOP2A*, *CDK1*). State 1 cells, which consisted of Pagoda2 cluster 1 cells, were located at the opposite end of the trajectory (Fig. 3E, bottom). Cells towards this end of the pseudotime distribution exhibited increased expression of genes involved in NFkB signaling (*NFKBIZ*, *NFKBIA*, *TNFAIP3*, *NFKBID*, *NFKB2*, *RELB*, *NFKB1*, *TNFAIP9*, *FCER2*) and CD40 signaling (*CD40*, *CD80*, *TRAF1*, *ICAM1*, *CFLAR*, *BCL2A1*, *EBI3*), consistent with the identified marker genes of cluster 1 (Fig. 3F; Supplementary Table S6). These analyses suggest a continuous differentiation process of leukemic cells with state 1 cells representing the most differentiated state, exclusively containing CAR T cell-exposed CD19<sup>+</sup> B-ALL cells.

### A subset of CAR T cell-exposed B-ALL cells activates germinal center-reaction regulatory programs

B-cell activation normally leads to B-cell differentiation and initiation of the germinal center reaction, processes that are tightly regulated by master transcription factors (42, 43). Given their distinct transcriptional programs, we postulated that the subset of leukemic cells that clustered in state 1 were employing physiological programs of

#### Figure 3.

CD19 CAR T cells trigger activation of B-ALL cells with subsequent transcriptional rewiring. **A**, ScRNA-seq of NALM-6 B-ALL cells exposed to CD19 CAR T cells or uninfected control T cells at 5:1 ratio (E:T) for 24 hours. tSNE plot of B-ALL target cells showing PAGODA2 clusters (left) and type of effector cells (right). Only pagoda cluster 1 consists exclusively of B-ALL target cells exposed to CAR T cells. **B**, Heat map of marker genes expressed in each PAGODA2 cluster with a mean log<sub>2</sub>FC > 1. **C**, CD19 surface protein (left) and mRNA (right) expression in cluster 1 cells compared with clusters 2-7 (*P* values determined by Dunn multiple comparison test. \*\*, = *P* < 0.01; \*\*\*\*, = *P* < 0.0001; log<sub>2</sub>counts calculated as log<sub>2</sub>[counts per million (CPM)+1]). Box plots show minimum, 25th percentile, median, 75th percentile and maximum values. **D**, Heat map of normalized enrichment scores (NES) of significantly enriched hallmark gene sets in individual clusters. Grey values depict no significance. All gene sets with a significant NES in at least one cluster are shown. **E**, Top, Monocle2 pseudotime analysis of B-ALL cells cocultured with CD19 CAR T cells identifying 7 states. Bottom, projection of pagoda clusters over monocle2 pseudotime distribution. **F**, Heat map of genes that informed the pseudotemporal distribution. Increasing expression of NFkB- and CD40-signaling pathway genes over pseudotime (*TNFAIP8*, *NFKBIZ*, *FAS*, *SLAMF1*, *TNFAIP3*, *RELB*, *TRAF1*, *NFKBIA*, *CFLAR*, *CD40*, *NFKBID*, *KLF6*, *TNF*, *BCL2A1*, *CCR7*, *NFKB2*) with highest enrichment in state 1. Left annotation depicts state, in which each gene is expressed at highest.



**Figure 4.** Interactions with CD19 CAR T cells induce germinal center reaction regulatory programs in B-ALL cells. **A**, Left, activity of selected transcriptional regulons involved in B-cell lineage in NALM-6 cells, as predicted by SCENIC. Right, UMAP projection and cluster identification of scATAC-seq peaks from B-ALL cells that have been cocultured with CAR T cells at 5:1 (E:T) ratio for 24 hours. Rectangular markings depict regulons and motifs that overlap in state 1 (scRNA-seq) and cluster 1 (scATAC-seq). Middle, visualization of selected motifs from overlap (significant differential accessibility of germinal center motifs in cluster 1) (Continued on the following page.)

B-cell differentiation and activation. To assess a possible involvement of B-cell activation programs, we analyzed transcriptional regulon activity using SCENIC. We found that pseudotime states 2, 4, and 7 cells were enriched for transcriptional regulons involved in cell-cycle regulation such as *E2F1/2/4/8*, *TP53*, *MYC*, *BRCA1*, *STAT3*. States 2–5 demonstrated enrichment of the early B-cell regulators *PAX5*, *POU2F1*, *BACH1*, *BACH2*, and *KLF3*, consistent with their developmental state. State 1 cells showed high activity of *IRF4*, *BCL6*, and *ZBTB7A* regulons, which are known master transcription factors of the germinal center reaction (Fig. 4A, left; Supplementary Table S7).

As further proof of transcriptional reprogramming we assessed transcription factor–motif enrichment by scATAC-seq in NALM-6 cells after 24 hours of coculture with CD19 CAR T cells. From 288 cells sorted and sequenced, 245 passed quality control (Supplementary Fig. S10A and S10B). Clustering of ATAC-peaks using cisTopic and visualization using UMAP identified 2 major clusters (Fig. 4A, right) with 99 differentially regulated motifs (adjusted *P* value < 0.05; Supplementary Table S8) that were chosen for further analysis. Differential motif–enrichment analysis showed that germinal center motifs such as *ETV5*, *CTCF*, *ETS1*, *BHLHE40*, *YY1*, *FOXP1*, *TFEB*, *JUND*, *ZBTB7A*, *MEF2A/C/D*, *EGR1/2/3*, *MYBL1* were more accessible in peaks in cluster 1 (Fig. 4A, right). In addition, we found that motifs of other regulators of B-cell function and differentiation were enriched in peaks in cluster 1, including *ERG*, *PAX5*, *FLI1*, *NFYA*, *NFYB* and transcription factors of the *ETS* and *Sp/KLF* family. In contrast, cluster 2 peaks were enriched for motifs of *SNAI2*, a transcription factor active in early lymphoid cell development (44), and *MSC*, an inhibitor of the critical B-cell development regulator *E47* (45, 46). We also detected motifs of the nuclear proapoptotic factor *THAP1* (47) and the tumor/growth suppressor *MZF1* (48), which were enriched in cluster 2 peaks. In addition, motifs of the known cell-cycle regulators *E2F2* and *E2F4* were enriched in cluster 1 peaks, corresponding to the G<sub>2</sub>–M-phase signatures identified in our RNA-seq data in clusters 4 and 5 (Fig. 3B and D and Fig. 4A, left).

To further define which B-cell differentiation programs leukemic cells employed in response to interaction with CD19 CAR T cells, we assessed expression of validated B cell–differentiation markers, including hematopoietic stem cell (HSC), multipotent progenitor (MPP), common lymphoid progenitor (CLP), pro-B, pre-B, naïve B, germinal center dark zone (GC DZ), germinal center intermediate (GC INT), germinal center light zone (GC LZ), prememory, memory, class-switched memory, plasmablast, and plasma cell signatures. We compiled these signatures from several datasets [BLUEPRINT (30), Human Cell Atlas (32)] and recently published signatures of the germinal center reaction from Holmes and colleagues (2020; ref. 33; Fig. 4B, left; Supplementary Table S9). Most states showed enrichment for several immature signatures of the B-cell lineage, consistent with their B-ALL developmental state. For example, NALM-6 cells cocultured with uninfected T cells were enriched for the proB signature, which is consistent with NALM-6 cells arrested at

this developmental stage. In contrast, immature signatures were downregulated in state 1 cells and these cells demonstrated enrichment of mature B-cell signatures including the light zone a signature (Fig. 4B, left). Furthermore, state 1 cells expressed the light zone marker *CD83* and other germinal center markers like *CD40*, *BCL2A1*, *SLAMF1*, *NFKBIA* (Fig. 4B, right). As the physiologic B-cell germinal center reaction is accompanied by decreased CD19 expression [Fig. 4C, analyzing RNA-seq data from Holmes and colleagues (33)], these data suggest that state 1 leukemia cells employ germinal center reaction signatures to transcriptionally downregulate CD19 and maintain lower CD19 expression for escape from CD19 CAR T cells.

As the tyrosine kinase BTK is required for normal B-cell activation (49, 50), we next tested whether inhibiting BTK prevented B-cell activation induced by CD19 CAR T cells and inhibited escape from CAR T cell–mediated killing. To this end, we pretreated leukemic cells with the BTK inhibitor ibrutinib for 72 hours at IC<sub>10</sub> dosing (Supplementary Fig. S11A) prior to coculture with CAR T cells. Ibrutinib-treated leukemic cells exposed to CAR T cells were killed at higher rates compared with non-ibrutinib-treated leukemic cells (43.17% vs. 25.45% at E:T ratio of 1:1, *P* value = 6E-08; 66.62% vs. 45.11% at E:T ratio of 5:1, *P* value = 0.0131; Fig. 4D). Increased cytotoxicity was also observed after ibrutinib wash-out before coculture and we did not observe any reduced viability of either CAR T cells or leukemic cells with the ibrutinib dosing used in these assays (Fig. 4D; Supplementary Fig. S11B and S11C). Thus, these data demonstrate that leukemic cells may employ B-cell activation and germinal center reaction programs to escape from CAR T cell–mediated killing, a process that can be suppressed by inhibiting B cell–activation programs.

## Discussion

It is well established that target antigen recognition by CAR T cells is dependent on antigen density and that efficacy of CAR T cell–mediated cytotoxicity decreases with lower antigen expression on target cells (12, 14, 16, 51). Therefore, low expression or nearly complete loss of target antigen is a challenge for CAR T-cell treatments and other immunotherapies (13, 51, 52). Trogocytosis, a process by which membrane fragments are transferred from target to effector cells, has been identified as a possible mechanism for lowering target epitope expression (12). Enhancing CAR signaling has been proposed to tune CAR T-cells' antigen recognition and counteract low target epitope expression (14, 53). However, little is known about the dynamic regulation of CD19 expression by target cells during their early interactions with CAR T cells and how these interactions may affect cytotoxic efficacy.

Here, we show that CD19 CAR T-cell therapy induces rapid clustering of CD19 on the leukemia cell–T cell interface and internalization of CD19 by B-ALL leukemic cells, resulting in decreased CD19 surface antigen expression among CAR T cell–exposed B-ALL cells. Among the initially CD19<sup>+</sup> leukemic cells that survived CAR T-

(Continued.) was tested by Fisher exact test (*P* = 0.0003). **B**, Left, heat map demonstrating expression of HSC, MPP, CLP, proB, preB, naïveB, Germinal Center (GC) Dark Zone, GC Intermediate Zone, GC Light Zone, preMemory, Memory, class-switched Memory, Plasmablast, Plasma cell - signatures in monocle2 states of NALM-6 cells exposed to CAR T cells and uninfected T cells (controls). Right, violin plots of selected germinal center light zone gene expressions *CD83*, *CD40*, *CCR7*, *BCL2A1*, *SLAMF1*, and *NFKBIA* from monocle state 1 compared with states 2–7 and NALM-6 exposed to uninfected T cells (controls). Log<sub>2</sub>counts calculated as log<sub>2</sub>(counts per million (CPM)+1). **C**, Violin plots displaying lower *CD19*, *BTK*, *BLK* and *CD72* expression (TPM) in germinal center B cells compared with naïve B cells in previously published dataset from Holmes and colleagues (33) (left), and B-ALL cells from monocle state 1 compared with states 2–7 and NALM-6 exposed to uninfected T cells (right). Box plots show minimum, 25th percentile, median, 75th percentile and maximum values. **D**, Cytotoxicity of CD19 CAR T cells in the presence of ibrutinib at IC<sub>10</sub> concentration of 0.963 μmol/L after 6 hours of coculture with NALM-6 cells (percentages of dead cells normalized to baseline cytotoxicity of uninfected T cells). *P* values determined by Tukey multiple comparisons test, *n* = 3, representative of two independent experiments using either CAR constructs 1 or 2, respectively. \*, = *P* < 0.05; \*\*\*\*, = *P* < 0.0001. Data are mean ± SD.

cell killing, we identified a distinct subpopulation in which low CD19 expression was sustained through transcriptional rewiring and engagement of unique transcriptional regulators associated with B-cell differentiation. Specifically, we show that these cells engage regulatory programs of normal B-cell activation such as the germinal center reaction, and the NF $\kappa$ B- and CD40-signaling pathways.

Our studies raise important issues about CAR-mediated receptor engagement on cancer cells and their consequences. This is particularly important as CAR T cells may lose efficacy over time, such as through T-cell exhaustion (54). As their killing efficacy decreases, those CAR T cells may still maintain their state change-inducing effects on the cancer cells, which may propagate a greater number of surviving cancer cells over time. Further work is needed to characterize the functional effects of CAR-mediated receptor engagement in relevant preclinical disease models *in vivo* and how they translate to treating relapsed disease in patients.

Our findings also raise questions about the effects of T cell-targeting immunotherapies other than CAR T cells on their cancer cell targets. In this context, treatment with the CD3/CD19 bispecific antibody blinatumomab has been associated with CD19<sup>low/negative</sup> relapses (55, 56). Further studies are needed to understand the relative impact of bispecific immunotherapy agents and CAR T cells on CD19<sup>low/negative</sup> relapses and the optimal sequence of administering different immunotherapies.

Cellular plasticity is a basis for treatment failure in several cancers (57, 58). Cancer cells may engage transcriptional programs that allow for dedifferentiation or cross-differentiation into other lineages (9, 10). Our data demonstrate that rather than dedifferentiating into more stemlike states, engagement of lineage-appropriate differentiation and activation programs may allow for less effective recognition by CD19 CAR T cells. This is reminiscent of what has been shown for key signaling pathways that operate in normal B cells and remain essential for leukemia cell survival in BCR signaling-dependent precursor B-ALL, thus providing a rationale for targeting these pathways (59–61).

Our studies highlight the importance of combining CAR T-cell therapy with other targeted therapies to overcome the plasticity of leukemia cells. More work is needed to identify the exact epigenetic mediators that orchestrate the engagement of programs of normal B-cell activation and differentiation in B-ALL cells in response to CD19 CAR T cell interactions, as well as their dependencies on B cell-signaling pathways. While other groups have shown favorable combination of CAR T cells and ibrutinib in other B-cell malignancies, such as chronic lymphocytic leukemia (62) and mantle cell lymphoma (63), previous studies of combination treatment in B-ALL have been inconclusive (64, 65). Our data show that inhibiting BTK, an essential mediator of B-cell activation (49, 50), increases CD19 CAR T cell-mediated B-ALL cytotoxicity, presumably through inhibiting the engagement of normal B-cell differentiation and activation programs.

In summary, our studies highlight how CAR T cells might trigger engagement of physiologic regulatory programs in their target cells,

and how CAR T cells' failure to kill their targets at first interaction may promote target-cell survival.

## Authors' Disclosures

N.G. Im reports grants from Kind-Philipp-Stiftung fuer paediatrisch-onkologische Forschung during the conduct of the study. J.M. Waldschmidt reports grants from German Research Foundation, International Myeloma Society; personal fees from Sanofi; and personal fees from Janssen outside the submitted work. C. Grassberger reports Nanolive SA - technical advisory board. J.G. Lohr reports grants from NCI during the conduct of the study; grants from BMS/Celgene; and personal fees from T2 Biosystems outside the submitted work. B. Knoechel reports grants from NCI during the conduct of the study. No disclosures were reported by the other authors.

## Authors' Contributions

N.G. Im: Conceptualization, data curation, software, formal analysis, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. A. Guillaumet-Adkins: Resources, data curation, formal analysis, validation, investigation, methodology, writing—review and editing. M. Wal: Resources, methodology. A.J. Rogers: Resources, data curation, software, formal analysis, investigation, methodology. J. Frede: Resources, data curation, software, formal analysis, validation, investigation, methodology. C.C. Havig: Formal analysis, validation, investigation, methodology. J. Yang: Formal analysis, validation, investigation, methodology. P. Anand: Resources, data curation, software, formal analysis, validation. S.K. Stegmann: Data curation, formal analysis, validation, methodology, writing—review and editing. J.M. Waldschmidt: Validation, methodology. N. Sotudeh: Data curation, software, formal analysis. L. Niu: Resources, validation. J. Voisine: Resources, data curation, investigation, methodology. M.R. Schweiger: Resources, supervision. C. Grassberger: Resources, visualization, methodology. J.G. Lohr: Conceptualization, resources, data curation, software, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing. B. Knoechel: Conceptualization, resources, data curation, software, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing.

## Acknowledgments

This research was supported by the NCI (K08CA191091 to B. Knoechel and K08CA191026 to J.G. Lohr), and the Ambrose Monell Foundation (to B. Knoechel). N.G. Im was supported by the *Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung*.

We thank the Knoechel and Lohr lab members for discussions and helpful comments on the manuscript. We thank the Jimmy Fund DFCI Flow Cytometry core for their support with flow sorting. We thank Min Gyu Im for his help with editing the movies.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

## Note

Supplementary data for this article are available at Cancer Immunology Research Online (<http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/>).

Received August 5, 2021; revised April 13, 2022; accepted June 23, 2022; published first June 27, 2022.

## References

- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:1509–18.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371:1507–17.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:439–48.
- Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:449–59.

5. Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, et al. Intent to treat leukemia remission by CD19CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* 2017;129:3322–31.
6. Maude SL, Teachey DT, Rheingold SR, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *J Clin Oncol* 2016;34:3011.
7. Orlando EJ, Han X, Tribouley C, Wood PA, Leary RJ, Riester M, et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2018;24:1504–06.
8. Asnani M, Hayer KE, Naqvi AS, Zheng S, Yang SY, Oldridge D, et al. Retention of CD19 intron 2 contributes to CART-19 resistance in leukemias with subclonal frameshift mutations in CD19. *Leukemia* 2020;34:1202–7.
9. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi L-A, Finney O, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR T-cell therapy. *Blood* 2016;127:2406–10.
10. Jacoby E, Nguyen SM, Fontaine TJ, Welp K, Gryder B, Qin H, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukemia lineage switch exposing inherent leukemic plasticity. *Nat Commun* 2016;7:12320.
11. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discov* 2015;5:1282–95.
12. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, van der Stegen SJC, Giavridis T, Mansilla-Soto J, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumor antigen escape. *Nature* 2019;568:112–16.
13. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* 2018;24:20–28.
14. Majzner RG, Rietberg SP, Sotillo E, Dong R, Vachharajani VT, Labanieh L, et al. Tuning the antigen density requirement for CAR T-cell activity. *Cancer Discov* 2020;10:702–23.
15. Nerretter T, Letschert S, Götz R, Doose S, Danhof S, Einsele H, et al. Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T. *Nat Commun* 2019;10:3137.
16. Ramakrishna S, Highfill SL, Walsh Z, Nguyen SM, Lei H, Shern JF, et al. Modulation of target antigen density improves CAR T-cell functionality and persistence. *Clin Cancer Res* 2019;25:5329–41.
17. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T-cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med* 2018;24:1499–503.
18. Singh N, Lee YG, Shestova O, Ravikummar P, Hayer KE, Hong SJ, et al. Impaired death receptor signaling in leukemia causes antigen-independent resistance by inducing CAR T-cell dysfunction. *Cancer Discov* 2020;10:552–67.
19. Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B-cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol* 2008;9:63–72.
20. Picelli S, Faridani OR, Björklund ÅK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014;9:171–81.
21. Chen X, Miragaia RJ, Natarajan KN, Teichmann SA. A rapid and robust method for single cell chromatin accessibility profiling. *Nat Commun* 2018;9:5345.
22. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013;29:15–21.
23. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;31:166–69.
24. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf* 2011;12:323.
25. Fan J, Salathia N, Liu R, Kaeser GE, Yung YC, Herman JL, et al. Characterizing transcriptional heterogeneity through pathway and gene set overdispersion analysis. *Nat Methods* 2016;13:241–44.
26. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* 2018;36:411–20.
27. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, et al. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods* 2017;14:979–82.
28. Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, Pokharel P, Li S, Morse M, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 2014;32:381–86.
29. Aibar S, González-Blas CB, Moerman T, Huynh-Thu VA, Imrichova H, Hulselmans G, et al. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods* 2017;14:1083–86.
30. Fernández JM, La Torre V de, Richardson D, Royo R, Puiggròs M, Moncuill V, et al. The BLUEPRINT data analysis portal. *Cell Syst* 2016;3:491–5.
31. Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol* 2017;18:220.
32. Hay SB, Ferchen K, Chetal K, Grimes HL, Salomonis N. The Human Cell Atlas bone marrow single-cell interactive web portal. *Exp Hematol* 2018;68:51–61.
33. Holmes AB, Corinaldesi C, Shen Q, Kumar R, Compagno N, Wang Z, et al. Single-cell analysis of germinal-center B cells informs on lymphoma cell of origin and outcome. *J Exp Med* 2020;217:e20200483.
34. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* 2020;38:276–78.
35. McLean CY, Bristol D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, et al. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* 2010;28:495–501.
36. Bravo González-Blas C, Minnoye L, Papisokrati D, Aibar S, Hulselmans G, Christiaens V, et al. cisTopic: cis-regulatory topic modeling on single-cell ATAC-seq data. *Nat Methods* 2019;16:397–400.
37. Rodriguez A, Laio A. Machine learning. Clustering by fast search and find of density peaks. *Science* 2014;344:1492–96.
38. Schep AN, Wu B, Buenrostro JD, Greenleaf WJ. chromVAR: inferring transcription-factor-associated accessibility from single-cell epigenomic data. *Nat Methods* 2017;14:975–78.
39. Xiong W, Chen Y, Kang X, Chen Z, Zheng P, Hsu Y-H, et al. Immunological synapse predicts effectiveness of chimeric antigen receptor cells. *Mol Ther* 2018;26:963–75.
40. Stegle O, Teichmann SA, Marioni JC. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2015;16:133–45.
41. Rodig SJ, Kutok JL, Paterson JC, Nitta H, Zhang W, Chapuy B, et al. The pre-B-cell receptor associated protein VpreB3 is a useful diagnostic marker for identifying c-MYC translocated lymphomas. *Haematologica* 2010;95:2056–62.
42. Cyster JG, Allen CDC. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 2019;177:524–40.
43. Silva NS de, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centers. *Nat Rev Immunol* 2015;13:7–48.
44. Pioli PD, Weis JH. Snail transcription factors in hematopoietic cell development: a model of functional redundancy. *Exp Hematol* 2014;42:425–30.
45. Massari ME, Rivera RR, Voland JR, Quong MW, Breit TM, van Dongen JJ, et al. Characterization of ABF-1, a novel basic helix-loop-helix transcription factor expressed in activated B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1998;18:3130–39.
46. Beck K, Peak MM, Ota T, Nemazee D, Murre C. Distinct roles for E12 and E47 in B-cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci. *J Exp Med* 2009;206:2271–84.
47. Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard J-P. THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 2003;22:2432–42.
48. Gaboli M, Kotsi PA, Gurrieri C, Cattoretto G, Ronchetti S, Cordon-Cardo C, et al. Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev* 2001;15:1625–30.
49. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer* 2018;17:57.
50. Middendorp S, Dingjan GM, Maas A, Dahlenborg K, Hendriks RW. Function of Bruton's tyrosine kinase during B-cell development is partially independent of its catalytic activity. *J Immunol* 2003;171:5988–96.
51. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, et al. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor-modified effector CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2015;194:911–20.
52. Walker AJ, Majzner RG, Zhang L, Wanhaien K, Long AH, Nguyen SM, et al. Tumor antigen and receptor densities regulate efficacy of a chimeric antigen receptor targeting anaplastic lymphoma kinase. *Mol Ther* 2017;25:2189–201.
53. Gudipati V, Rydzek J, Doel-Perez I, Gonçalves VDR, Scharf L, Königsberger S, et al. Inefficient CAR-proximal signaling blunts antigen sensitivity. *Nat Immunol* 2020;21:848–56.
54. Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, Gennert D, Xu P, Good Z, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* 2019;576:293–300.

55. Aldoss I, Song J, Stiller T, Nguyen T, Palmer J, O'Donnell M, et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumomab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92:858–65.
56. Libert D, Yuan CM, Masih KE, Galera P, Salem D, Shalabi H, et al. Serial evaluation of CD19 surface expression in pediatric B-cell malignancies following CD19-targeted therapy. *Leukemia* 2020;34:3064–9.
57. Quintanal-Villalonga Á, Chan JM, Yu HA, Pe'er D, Sawyers CL, Sen T, et al. Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:360–71.
58. Biehs B, Dijkgraaf GJP, Piskol R, Alicke B, Boumahdi S, Peale F, et al. A cell identity switch allows residual BCC to survive Hedgehog pathway inhibition. *Nature* 2018;562:429–33.
59. Köhrer S, Havranek O, Seyfried F, Hurtz C, Coffey GP, Kim E, et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* 2016;30:1246–54.
60. Geng H, Hurtz C, Lenz KB, Chen Z, Baumjohann D, Thompson S, et al. Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B-cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2015;27:409–25.
61. Kim E, Hurtz C, Koehrer S, Wang Z, Balasubramanian S, Chang BY, et al. Ibrutinib inhibits pre-BCR<sup>+</sup> B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood* 2017;129:1155–65.
62. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 2016;127:1117–27.
63. Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, Fraietta JA, Qayyum S, Zhang Q, et al. The addition of the BTK inhibitor ibrutinib to anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CART19) improves responses against mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:2684–96.
64. Qin JS, Johnstone TG, Baturevych A, Hause RJ, Ragan SP, Clouser CR, et al. Antitumor potency of an anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy, lisocabtagene maraleucel in combination with ibrutinib or acalabrutinib. *J Immunother* 2020;1.
65. Dufva O, Koski J, Maliniemi P, Ianevski A, Klievink J, Leitner J, et al. Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CART T cell cytotoxicity. *Blood* 2020;135:597–609.
66. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, Xu H, Black MA, Morgan RA, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother* 2009;32:689–702.

## 4. Diskussion

Wie in der Einleitung dieser Arbeit aufgezeigt, ist die Identifikation des Zielantigens durch CAR T Zellen abhängig von der Antigendichte, sodass die Zytotoxizität von CAR T Zellen mit einer geringeren Antigenexpression auf den Zielzellen abnimmt<sup>79,80,82,84</sup>. Daher stellt eine niedrige Expression des Zielantigens eine Herausforderung für CAR T-Zell Therapien und andere Immuntherapien dar<sup>79,83,85</sup>. Es ist jedoch wenig über die Regulation der CD19 Expression durch Zielzellen während ihrer frühen Interaktionen mit CAR T Zellen bekannt und welche Einflüsse dies auf die Zytotoxizität haben könnte.

Diese Arbeit zeigt, dass die Interaktion mit CD19 CAR T Zellen in Leukämiezellen die Bildung von CD19 Clustern und die darauffolgende Internalisierung von CD19 induzierte. Dies führte zur Reduktion der CD19 Expression auf der Oberfläche der initial CD19 positiven Leukämiezellen. Unter den Leukämiezellen, die den zytotoxischen Angriff der CAR T Zellen überlebten, konnte eine Subpopulation von Leukämiezellen identifiziert werden, in denen die niedrige Expression von *CD19* auf RNA-Ebene durch transkriptionelle Regulation aufrechterhalten wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen regulatorische, mit der B-Zell Differenzierung assoziierte Programme wie die B-Zell Aktivierung, NFκB- und CD40-Signalwege sowie die Keimzentrumsreaktion aktivierten.

### 4.1. CAR T-Zell Versagen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass CAR-vermittelte Rezeptorbindung nicht nur die CAR T Zellen aktiviert, sondern auch einen Einfluss auf die Zielzellen hat. Dies hat wichtige Implikationen, da nicht jede Interaktion zwischen CAR T Zellen und Leukämiezellen zu einem Abtöten der Leukämiezellen führt.

CAR T Zellen werden autolog von T Zellen der Leukämiepatienten hergestellt<sup>63</sup>. In dem Herstellungsprozess werden grundsätzlich alle T Zellen einer Leukapherese inkludiert und keine Subpopulation von T Zellen konzentriert oder verworfen. Wenn man die Unterteilung von CD4 positiven Helferzellen und CD8 positiven zytotoxischen T Zellen beachtet, so weisen CD4 positive CAR T Zellen im Vergleich niedrige zytotoxische Eigenschaften auf. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, resultierte die Interaktion zwischen ausschließlich CD4 positiven CAR T Zellen und Leukämiezellen deshalb zu einem hohen Anteil an überlebenden Tumorzellen mit erniedrigter CD19 Oberflächenexpression, die in einer zweiten Kokultur refraktär waren gegenüber frischen CAR T Zellen.

Aber auch die Interaktion von Leukämiezellen mit zytotoxischen CD8 positiven CAR T Zellen kann fehlschlagen. Da die Leukämiepatienten in der Regel intensiv vorbehandelt sind, ist ein gängiges Problem, dass nicht „fitte“ oder zu wenig T Zellen zur Verfügung stehen<sup>86</sup>. So kann

bereits die Dosis der verabreichten CAR T Zellen variabel sein und eine zu niedrige CAR T-Zell Dosis kann zu unzureichender Aktivität oder fehlender Persistenz führen<sup>87,88</sup>.

Schließlich kann auch unabhängig von der Qualität der entnommenen T Zellen eine chronische Antigen Stimulation bei CAR T Zellen zur sogenannten T-Zell Erschöpfung (engl. T-Cell Exhaustion)<sup>89,90</sup> führen, die eine verminderte Wirksamkeit als Konsequenz hat<sup>91,92</sup>.

Zusammenfassend sind die eingeschränkte zytotoxische Eigenschaft in CD4 Helferzellen, eine niedrige Gesamtdosis oder verminderte Aktivität von CAR T Zellen sowie die (CAR) T-Zell Erschöpfung mögliche Gründe für eine unzureichende zytotoxische Wirkung und das Überleben von Leukämiezellen. Durch die Bindung mit dem CAR-Molekül können solche CAR T Zellen dennoch mit Leukämiezellen interagieren, was die Induktion von Resistenzmechanismen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden, zur Folge haben könnte. Eine mögliche Lösungsstrategie, um zumindest die patientenabhängige Variabilität in der Qualität von CAR T Zellen zu vermindern, wäre der Einsatz von CAR Natürliche Killerzellen, die einheitlich und gebrauchsfertig für viele Patienten gleichzeitig hergestellt werden könnten, da sie nicht HLA-übereinstimmend verabreicht werden können<sup>93</sup>. Darüber hinaus werden aktuell unterschiedliche Strategien diskutiert und studiert, um das Aufkommen der T-Zell Erschöpfung in CAR T Zellen zu vermindern<sup>91,94</sup>.

#### **4.2. Aktivierungsfähigkeit**

Es ist bekannt, dass Leukämiezellen durch eine Entdifferenzierung in stammzellähnliche Vorstufen Resistenzen ausbilden können<sup>95</sup>. Speziell in der Therapie mit CAR T Zellen wurde außerdem der *Lineage Switch*, also eine Umdifferenzierung, als Resistenzmechanismus aufgeklärt<sup>75,76</sup>. Diese Arbeit zeigt nun, dass auch die Aktivierung und Differenzierung von Leukämiezellen zu reiferen Zellstadien zur Resistenzbildung beitragen könnte.

Es bleibt jedoch unklar, unter welchen Voraussetzungen – sowohl auf Seite der CAR T Zellen als auch der Leukämiezellen – es zu diesem Resistenzmechanismus kommen kann. Beispielsweise ist in CAR T Zellen die Affinität der chimären Antigen Rezeptoren<sup>96–98</sup> sowie die Stärke der Signalübertragung<sup>80,99</sup> gegenüber Tumorzellen variabel und könnte somit einen Einfluss auf die Aktivierung der Zielzellen haben.

Gleichzeitig wäre anzunehmen, dass zumindest die Initiierung der Keimzentrumsreaktion im Rahmen der festgestellten Differenzierung der Leukämiezellen die Teilnahme von T Helferzellen und somit CD4 positive CAR T Zellen voraussetzt. So könnte auch das Verhältnis von CD4 positiven Helferzellen zu CD8 positiven zytotoxischen CAR T Zellen einen maßgeblichen Effekt auf diesen Mechanismus haben, ähnlich wie dieses Verhältnis auch Einfluss auf den Therapieerfolg in klinischen Studien hatte<sup>100,101</sup>.

Auch wenn die Induktion der CD19 Reduktion in mehreren Leukämiezelllinien in dieser Arbeit gezeigt wurde, bleibt unklar, welche biologischen Voraussetzungen in den malignen



Vorläuferzellen vorherrschen, die zu einer Aktivierung und im Weiteren sogar zu einer Keimzentrumreaktionssignatur befähigen. Es sind weitere Studien notwendig um die exakten epigenetischen Regulatoren zu identifizieren, die die Initiierung dieser Programme als Reaktion auf die Interaktion mit CAR T Zellen steuern. Dies könnte auch wichtige Implikationen für andere B-Zell Malignitäten haben, die ebenfalls mit CD19 CAR T Zellen behandelt werden. Vor allem für reifere B-Zell Tumoren wie die chronisch lymphatische Leukämie oder das Mantelzelllymphom, in denen die B-Zell Aktivierung eine bekannte Rolle in der Pathobiologie spielt, könnte dieser Aspekt relevant sein<sup>102,103</sup>. Sollte sich herausstellen, dass die Interaktion mit CAR T Zellen regelmäßig auch in anderen Malignitäten eine Induktion von biologischen Mechanismen verursacht, sollte dies auch in der Auswahl zukünftiger Zielantigene in anderen Tumoren berücksichtigt werden, da der Einsatz von CAR T Zellen inzwischen über B-Zell-Malignitäten hinaus auch in soliden Tumoren getestet wird<sup>104,105</sup>.

### **4.3. Therapieansatz des Resistenzmechanismus**

Die Nutzung physiologischer B-Zell Signalwege in B-ALL Zellen wurde auch im Kontext von (prä-)B-Zell Rezeptor abhängigen B-ALL Zellen gezeigt<sup>106-108</sup>. Prä B Vorläuferzellen exprimieren einen sogenannten prä-BZR, welcher in der Regulation der B-Zell Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt<sup>109</sup>. Im Kontrast zum reifen BZR werden die Signalwege des prä-BZR nicht durch Antigenbindung, sondern zell-autonom durch Cross-Linking initiiert<sup>110</sup>. Beide Rezeptoren haben jedoch gemeinsam, dass sie grundsätzlich die gleiche Struktur teilen<sup>111</sup> und die gleichen Signalwege nutzen<sup>109,112</sup>. Ibrutinib, ein Bruton Tyrosinkinase Inhibitor, der normalerweise eingesetzt wird, um die Signalwege des BZR zu inhibieren, konnte daher auch zur Inhibition des prä-BZR in B-ALL verwendet werden<sup>107</sup>. Dieses Konzept wurde in der vorliegenden Arbeit übernommen und angewandt, um die Aktivierungs- und Differenzierungsprogramme in den überlebenden Leukämiezellen zu hemmen und damit die CD19-CAR T Zell-vermittelte B-ALL-Zytotoxizität zu erhöhen.

Auch in anderen, reiferen B-Zell Malignitäten wie der chronischen lymphatischen Leukämie<sup>113</sup> und dem Mantelzell-Lymphom<sup>114</sup> wurde eine vorteilhafte Kombination von CAR T Zellen und Ibrutinib gezeigt. Gleichzeitig waren frühere Studien zur Kombinationsbehandlung in der B-ALL uneinheitlich<sup>115,116</sup>. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien könnten die oben genannten, noch unklaren und unterschiedlichen Faktoren sein, die für eine Aktivierung notwendig sind. Die Rationale einer Kombinationsbehandlung von Ibrutinib und CAR T Zellen ergibt sich jedenfalls nach den Ergebnissen dieser Arbeit lediglich bei aktivierten Leukämiezellen.

#### 4.4. Dual Targeting

Eine andere Behandlungsstrategie, die den in dieser Arbeit aufgezeigten Resistenzmechanismus überwinden könnte, wäre die Kombination von Immuntherapien, die gemeinsam mehrere Antigene anzielen. Sowohl für CD19 niedrige als auch für CD19 negative, refraktäre Leukämien könnte durch die gleichzeitige Zielbehandlung von mehreren Antigenen eine erfolgreichere Therapie erreicht werden. Gerade für die B-ALL ist dieser Ansatz vielversprechend, da neben CD19 auch, wie in der Einleitung beschrieben, ein großer Anteil der B-ALL Zellen CD22 positiv sind<sup>47</sup>.

Beispielsweise führte in präklinischen Studien eine gleichzeitige Behandlung mit CD19 und CD22 CAR T Zellen<sup>84</sup> oder CD19 und CD123 CAR T Zellen<sup>117</sup> zu höheren Eradikationsraten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden zahlreiche Modifikationen von chimären Antigen Rezeptoren getestet, sodass auch die Kombination von mehreren scFv in einer CAR T Zelle als bispezifische (z.B. CD22 und CD19; CD19 und CD20)<sup>118-120</sup> oder sogar als trispezifische CAR T Zellen (CD22, CD19 und CD20)<sup>121,122</sup> getestet werden. Dabei ist auch variabel, ob die zwei scFv in einem Molekül als sogenannter „Tandem“-Vektor oder auf zwei verschiedenen Molekülen „bizistronisch“ exprimiert werden<sup>123,124</sup>. Erste klinische Erfahrungen aus Phase I Studien berichten über funktionelle, remissionsinduzierende bispezifische anti-CD19 und anti-CD22 CAR T Zellen<sup>118,125</sup>. In diesen Studien sind zwar nach der CAR T Zelltherapie weiterhin CD19 negative/niedrige und CD22 negative/niedrige Rezidive beobachtet worden, jedoch ist die Datenlage aus diesen einarmigen Studien zu vorläufig und somit noch nicht geeignet, um bereits die Rate an Rezidiven mit Antigenverlust/-reduktion evaluieren zu können. In den nächsten Jahren werden vergleichende präklinische und klinische Studien notwendig sein, um die unterschiedlichen Konzepte zu evaluieren und die beste Strategie für mehrfach-spezifische CAR T Zellen ausmachen zu können.

#### 4.5. Andere Immuntherapien

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen nicht zuletzt auch Fragen zu den Auswirkungen von anderen T-Zell-gerichteten Immuntherapien auf ihre Zielzellen auf. Die Behandlung mit dem bispezifischen CD3/CD19-Antikörper Blinatumomab kann ebenfalls zu CD19-niedrigen/negativen Rezidiven führen<sup>59,126</sup>. Es hat sich außerdem gezeigt, dass eine vorherige Therapie mit dem bispezifischen Antikörper Blinatumomab den Erfolg einer anti-CD19 CAR T-Zell Therapie negativ beeinflusst<sup>127,128</sup>.

Ähnlich wie hier für CD19 CAR T Zellen gezeigt wurde, könnte die CD19-Bindung durch Blinatumomab ebenfalls zu Effekten auf Leukämiezellen führen, die eine niedrige CD19-Expression bedingen und das Auftreten einer resistenten Erkrankung ermöglichen. Da Blinatumomab und CD 19 CAR T Zellen beide ihre Vor- und Nachteile in der klinischen

Versorgung haben<sup>64,129</sup>, werden weitere Studien erforderlich sein, um die relativen Auswirkungen von bispezifischen Immuntherapien und CAR T Zellen auf CD19-niedrige/negative Rezidive zu verstehen und die optimale Reihenfolge oder die Kombination dieser Immuntherapien zu evaluieren.

#### **4.6. Zusammenfassende Limitierungen der Arbeit**

Als Modell für die Vorläufer B-ALL wurde die etablierte NALM-6 Zelllinie verwendet. Resistenzen, die untersucht wurden, beruhen also auf dem genetischen Hintergrund dieser Zelllinie. Ob und inwiefern sie tatsächlich in Patienten auftreten, kann deshalb nicht vorausgesagt werden. Dies gilt ebenfalls für das CAR-Molekül bzw. die CAR T Zellen. In dieser Arbeit wurden Drittgeneration CAR T Zellen verwendet, die sowohl CD28 als auch 4-1BB als kostimulatorische Domäne tragen. Alle zurzeit in klinischer Zulassung befindlichen CAR T Zellen sind Zweitgeneration CAR T Zellen mit entweder CD28 oder 4-1BB-Domäne<sup>63</sup>. Obwohl aus klinischen Daten keine klare Überlegenheit der einen kostimulatorischen Domäne gegenüber der anderen abzuleiten ist, gibt es präklinische vergleichende Studien, die der einen Domäne eine höhere antileukämische Wirkung oder eine erhöhte Persistenz im Vergleich zu der anderen zuschreiben und andersherum<sup>130</sup>. Da die Datenlage aus klinischen Studien mit Drittgeneration CAR T Zellen sehr klein ist, können die Effekte der zusätzlichen Domäne nicht verlässlich bestimmt werden. Obwohl die aktuelle Studienlage insgesamt darauf hindeutet, dass die zusätzliche kostimulatorische Domäne keine klare Über- oder Unterlegenheit bewirkt<sup>131,132</sup>, ist deren Rolle bei der Induktion der in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen unklar. Weitere Arbeiten sind also erforderlich, um die funktionellen Auswirkungen der CAR-vermittelten Rezeptorbindung in relevanten präklinischen Krankheitsmodellen *in vivo* zu validieren, zu charakterisieren und um zu klären, wie sie sich auf die Behandlung von Rückfällen bei Patienten auswirken könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2014; **371**: 1507–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>.
- 2 Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018; **378**: 439–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>.
- 3 Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018; **378**: 449–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919>.
- 4 Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent to treat leukemia remission by CD19CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* 2017; **129**: 3322-3331. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-769208>.
- 5 Maude SL, Teachey DT, Rheingold SR, et al. Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *Journal of Clinical Oncology* 2016; **34**: 3011. [https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.3011](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3011).
- 6 Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* 2015; **385**: 517–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61403-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61403-3).
- 7 Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2013; **368**: 1509–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>.
- 8 Lee DW, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, et al. Long-Term Outcomes Following CD19 CAR T Cell Therapy for B-ALL Are Superior in Patients Receiving a Fludarabine/Cyclophosphamide Preparative Regimen and Post-CAR Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 2016; **128**: 218.
- 9 Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov* 2015; **5**: 1282–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1020>.
- 10 Asnani M, Hayer KE, Naqvi AS, et al. Retention of CD19 intron 2 contributes to CART-19 resistance in leukemias with subclonal frameshift mutations in CD19. *Leukemia* 2019; **34**: 1202–07. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0580-z>.

- 11 Orlando EJ, Han X, Tribouley C, et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2018; **24**: 1504–06. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0146-z>.
- 12 Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2015.
- 13 Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 959–71. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>.
- 14 Deutsches Kinderkrebsregister. Jahresbericht 2019.
- 15 Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Onkologe* 2017; **23**: 499–503. <https://doi.org/10.1007/s00761-017-0249-z>.
- 16 Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. S1 Leitlinie Akute lymphoblastische Leukämie – ALL - im Kindesalter 2021.
- 17 Kompetenznetz akute und chronische Leukämien. Akute lymphatische Leukämie (ALL). <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/> (accessed Sep 04, 2022).
- 18 Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; **94**: 82–93. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21518>.
- 19 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783–86.
- 20 Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology* 1976; **33**: 451–58.
- 21 Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; **36**: 1720–48. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>.
- 22 Gökbüget N, Baldus C, Brüggemann M, et al. Akute Lymphatische Leukämie (ALL). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@@guideline/html/index.html#litID0EGPAG> (accessed Sep 04, 2022).
- 23 Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986; **67**: 415–20.
- 24 Crist W, Carroll A, Shuster J, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1990; **76**: 489–94.
- 25 Gleissner B, Gökbüget N, Bartram CR, et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of

- the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 2002; **99**: 1536–43. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.5.1536>.
- 26 Maurer J, Janssen JW, Thiel E, et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *The Lancet* 1991; **337**: 1055–58. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91706-z](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91706-z).
- 27 Biondi A, Schrappe M, Lorenzo P de, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *The Lancet Oncology* 2012; **13**: 936–45. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70377-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70377-7).
- 28 Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Cancer* 2007; **109**: 2068–76. <https://doi.org/10.1002/cncr.22631>.
- 29 Schrappe M, Hunger SP, Pui C-H, et al. Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*; **366**: 1371–81.
- 30 Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2014; **1**: 244–49. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.244>.
- 31 Gökbuget N. Akute Lymphatische Leukämie des Erwachsenen. *Arzneimitteltherapie* 2017; **35**: 371–82.
- 32 van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *The Lancet* 1998; **352**: 1731–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04058-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04058-6).
- 33 Gökbuget N, Dombret H, Ribera J-M, et al. International reference analysis of outcomes in adults with B-precursor Ph-negative relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; **101**: 1524–33. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144311>.
- 34 Tallen G, Ratei R, Mann G, et al. Long-Term Outcome in Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia After Time-Point and Site-of-Relapse Stratification and Intensified Short-Course Multidrug Chemotherapy: Results of Trial ALL-REZ BFM 90. *Journal of Clinical Oncology* 2010; **28**: 2339–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.1983>.
- 35 Oriol A, Vives S, Hernandez-Rivas JM, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. *Haematologica* 2010; **95**: 589–96. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.014274>.
- 36 Gokbuget N, Stanze D, Beck J, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of

- stem cell transplantation. *Blood* 2012; **120**: 2032–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399287>.
- 37 Fielding AK, Richards SM, Chopra R, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* 2006; **109**: 944–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-018192>.
- 38 Eckert C, Henze G, Seeger K, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 2736–42. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5680>.
- 39 Henze G, Fengler R, Hartmann R, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Niethammer D, Riehm H. Six-Year Experience With a Comprehensive Approach to the Treatment of Recurrent Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL-REZ BFM 85). A Relapse Study of the BFM Group. *Blood* 1991; **78**: 1166–72.
- 40 Eckert C, Hagedorn N, Sramkova L, et al. Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia* 2015; **29**: 1648–55. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.59>.
- 41 for the GET-LALA Group, the Swiss Group for Clinical Cancer Research SAKK, the Australasian Leukaemia, Lymphoma Group, et al. Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia* 2007; **21**: 1907–14. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404824>.
- 42 Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Köhler G, Lamers MC. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Current Biology* 1997; **7**.
- 43 Schulte RJ, Campbell MA, Fischer WH, Sefton BM. Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. *Science* 1992; **258**: 1001–04. <https://doi.org/10.1126/science.1279802>.
- 44 LePrince C, Draves KE, Geahlen RL, Ledbetter JA, Clark EA. CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 3236–40.
- 45 Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, et al. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 1995; **269**: 242–44. <https://doi.org/10.1126/science.7618087>.
- 46 Stoddart A, Ray RJ, Paige CJ. Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. *International Immunology* 1997; **9**: 1571–79.
- 47 Raponi S, Propris MS de, Intoppa S, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic

- leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma* 2011; **52**: 1098–107. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.559668>.
- 48 Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2016; **375**: 740–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509277>.
- 49 Scharenberg AM, Humphries LA, Rawlings DJ. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 778–89. <https://doi.org/10.1038/nri2172>.
- 50 Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology* 2010; **28**: 185–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101216>.
- 51 Depoil D, Fleire S, Treanor BL, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nature Immunology* 2008; **9**: 63–72. <https://doi.org/10.1038/ni1547>.
- 52 Harwood NE, Batista FD. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* 2008; **28**: 609–19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.007>.
- 53 Tuveson DA, Carter RH, Soltoff SP, Fearon DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 1993; **260**: 986–89. <https://doi.org/10.1126/science.7684160>.
- 54 Li X, Sandoval D, Freeberg L, Carter RH. Role of CD19 tyrosine 391 in synergistic activation of B lymphocytes by coligation of CD19 and membrane Ig. *Journal of Immunology* 1997; **158**: 5649–57.
- 55 Walker JA, Smith KGC. CD22: an inhibitory enigma. *Immunology* 2008; **123**: 314–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02752.x>.
- 56 Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2017; **376**: 836–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609783>.
- 57 Locatelli F, Zugmaier G, Rizzari C, et al. Effect of Blinatumomab vs Chemotherapy on Event-Free Survival Among Children With High-risk First-Relapse B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2021; **325**: 843–54. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0987>.
- 58 Brown PA, Ji L, Xu X, et al. Effect of Postreinduction Therapy Consolidation With Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults With First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2021; **325**: 833–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0669>.
- 59 Aldoss I, Song J, Stiller T, et al. Correlates of resistance and relapse during blinatumomab therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Hematology* 2017; **92**: 858–65. <https://doi.org/10.1002/ajh.24783>.



- 60 Stackelberg A von, Locatelli F, Zugmaier G, et al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 2016; **34**: 4381–89. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.3301>.
- 61 Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 4134–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.3247>.
- 62 Rives S, Maude SL, Hiramatsu H, et al. S112: Tisagenlecleuvel in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory b-cell acute lymphoblastic leukemia: Final analyses from the ELIANA study. *HemaSphere* 2022; **6**: 13–14. <https://doi.org/10.1097/01.HS9.0000843344.19780.98>.
- 63 Renier J, Brentjens, Kevin J, Curran. Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012: 143–51.
- 64 Subklewe M. BiTEs better than CAR T cells. *Blood Adv* 2021; **5**: 607–12.
- 65 Subklewe M, Bergwelt-Baildon M von, Humpe A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother* 2019; **46**: 15–24. <https://doi.org/10.1159/000496870>.
- 66 Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 2018; **6**: 56. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9>.
- 67 Gofshteyn JS, Shaw PA, Teachey DT, et al. Neurotoxicity after CTL019 in a pediatric and young adult cohort. *Ann Neurol* 2018; **84**: 537–46. <https://doi.org/10.1002/ana.25315>.
- 68 Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov* 2016; **6**: 664–79. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0040>.
- 69 Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; **25**: 625–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758>.
- 70 Gardner RA, Ceppi F, Rivers J, et al. Preemptive mitigation of CD19 CAR T-cell cytokine release syndrome without attenuation of antileukemic efficacy. *Blood* 2019; **134**: 2149–58.
- 71 Mestermann K, Giavridis T, Weber J, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci Transl Med* 2019; **11**.
- 72 Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv* 2019; **3**: 711–17.

- 73 Jan M, Scarfò I, Larson RC, Walker A, Schmidts A, Guirguis AA, Gasser JA, Słabicki M, Bouffard AA, Castano AP, Kann MC, Cabral ML, Tepper A, Grinshpun DE, Sperling AS, Kyung T, Sievers QL, Birnbaum ME, Maus MV, Ebert BL. Reversible ON- and OFF-switch chimeric antigen receptors controlled by lenalidomide. *Sci Transl Med*; **13**.
- 74 Parker KR, Migliorini D, Perkey E, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell* 2020; **183**: 126-142.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.022>.
- 75 Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* 2016; **127**: 2406–10. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-665547>.
- 76 Jacoby E, Nguyen SM, Fountaine TJ, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun* 2016; **7**: 12320.
- 77 Rabilloud T, Potier D, Pankaew S, Nozais M, Loosveld M, Payet-Bornet D. Single-cell profiling identifies pre-existing CD19-negative subclones in a B-ALL patient with CD19-negative relapse after CAR-T therapy. *Nat Commun* 2021; **12**: 865. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21168-6>.
- 78 Ruella M, Xu J, Barrett DM, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med* 2018; **24**: 1499–503. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>.
- 79 Watanabe K, Terakura S, Martens AC, et al. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3  $\zeta$  Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* 2015; **194**: 911–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402346>.
- 80 Majzner RG, Rietberg SP, Sotillo E, et al. Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov* 2020; **10**: 702–23. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0945>.
- 81 Nerretter T, Letschert S, Götz R, et al. Super-resolution microscopy reveals ultra-low CD19 expression on myeloma cells that triggers elimination by CD19 CAR-T. *Nat Commun* 2019; **10**: 3137. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10948-w>.
- 82 Ramakrishna S, Highfill SL, Walsh Z, et al. Modulation of Target Antigen Density Improves CAR T-cell Functionality and Persistence. *Clin Cancer Res* 2019; **25**: 5329–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3784>.
- 83 Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med* 2018; **24**: 20–28. <https://doi.org/10.1038/nm.4441>.

- 84 Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature* 2019; **568**: 112–16. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1054-1>.
- 85 Walker AJ, Majzner RG, Zhang L, et al. Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase. *Mol Ther* 2017; **25**: 2189–201. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.008>.
- 86 Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019; **16**: 372–85. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0184-6>.
- 87 Finney OC, Brakke HM, Rawlings-Rhea S, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest* 2019; **129**: 2123–32. <https://doi.org/10.1172/JCI125423>.
- 88 Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 2016; **126**: 2123–38. <https://doi.org/10.1172/JCI85309>.
- 89 Blank CU, Haining WN, Held W, et al. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol* 2019; **19**: 665–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0221-9>.
- 90 Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology* 2011; **12**: 492–99. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
- 91 Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature* 2019; **576**: 293–300. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1805-z>.
- 92 Singh N, Lee YG, Shestova O, et al. Impaired Death Receptor Signaling in Leukemia Causes Antigen-Independent Resistance by Inducing CAR T-cell Dysfunction. *Cancer Discov* 2020; **10**: 552–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0813>.
- 93 Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 2020; **382**: 545–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>.
- 94 Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015; **21**: 581–90. <https://doi.org/10.1038/nm.3838>.
- 95 Anand P, Guillaumet-Adkins A, Dimitrova V, et al. Single cell RNA-seq reveals developmental plasticity with coexisting oncogenic and immune evasion programs in ETP-ALL. *Blood* 2020; **137**: 2463–80. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004547>.
- 96 Ghorashian S, Kramer AM, Onuoha S, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nat Med* 2019; **25**: 1408–14. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0549-5>.

- 97 Duan Y, Chen R, Huang Y, et al. Tuning the ignition of CAR: optimizing the affinity of scFv to improve CAR-T therapy. *Cell Mol Life Sci* 2021; **79**: 14. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04089-x>.
- 98 Katsarou A, Sjöstrand M, Naik J, et al. Combining a CAR and a chimeric costimulatory receptor enhances T cell sensitivity to low antigen density and promotes persistence. *Sci Transl Med* 2021; **13**: eabh1962.
- 99 Gudipati V, Rydzek J, Doel-Perez I, et al. Inefficient CAR-proximal signaling blunts antigen sensitivity. *Nature Immunology* 2020; **21**: 848–56. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0719-0>.
- 100 Cohen AD, Melenhorst JJ, Garfall AL, et al. Predictors of T Cell Expansion and Clinical Responses Following B-Cell Maturation Antigen-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy (CART-BCMA) for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood* 2018; **132**: 1974. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119665>.
- 101 Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest* 2019; **129**: 2210–21. <https://doi.org/10.1172/JCI126397>.
- 102 Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; **23**: 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2010.02.001>.
- 103 Ek S, Högerkorp C-M, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CAK. Mantle Cell Lymphomas Express a Distinct Genetic Signature Affecting Lymphocyte Trafficking and Growth Regulation as Compared with Subpopulations of Normal Human B Cells. *Cancer Research*; **62**: 4398–405.
- 104 Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med* 2017; **68**: 139–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062315-120245>.
- 105 Ma S, Li X, Wang X, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci* 2019; **15**: 2548–60. <https://doi.org/10.7150/ijbs.34213>.
- 106 Köhrer S, Havranek O, Seyfried F, et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* 2016; **30**: 1246–54. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.9>.
- 107 Kim E, Hurtz C, Koehrer S, et al. Ibrutinib inhibits pre-BCR+ B-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BTK and BLK. *Blood* 2017; **129**: 1155–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-722900>.
- 108 Geng H, Hurtz C, Lenz KB, et al. Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2015; **27**: 409–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.003>.

- 109 Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 195–205. <https://doi.org/10.1038/nri2491>.
- 110 Ohnishi K, Melchers F. The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nature Immunology* 2003; **4**: 849–56. <https://doi.org/10.1038/ni959>.
- 111 Bankovich AJ, Raunser S, Juo ZS, Walz T, Davis MM, Garcia KC. Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* 2007; **316**: 291–94. <https://doi.org/10.1126/science.1139412>.
- 112 Guo B, Kato RM, Garcia-Lloret M, Wahl MI, Rawlings DJ. Engagement of the Human Pre-B Cell Receptor Generates a Lipid Raft–Dependent Calcium Signaling Complex. *Immunity* 2000; **13**: 243–53.
- 113 Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 2016; **127**: 1117–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679134>.
- 114 Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, et al. The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 2684–96. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1527>.
- 115 Qin JS, Johnstone TG, Baturevych A, et al. Antitumor Potency of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy, Lisocabtagene Maraleucel in Combination With Ibrutinib or Acalabrutinib. *Journal of Immunotherapy* 2020; **43**: 107–20. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000307>.
- 116 Dufva O, Koski J, Maliniemi P, et al. Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T cell cytotoxicity. *Blood* 2019; **135**: 597–609. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002121>.
- 117 Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016; **126**: 3814–26. <https://doi.org/10.1172/JCI87366>.
- 118 Spiegel JY, Patel S, Muffly L, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med* 2021; **27**: 1419–31. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01436-0>.
- 119 Schneider D, Xiong Y, Wu D, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer* 2017; **5**: 42. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0246-1>.

- 120 Martyniszyn A, Krahl A-C, André MC, Hombach AA, Abken H. CD20-CD19 Bispecific CAR T Cells for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Hum Gene Ther* 2017; **28**: 1147–57. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.126>.
- 121 Schneider D, Xiong Y, Wu D, Hu P, Alabanza L, Steimle B, Mahmud H, Anthony-Gonda K, Krueger W, Zhu Z, Dimitrov DS, Orentas RJ, Dropulić B. Trispecific CD19-CD20-CD22–targeting duoCAR-T cells eliminate antigen-heterogeneous B cell tumors in preclinical models. *Sci Transl Med* 2021; **13**: eabc6401.
- 122 Fousek K, Watanabe J, Joseph SK, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia* 2021; **35**: 75–89. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0792-2>.
- 123 Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Frontiers in Oncology* 2019; **9**: 146.
- 124 Majzner RG, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov* 2018; **8**: 1219–26. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0442>.
- 125 Dai H, Wu Z, Jia H, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* 2020; **13**: 30. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00856-8>.
- 126 Libert D, Yuan CM, Masih KE, et al. Serial evaluation of CD19 surface expression in pediatric B-cell malignancies following CD19-targeted therapy. *Leukemia* 2020; **34**: 3064–69. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0760-x>.
- 127 Regina M. Myers, Agne Taraseviciute, Seth M. Steinberg, et al. Blinatumomab Nonresponse and High-Disease Burden Are Associated With Inferior Outcomes After CD19-CAR for B-ALL. *Journal of Clinical Oncology*; **40**: 932–44. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01405>.
- 128 Pillai V, Muralidharan K, Meng W, et al. CAR T-cell therapy is effective for CD19-dim B-lymphoblastic leukemia but is impacted by prior blinatumomab therapy. *Blood Adv* 2019; **3**: 3539–49. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000692>.
- 129 Molina JC, Shah NN. CAR T cells better than BiTEs. *Blood Adv* 2021; **5**: 602–06. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003554>.
- 130 Cappell KM, Kochenderfer JN. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; **18**: 715–27. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00530-z>.
- 131 Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, et al. In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Mol Ther* 2018; **26**: 2727–37. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.09.009>.

132 Enblad G, Karlsson H, Gammalgård G, et al. A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia. *Clin Cancer Res* 2018; **24**: 6185–94. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0426>.

## **6. Anhang**

### **6.1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema – B-Zell Entwicklung <sup>12,13</sup>	S. 12
Abbildung 2: B-Zell Rezeptor Signalosom und Korezeptoren <sup>50,52,55</sup>	S. 18
Abbildung 3: Entwicklungsgenerationen von CAR T Zellen <sup>63,64</sup>	S. 20

### **6.2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Immunphänotypische Klassifizierung – Linienzugehörigkeit <sup>18</sup>	S. 14
Tabelle 2: Immunphänotypische Klassifizierung – ALL-Subtyp <sup>18</sup>	S. 14
Tabelle 3: WHO-Klassifikation 5. Edition <sup>21</sup>	S. 15