

## Zusammenfassung der Dissertation

Avinoam Reichman  
Dr. med.

### **Detektionsmethoden für die Vermessung der Frequenz BCMA-spezifischer CAR-T-Zellen**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael Schmitt

Die Therapie mit auf das B-Zell-Maturierungs-Antigen (BCMA) gerichteten chimären-Antigenrezeptor-T-Zellen (CART; BCMA.CART) ist eine vielversprechende therapeutische Option bei Patienten mit rezidivierendem oder refraktären Multiplen Myelom und anderen Non-Hodgkin-Lymphomen. Aus der Therapie mit CD19 gerichteten CART ist bekannt, dass eine ausreichende Menge und eine hinreichende Expansionsfähigkeit der CART im Patienten essenziell für den Therapieerfolg ist. Um diese Kennwerte zu bestimmen und aus dem Monitoring klinische Entscheidungen ableiten zu können, braucht es ein Verfahren, BCMA.CART möglichst sensitiv und spezifisch darzustellen. Diese Arbeit hat die Detektionsmöglichkeiten der beiden gängigsten Verfahren, Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR), jeweils einzeln untersucht und dann vergleichend gegenübergestellt.

BCMA.CART aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes von drei unterschiedlichen gesunden Spendern wurden hergestellt. Daraufhin wurde mithilfe von drei unterschiedlichen Detektionsreagenzien für die Durchflusszytometrie die Transduktionseffizienz der drei BCMA.CART-Produkte unterschiedlicher Spender bestimmt. Dabei wurden zwei BCMA-spezifische, sowie ein universell einsetzbarer, unspezifischer Antikörper eingesetzt. Eine Einzelgen-Kopien (single copy gene; SCG) basierte Duplex (DP)-Polymerasekettenreaktion (SCG-DP-PCR) wurde mit den entsprechenden auf den BCMA-Vektorgenlokus gerichteten Primern entwickelt und validiert. Daraufhin wurden BCMA.CART von drei verschiedenen Spendern jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen mit nicht-transduzierten Zellen verdünnt. Es erfolgte schließlich die quantitative Messung der BCMA.CART-Konzentrationen jeweils mittels Durchflusszytometrie und SCG-DP-PCR.

Zwischen den drei unterschiedlichen Detektionsreagenzien für die Durchflusszytometrie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Fähigkeit, BCMA.CART darzustellen. Große Unterschiede in der Spezifität waren allerdings bei dem anti-humanen IgG PE zu beobachten mit einer falsch-positiven Färbung von  $7,2 \pm 9,2\%$  (BCMA-Detektionsreagenz:  $0,04\% \pm 0,02\%$ ; PE-markiertes BCMA Peptid:  $0,025 \pm 0,06$ ). Die SCG-DP-PCR konnte erfolgreich in H<sub>2</sub>O-Standardreihen und genomischer DNA validiert werden. Beim Vergleich beider Verfahren konnte eine Überlegenheit der qPCR bei sehr geringen Konzentrationen ( $<0.4\%$ ) an BCMA.CART beobachtet werden. Insgesamt tendierte die qPCR zu einer konstanten Überquantifizierung.

Für den Einsatz der Durchflusszytometrie zum Nachweis von BCMA.CART spricht vor allem, dass es sich hierbei um eine direkt zelluläre Methode handelt, die durch den Einsatz von BCMA-spezifischen Reagenzien zusätzlich Aussagen über die Viabilität der CART und weiterer Aktivitäts-Marker der CART geben kann. In Situationen in denen von einer sehr geringen CART-Konzentration, z.B. kurz nach Applikation, ausgegangen werden kann, ist die qPCR durch ihre höhere Sensitivität besser geeignet. Die Wichtigkeit eines präzisen Nachweises von BCMA.CART liegt vor allem in der hiervon abzuleitenden klinischen Entscheidung über ein weiteres Vorgehen. Bei Patienten mit sehr geringen CART können z.B. immunmodulatorische Wirkstoffe wie Lenalidomid zu einer stärkeren T-Zell-, und damit CART-Expansion führen. Bei einem vollständigen Verlust von CART kann eine erneute Transfusion sinnvoll sein. Abschließend lässt sich sagen, dass beide Nachweisverfahren verlässlich BCMA.CART nachweisen können. Bei der Durchflusszytometrie sollten Reagenzien mit einer niedrigen Hintergrundfärbung angewandt werden.