

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

TRIFUNKTIONALE ANTIKÖRPER IN DER TUMORTHERAPIE: BEDEUTUNG GEGENREGULATORISCHER MECHANISMEN FÜR DIE ANTITUMOR-ANTWORT UND IHRE THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG

Nina Felicitas Deppisch

aus

Hechingen, Deutschland

2015

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne des § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt – betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika M. Vollmar von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,15. Juli 2015.....

Nina Deppisch

Dissertation eingereicht am

11. Juni 2015

1. Gutachterin

Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar

2. Gutachter

Herr Prof. Dr. med. R. Mocikat

Mündliche Prüfung am

07. Juli 2015

Meiner lieben Familie

Für meinen Perlin

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Das Immunsystem	4
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	4
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	6
1.1.2.1 <i>T-Effektorzellen.....</i>	<i>7</i>
1.1.2.2 <i>Regulation der Immunantwort.....</i>	<i>8</i>
1.2 Tumorimmunologie	11
1.2.1 Immuneditierung von Tumoren.....	11
1.2.2 Tumorimmuntherapie.....	12
1.2.3 Antikörpertherapie	13
1.2.3.1 <i>Kontrollpunkt-Inhibitoren</i>	<i>13</i>
1.2.3.2 <i>Trifunktionale bispezifische Antikörper</i>	<i>14</i>
1.3 Aufgabenstellung.....	18
2 MATERIAL & METHODEN.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien.....	21
2.1.3 Medien und Puffer	23
2.1.4 Kits	24
2.1.5 Mäuse.....	24
2.1.6 Antikörper und Multimere.....	25
2.1.7 Peptide	28
2.1.8 Software.....	28
2.2 Methoden	29

2.2.1	Zelllinien und Zellkulturbedingungen	29
2.2.2	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milzen.....	30
2.2.3	Generierung von dendritischen Zellen	30
2.2.4	<i>In-vivo</i> -Versuche	31
2.2.4.1	<i>Analyse von T-Zellen</i>	31
2.2.4.2	<i>Pharmakokinetik und Anti-Antikörper</i>	31
2.2.4.3	<i>Therapieversuche</i>	32
2.2.4.4	<i>Immunisierungen und Protektionsversuche</i>	33
2.2.5	Histologische Methoden.....	34
2.2.6	Quantifizierung von Surek in Plasmaproben	34
2.2.7	Bestimmung der Anti-Antikörper-Titer.....	35
2.2.8	T-Zell-Stimulationen.....	35
2.2.9	Quantifizierung von Zytokinen	36
2.2.10	Durchflusszytometrie.....	37
2.2.11	Zytotoxizität	38
2.2.12	Statistische Auswertung	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Bedeutung der Applikationsroute für die Wirksamkeit trifunktionaler Antikörper	39
3.1.1	Therapeutische Wirksamkeit von s.c. verabreichtem Surek	39
3.1.1.1	<i>Surek s.c. führt zur Aktivierung von T-Zellen</i>	39
3.1.1.2	<i>Surek s.c. zeigt antitumorale Wirkung in vivo</i>	40
3.1.2	Lokale und systemische Verträglichkeit der s.c. Applikation von Surek	41
3.1.2.1	<i>Surek s.c. verursacht keine lokale Entzündungsreaktion</i>	41
3.1.2.2	<i>Surek s.c. zeigt ein verbessertes systemisches Nebenwirkungsprofil</i>	43
3.1.3	Pharmakokinetik von Surek und Induktion von Anti-Antikörpern	44
3.1.3.1	<i>Pharmakokinetisches Profil von Surek</i>	44
3.1.3.2	<i>Entstehung eines Wirkstoffdepots in der Haut nach Surek s.c.</i>	45
3.1.3.3	<i>Surek s.c. induziert Anti-Antikörper</i>	46
3.1.4	Verändertes Zytokinmilieu nach Surek s.c. versus i.v.....	47
3.1.4.1	<i>Surek s.c. induziert eine moderate Ausschüttung von Th1-Zytokinen</i>	47

3.1.4.2	<i>Surek s.c. führt zur Reduktion gegenregulatorischer Mechanismen</i>	49
3.2	Kombination trifunktionaler Antikörper mit einem CTLA-4-blockierenden Antikörper	51
3.2.1	Entwicklung eines kombinierten Behandlungskonzeptes	51
3.2.1.1	<i>Surek induziert regulatorische T-Zellen</i>	51
3.2.1.2	<i>Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf das Tumorwachstum</i>	52
3.2.1.3	<i>Hypothese für ein kombiniertes Behandlungskonzept – Einfluss eines CTLA-4-blockierenden Antikörpers auf Therapie und Vakzinierung mit trifunktionalen Antikörpern</i>	54
3.2.2	Evaluierung des Kombinationsansatzes im B78-D14-Modell: Therapie.....	55
3.2.2.1	<i>Verträglichkeit der Kombinationstherapie in vivo</i>	55
3.2.2.2	<i>Kombinationstherapie zeigt kein synergistisches Potenzial</i>	56
3.2.3	Evaluierung des Kombinationsansatzes im B78-D14-Modell: Vakzinierung.....	57
3.2.3.1	<i>Kombination führt zur Verbesserung des immunologischen Gedächtnisses in vivo</i>	57
3.2.3.2	<i>Einfluss einer kombinierten Vakzinierung auf die Gedächtnisinduktion – Analyse der Zytokine</i>	58
3.2.3.3	<i>Einfluss einer kombinierten Vakzinierung auf die Gedächtnisinduktion – Analyse der T-Zellen</i>	60
3.2.3.3.1	<i>Anreicherung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen</i>	60
3.2.3.3.2	<i>Beeinträchtigung der Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen</i>	61
3.2.3.3.3	<i>Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Tumorprotektion in vivo</i>	65
3.2.3.3.4	<i>Induktion von CD4⁺ T-Gedächtniszellen</i>	66
3.2.4	Evaluierung des Kombinationsansatzes im B16-EpCAM-Modell: Therapie und Vakzinierung	69
4	DISKUSSION	73
4.1	Optimierung der Therapie mit trifunktionalen Antikörpern durch Modifikation der Applikationsroute	74
4.1.1	Therapeutische Wirksamkeit und Verträglichkeit von s.c. appliziertem Surek	74

4.1.2	Auswirkungen auf den klinischen Einsatz von trifunktionalen Antikörpern.....	78
4.2	Differenzieller Effekt einer Kombinationsbehandlung aus trifunktionalen Antikörpern und CTLA-4-Blockade auf Tumorelimination und Gedächtnisinduktion	80
4.2.1	Einfluss der CTLA-4-Blockade auf die Therapie mit trifunktionalen Antikörpern.....	82
4.2.2	Einfluss der CTLA-4-Blockade auf die Vakzinierung mit trifunktionalen Antikörpern.....	83
4.2.3	Bedeutung der präklinischen Untersuchungen für die Anwendung in der Klinik.....	86
4.3	Ausblick.....	88
5	LITERATURVERZEICHNIS	90
6	ANHANG	103
6.1	Veröffentlichungen.....	103
6.1.1	Fachpublikation.....	103
6.1.2	Poster und Vorträge.....	103
6.2	Danksagung.....	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben SI-Einheiten und allgemein gebräuchlichen Abkürzungen wurden weiterhin folgende Abkürzungen verwendet:

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AUC	<i>Area Under the Curve</i> ; Fläche unter der Kurve
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4</i>
DEREG	<i>Depletion of Regulatory T Cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Diphtherietoxin
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i> ; antigenbindender Teil des Antikörpers
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> ; Teil der konstanten Kette des Antikörpers
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
gp	Glykoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICOS	<i>Inducible Costimulator</i>

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MAGE	<i>Melanoma Antigen Gene</i>
MAMA	Maus-Anti-Maus-Antikörper
MARA	Maus-Anti-Ratten-Antikörper
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ns	nicht signifikant
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PD-L1/2	<i>Programmed Death Ligand 1/2</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> ; Mustererkennungsrezeptoren
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
s.c.	Subkutan
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Standardfehler
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
trAk	trifunktionaler bispezifischer Antikörper
Treg	regulatorische T-Zelle
Trp-2	<i>Tyrosinase-related protein 2</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

ZUSAMMENFASSUNG

Trifunktionale bispezifische Antikörper (trAk) sind vielversprechende Immuntherapeutika zur Behandlung von Tumoren. Aufgrund ihres intakten Fc-Teils rekrutieren sie neben T-Zellen auch akzessorische Immunzellen in unmittelbare Tumornähe und aktivieren so das Immunsystem am Ort des Geschehens. In der Folge werden (1) Tumorzellen zielgerichtet eliminiert und (2) Tumordebris durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) phagozytiert, prozessiert und in Form immunogener Peptide gegenüber T-Zellen präsentiert, so dass ein langanhaltendes tumorspezifisches T-Zell-Gedächtnis entsteht. TrAk führen daher nicht nur zur Tumorelimination, sondern vermitteln zusätzlich einen Vakzinierungseffekt. Seit 2009 werden trAk erfolgreich in der Klinik eingesetzt; dennoch besteht für die therapeutische Anwendung im Hinblick auf Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung weiterhin Verbesserungspotenzial. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Strategien zur Therapieoptimierung von trAk entwickelt und in einem bereits etablierten präklinischen Mausmodell untersucht.

Um die klinische Anwendung von trAk zukünftig zu verbessern, wird unter anderem die Modifikation der Applikationsroute diskutiert. Im Mausmodell wurden daher das therapeutische Potenzial sowie die Verträglichkeit verschiedener Applikationsformen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die subkutane (s.c.) Applikation von trAk der klassischen intravenösen (i.v.) Injektion überlegen ist. Denn obwohl nach s.c. Gabe von trAk geringere Plasmakonzentrationen erreicht wurden, war das Antitumor-Potenzial *in vivo* vergleichbar stark ausgeprägt. Nichtsdestoweniger zeigte die s.c. Applikation von trAk eine verbesserte Verträglichkeit gegenüber der i.v. Injektion. Als mögliche Erklärung hierfür kann die langsame, kontinuierliche Absorption des trAk nach s.c. Gabe angeführt werden, was zur Ausbildung eines konstanten Plasmaspiegels führt und in einer verzögerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine resultiert. Dennoch reicht diese moderate Th1-Zytokinfreisetzung bereits aus, um eine effektive Antitumor-Antwort nach s.c. Therapie aufzubauen. Weiterhin wurde

beobachtet, dass durch die s.c. Gabe von trAk, verglichen mit der i.v. Injektion, weniger gegenregulatorische Mechanismen induziert werden. So war die Konzentration des Th2-Zytokins Interleukin-10 (IL-10) im Serum s.c. behandelter Tiere signifikant reduziert sowie die Expression des inhibitorischen T-Zell-Oberflächenmoleküls CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4*) und der Anteil regulatorischer T-Zellen (Treg) vergleichsweise gering. Dies erklärt womöglich auch, weshalb die moderate Th1-Zytokinausschüttung bereits genügte, um den Tumor – trotz geringerer Bioverfügbarkeit des trAk nach s.c. Gabe – erfolgreich abzustößen.

Da, wie bereits erwähnt, in Folge trAk-induzierter T-Zell-Aktivierung auch gegenregulatorische Prozesse in Gang gesetzt werden, lag es nahe, diese in einem weiteren Ansatz therapeutisch zu modulieren und so die Wirksamkeit von trAk zu verstärken. Besonders Treg, welche nach trAk-Gabe proliferierten und eine hohe Expression des inhibitorischen Oberflächenmoleküls CTLA-4 aufwiesen, stellen in dieser Hinsicht ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Basierend auf den guten Erfolgen des Anti-CTLA-4-Antikörpers Ipilimumab in der Melanomtherapie wurde ein kombiniertes Behandlungskonzept entwickelt und untersucht, ob die Antikörpervermittelte CTLA-4-Blockade im Mausmodell einen synergistischen Effekt auf die Antitumor-Antwort (1) nach Therapie und (2) nach Vakzinierung mit trAk zeigt:

(1) Im Hinblick auf die direkte Tumorabstoßung *in vivo* zeichnete sich, im Vergleich zur trAk-Monotherapie, kein zusätzlicher Überlebensvorteil durch die Kombinationstherapie ab.

(2) Im Hinblick auf die Vakzinierung hingegen konnte durch die zusätzliche CTLA-4-Blockade die Tumorprotektion nach Induktion einer Immunantwort *in vivo* positiv beeinflusst werden. So zeigten Mäuse, die die kombinierte Vakzinierung erhielten, einen verbesserten Tumorschutz gegenüber Tieren, die mit trAk alleine immunisiert wurden. Die Kombination aus trAk und CTLA-4-blockierendem Antikörper scheint also den Vakzinierungseffekt und die Induktion eines immunologischen Gedächtnisses zu verbessern. Um den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu entschlüsseln, wurden

Th1- und Th2-Zytokine im Mausserum bestimmt sowie CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung und *In-vitro*-Stimulation charakterisiert. Während die zusätzliche CTLA-4-Blockade das Th1-Zytokinprofil nach Vakzinierung mit trAk alleine nicht beeinflusste, konnte auf zellulärer Ebene eine Anreicherung tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Nichtsdestoweniger wiesen die CD8⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung, in Bezug auf Interferon- γ (IFN- γ) -Freisetzung und Zytotoxizität, eine beeinträchtigte Effektorfunktion auf. CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) hingegen wurden positiv beeinflusst; so führte die kombinierte Vakzinierung zum Anstieg von CD4⁺ Effektor- sowie Zentral-Gedächtnis-T-Zellen. Ferner exprimierten CD4⁺ Gedächtniszellen das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD137, was die Antigen-spezifische Aktivierung dieser T-Zellen anzeigt. CD4⁺ T-Zellen sind essenziell für die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses; auch am verstärkten Tumorschutz nach Vakzinierung mit trAk und einem CTLA-4-blockierenden Antikörper scheinen sie wesentlich beteiligt zu sein.

Diese im präklinischen Modell erarbeiteten Ergebnisse sind relevant für das Verständnis des Wirkmechanismus sowie für die praktische Anwendung von trAk in der Klinik.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt unseren Körper vor Infektionen durch eindringende Krankheitserreger. Um diese Aufgabe zu bewältigen, muss es in der Lage sein, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden und Pathogene oder andere schädliche Substanzen zu identifizieren, sobald diese die physikalischen, chemischen und mikrobiellen Barrieren des Körpers überwunden haben. Weiterhin muss das Immunsystem diese effektiv eliminieren und sich – um einen stärkeren Schutz zu gewährleisten – bei erneuter Exposition an sie erinnern. Um eine solche effektive Immunantwort aufzubauen, bedarf es eines komplexen Zusammenspiels von angeborenen, unspezifischen und adaptiven, spezifischen Immunabwehrmechanismen unter Beteiligung verschiedener Organe, Zellen und löslicher Faktoren. (de Visser, *et al.* 2006; Murphy, *et al.* 2009; Vollmar, *et al.* 2012).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Komponente des Immunsystems stellt die erste Abwehrlinie dar. Diese reagiert schnell – innerhalb weniger Stunden –, aber unspezifisch auf eingedrungene Pathogene.

Das angeborene Immunsystem umfasst das Komplementsystem sowie zelluläre Bestandteile wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DZ) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Immunzellen sind in der Lage, mittels Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) bestimmte Pathogen-assoziierte Strukturen (z.B. Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellwand) auf eingedrungenen Krankheitserregern zu erkennen, und sorgen für deren schnelle Beseitigung. Im Gewebe werden die Eindringlinge von Makrophagen

phagozytiert, die daraufhin aktiviert werden und verschiedene lösliche Botenstoffe, sogenannte Zytokine und Chemokine, sezernieren. Auf diese Weise werden weitere Immunzellen aus dem Blutkreislauf an den Infektionsherd gelockt und aktiviert. Im Rahmen der ausgelösten Entzündungsreaktion werden die eingedrungenen Krankheitserreger durch rekrutierte neutrophile Granulozyten und unreife DZ schließlich eliminiert.

Nach Phagozytose der Krankheitserreger reifen DZ und wandern in die regionalen Lymphknoten, wo sie antigene Peptide des phagozytierten Pathogens auf ihrer Oberfläche gegenüber adaptiven Immunzellen, den T-Lymphozyten, präsentieren. DZ, die in diesem Fall auch als APZ bezeichnet werden, induzieren auf diese Weise die adaptive Immunantwort, fungieren also als Vermittler zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem.

Auch NK-Zellen nehmen eine solche Zwischenstellung ein; sie zirkulieren im Blut und sind hauptsächlich für die Eliminierung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen verantwortlich, welche sie an deren „fehlenden Selbst“ – also dem Verlust der körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) – erkennen. Bei Kontakt sezernieren NK-Zellen dann ohne weitere Aktivierung zytotoxische Faktoren wie Perforin und Granzym, was zur unmittelbaren Lyse der Zielzelle führt. Außerdem setzen NK-Zellen in hohem Maß das proinflammatorische Zytokin IFN- γ frei, welches weitere Makrophagen aktiviert und auch die adaptive Immunantwort stimuliert. (Parkin und Cohen 2001; de Visser, *et al.* 2006; Murphy, *et al.* 2009).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Komponente des Immunsystems zeichnet sich durch eine hochspezifische Erkennung von pathogenen Antigenen und die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Dieser Prozess braucht zwar Zeit, wird jedoch bei wiederholter Exposition gegenüber demselben Antigen immer effektiver.

Das adaptive Immunsystem, bestehend aus B- und T-Lymphozyten, wird durch die angeborene Immunantwort – genauer durch die direkte Interaktion mit APZ sowie ein proinflammatorisches Zytokinmilieu – aktiviert. B- und T-Zellen exprimieren hochspezifische B-Zell-Rezeptoren (BZR) bzw. T-Zell-Rezeptoren (TZR) auf ihrer Oberfläche und erkennen damit jeweils nur ein bestimmtes Antigen. Damit ergibt sich ein umfangreiches Repertoire antigenspezifischer Rezeptoren, das infolge zufälliger somatischer Mutationen entstanden ist. Nach Exposition gegenüber dem Zielantigen im lymphoiden Gewebe wird die B- bzw. T-Zelle aktiviert, gefolgt von klonaler Expansion sowie Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (wobei die sezernierten Antikörper dieselbe Spezifität wie der entsprechende BZR besitzen) bzw. T-Effektorzellen. Auf diese Weise wird eine wirksame zellvermittelte sowie humorale Immunantwort aufgebaut, die letztlich zur Vernichtung des eingedrungenen Krankheitserregers führt. Nach erfolgreicher Antigen-Eliminierung stirbt ein Großteil der hochspezifischen B- und T-Zellen ab. Einige wenige überleben und bilden damit das immunologische Gedächtnis; bei wiederholter Exposition gegenüber dem Zielantigen sind diese Zellen in der Lage, schnell zu expandieren und eine effiziente Immunreaktion auszulösen. Diese besondere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems macht man sich auch bei der aktiven Immunisierung zunutze; durch die Impfung kommt der Körper mit einem potenziellen Krankheitserreger (in abgeschwächter Form) in Kontakt und baut eine Immunantwort auf. Wird er später tatsächlich mit dem Erreger infiziert, kann dieser in der Regel schnell und effizient eliminiert werden. (Parkin und Cohen 2001; Murphy, *et al.* 2009; Abbas, *et al.* 2014).

1.1.2.1 T-Effektorzellen

Naive T-Zellen entwickeln sich, wie auch die B-Zellen, aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Während B-Zellen über den gesamten Reifungsprozess hinweg im Knochenmark verweilen, wandern unreife T-Zellen als sogenannte Thymozyten für die weitere Entwicklung in den Thymus und gelangen nach erfolgreicher Selektion als reife $CD4^+$ Th0-Zellen bzw. $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) in den Blutkreislauf. Anschließend durchqueren die naiven T-Zellen kontinuierlich das lymphoide Gewebe, bis ihr TZR sein spezifisches Antigen auf APZ erkennt und die T-Zellen schließlich aktiviert werden. Dabei führt die Erkennung von endogenen Antigenen (virale oder tumorassoziierte Proteine), die in Verbindung mit MHC-I präsentiert werden, zur Aktivierung von $CD8^+$ ZTL, die ihre Zielzelle direkt anzugreifen vermögen und durch Freisetzung zytolytischer Faktoren töten. Hingegen ist die MHC-II-assoziierte Präsentation von exogenen Antigenen, die über Endozytose aufgenommen werden, Auslöser der Aktivierung von $CD4^+$ Th-Zellen, die hauptsächlich unterstützende Aufgaben übernehmen. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine stimulieren sie andere Immuneffektorzellen und tragen so indirekt zur Eliminierung der Pathogene bei. Abhängig vom Zytokinprofil unterscheidet man $CD4^+$ Th-Zellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) und $CD4^+$ Th-Zellen vom Typ 2 (Th2-Zellen). Th1-Zellen induzieren eine zellvermittelte Immunantwort. Sie produzieren vorwiegend IL-2, welches die Proliferation von T-Zellen fördert sowie die Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen positiv beeinflusst. Daneben sezernieren sie $IFN-\gamma$, welches Makrophagen und NK-Zellen aktiviert und essenziell für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene ist. Das von aktivierten Makrophagen freigesetzte IL-12 stimuliert wiederum die $IFN-\gamma$ -Produktion der Th1-Zellen. Durch positive Rückkopplung unterstützt $IFN-\gamma$ sodann die Entstehung von Th1-Zellen, während es die Differenzierung zu Th2-Zellen inhibiert. Th2-Zellen hingegen vermitteln eine humorale Immunantwort; nach Induktion durch IL-4 sezernieren sie IL-4, IL-5, IL-6 sowie IL-10, wodurch weitere Th2-Zellen entstehen und die Produktion von Antikörpern begünstigt wird. (Parkin und Cohen 2001; Murphy, *et al.* 2009; Abbas, *et al.* 2014).

Die Interaktion von TZR und Antigen-MHC-Komplex alleine – das sogenannte Signal 1 – ist jedoch nicht ausreichend für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle; zusätzlich bedarf es eines zweiten kostimulatorischen Signals (Greenfield, *et al.* 1998; Sharpe und Abbas 2006). Dieses wird in erster Linie vermittelt durch Bindung der B7-Oberflächenmoleküle CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) auf aktivierten DZ an den CD28-Rezeptor auf T-Zellen oder auch durch die Wechselwirkung von CD40 und seinem Liganden (CD40L). Nach adäquater Aktivierung der T-Zelle durch die beiden aufeinanderfolgenden Signale beginnt die antigenspezifische T-Zelle schließlich zu proliferieren. Es kommt zur klonalen Expansion und endgültigen Differenzierung zu den oben beschriebenen T-Effektorzellen. Diese sind in der Lage, das lymphoide Gewebe zu verlassen und am Ort der Entzündung ihre volle Funktion zu entfalten. Bleibt das sogenannte Signal 2 jedoch aus, wird die T-Zelle entweder anerg, d.h. unreaktiv oder stirbt den programmierten Zelltod (Parkin und Cohen 2001; Crespo, *et al.* 2013).

1.1.2.2 Regulation der Immunantwort

Um eine vollständige Eliminierung eingedrungener Krankheitserreger zu gewährleisten, werden zahlreiche Effektormechanismen aktiviert. Gleichzeitig muss jedoch eine Überreaktion des Immunsystems verhindert werden, da bei anhaltender Immunaktivierung eine schwerwiegende Schädigung von gesundem Gewebe droht. Zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase verfügt das Immunsystem daher auch über eine Reihe inhibitorischer Mechanismen, die die initiierte Immunantwort zu kontrollieren vermögen. (Parkin und Cohen 2001; Murphy, *et al.* 2009; Abbas, *et al.* 2014).

Einen wesentlichen Beitrag zur Regulation der T-Zellantwort leisten inhibitorische Korezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen – auch bekannt als immunologische Kontrollpunkte (Driessens, *et al.* 2009; Pardoll 2012). Nach Interaktion mit ihren Liganden vermitteln diese hemmende Signale, was zur Inaktivierung, verringerter

Proliferation sowie reduzierter Zytokinproduktion der T-Zelle führt. Eines der wichtigsten und bekanntesten inhibitorischen Moleküle ist CTLA-4. Das CD28-Homolog wird während der T-Zell-Aktivierung hochreguliert und bindet aufgrund einer 100-fach höheren Affinität kompetitiv an die B7-Liganden CD80 und CD86 auf APZ. Dadurch wird das kostimulatorische CD28/B7-Signal unterbrochen und die T-Zelle schließlich „abgeschaltet“ (Walunas, *et al.* 1994; Chambers, *et al.* 2001). Ein weiteres inhibitorisches Molekül ist PD-1 (*Programmed Death 1*). Ähnlich wie CTLA-4 wird es verstärkt auf aktivierten T-Zellen exprimiert und vermittelt nach Bindung an seine Liganden PD-L1 bzw. PD-L2 auf APZ oder Tumorzellen ebenfalls immunsuppressive Signale (Freeman, *et al.* 2000). Neben CTLA-4 und PD-1 konnten noch weitere koinhibitorische Rezeptoren identifiziert werden, die in der Lage sind, die T-Zell-Aktivierung zu begrenzen und so Dauer und Intensität der Immunantwort zu regulieren. Alle tragen sie wesentlich zur Aufrechterhaltung des Immungleichgewichts bei (Driessens, *et al.* 2009; Pardoll 2012).

Neben den vorgestellten intrinsischen, durch die T-Zelle selbst ausgelösten Regulationsmechanismen, existieren auch extrinsische Faktoren, die die T-Zell-Aktivierung von außen kontrollieren. Dazu zählt man die Zytokine IL-10 und TGF- β (*Transforming Growth Factor*) sowie ausschließlich immunsuppressiv wirkende Zellpopulationen wie myeloide Suppressorzellen und Treg.

Etwa 5-10 % aller peripheren T-Zellen sind Treg. Sie gehen, wie auch die Th1- und Th2-Zellen, aus der CD4⁺ T-Zellreihe hervor. Ihre Hauptaufgabe ist es, Immunantworten zu unterdrücken und unseren Körper vor Autoimmunität durch selbstreaktive T-Zellen zu schützen (Sakaguchi, *et al.* 2008). Phänotypisch unterscheiden sie sich von den CD4⁺ T-Effektorzellen durch die exklusive Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box protein 3*), welcher die Entwicklung und Funktion von Treg reguliert (Fontenot, *et al.* 2003; Zheng, *et al.* 2007). Des Weiteren exprimieren Treg verstärkt CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors, sowie CTLA-4 und andere inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Im Gegensatz zu T-Effektorzellen, die durch die Expression negativer Regulatormoleküle gehemmt werden, wird die suppressive

Aktivität sowie Proliferation der Treg dadurch verstärkt. Durch Produktion von IL-10 und TGF- β wird die Funktion verschiedener Immunzellen inhibiert und gleichzeitig die Entstehung neuer Treg begünstigt. Weiterhin entziehen Treg, infolge der hohen Expression von CD25, das für die Aktivität von NK-Zellen sowie die Proliferation von T-Effektorzellen essenzielle IL-2, so dass diese supprimiert werden. Die genannten Mechanismen tragen alle zum immunsuppressiven Potenzial der Treg bei und helfen überschießende Immunreaktionen zu verhindern (Sakaguchi, *et al.* 2006; Jacobs, *et al.* 2012; Pardoll 2012; Oleinika, *et al.* 2013).

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Immunität von Tumoren

Die Vorstellung, dass das Immunsystem nicht nur körperfremde Krankheitserreger, sondern auch körpereigene, entartete Zellen erkennen und eliminieren kann, ist schon sehr alt und geht zurück auf Paul Ehrlich, der dies bereits 1909 postulierte (Ehrlich 1909). Später griffen Burnet und Thomas diesen Gedanken in ihrer Theorie der Immunüberwachung wieder auf und beschreiben den protektiven Einfluss des Immunsystems auf die Entwicklung von Tumorerkrankungen (Burnet 1957; Thomas 1959). Entgegen dieser Hypothese treten jedoch auch in immunkompetenten Organismen Tumoren auf, die der Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Die ursprüngliche Theorie der Immunüberwachung wurde daher um das Konzept der Immunität erweitert (Dunn, *et al.* 2002). Danach schützt das Immunsystem nicht nur vor der Tumorentstehung, sondern prägt auch die Tumorimmunogenität. Dieser Prozess der Immunität wird in 3 Phasen unterteilt (Dunn, *et al.* 2002; Dunn, *et al.* 2004; Schreiber, *et al.* 2011; Mittal, *et al.* 2014):

(1) Eliminierung. Während der Eliminationsphase werden Tumorzellen durch die beschriebenen Mechanismen der Immunüberwachung – ein Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr – erkannt und vernichtet.

(2) Äquilibrium. In der Gleichgewichtsphase wird das Tumorstadium weiterhin durch das Immunsystem kontrolliert. Allerdings entgehen einige nicht eliminierte Tumorzellen durch Mutationen dem Angriff durch das Immunsystem. Diese Zellen haben Strategien entwickelt, in einem immunkompetenten Organismus zu überleben, und werden seligiert. Ein bekannter Immunevasionsmechanismus ist beispielsweise der Verlust von MHC-Molekülen. Dieser führt dazu, dass Tumor-assoziierte Antigene (TAA) nicht präsentiert werden können. Infolgedessen werden maligne Zellen nicht erkannt und die T-Zell-Aktivierung bleibt aus. Andere Tumorzellen sind in der Lage, regulatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , auszuschütten sowie Treg zu rekrutieren.

Es entsteht ein immunsuppressives Tumormilieu, das die Funktion verschiedener Immuneffektorzellen unterdrückt.

(3) Evasion. In der letzten Phase geht die Immunkontrolle über den Tumor verloren. Schwach immunogene oder immunresistente Tumorzellen werden durch das Immunsystem nicht mehr erkannt und expandieren. Die Tumorerkrankung wird klinisch manifest.

Unser heutiges Verständnis von den komplexen Zusammenhängen zwischen Tumor und Immunsystem ermöglicht ein gezieltes therapeutisches Eingreifen und schafft damit die Grundlage für eine erfolgreiche Tumorimmuntherapie.

1.2.2 Tumorimmuntherapie

Neben den klassischen Therapieverfahren, bestehend aus Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie, hat sich in den letzten Jahren die Immuntherapie als eine weitere Säule der Tumortherapie etabliert. Ziel der Tumorimmuntherapie ist es, das Immunsystem zu aktivieren, um maligne Zellen gezielt zu zerstören. Dazu werden verschiedene Strategien verfolgt (Sharma, *et al.* 2011; Vollmar, *et al.* 2012):

- (1) Zell-basierte Therapieformen wie Vakzinierung mit DZ oder adoptiver T-Zelltransfer
- (2) Einsatz von Zytokinen wie IL-2 oder IFN- α
- (3) Zielgerichtete Antikörpertherapien

In dem Bestreben, eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren bzw. zu verstärken, versucht man, durch diese Art von therapeutischen Interventionen Effektorzellen zu stimulieren oder aber auch immunsuppressive Mechanismen zu überwinden (Sharma, *et al.* 2011). Zahlreiche Immuntherapien befinden sich derzeit in der klinischen Prüfphase oder wurden bereits zugelassen. Im Dezember 2013 kürte *Science* die Erfolge auf dem Gebiet der Tumorimmuntherapie daher als

wissenschaftlichen Durchbruch des Jahres (Couzin-Frankel 2013) – nicht zuletzt aufgrund der bahnbrechenden Ergebnisse im Bereich der Antikörpertherapie.

1.2.3 Antikörpertherapie

Die Antikörpertherapie hat sich in den letzten 30 Jahren – seit Verleihung des Nobelpreises für die Entwicklung des Hybridom-Verfahrens zur Produktion monoklonaler Antikörper – zu einem sehr vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Tumorerkrankungen entwickelt (Köhler und Milstein 1975; Scott, *et al.* 2012). Zahlreiche therapeutische Antikörper haben seither die klinische Reife erlangt und werden heute routinemäßig eingesetzt. Sehr häufig sind sie gegen überexprimierte Antigene auf Tumorzellen gerichtet (Scott, *et al.* 2012); prominente Vertreter sind beispielsweise der Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Mc Laughlin, *et al.* 1998) oder der gegen HER2/neu gerichtete Trastuzumab (Cobleigh, *et al.* 1999; Vogel, *et al.* 2002).

1.2.3.1 Kontrollpunkt-Inhibitoren

Eine zunehmende Bedeutung in der Tumorthherapie gewinnen aber auch monoklonale Antikörper, die Schlüsselinhibitoren des Immunsystems blockieren – wie beispielsweise der 2011 zur Behandlung des Melanoms zugelassene CTLA-4-blockierende Antikörper Ipilimumab (Hodi, *et al.* 2010) oder der 2014 folgende PD-1-blockierende Antikörper Nivolumab (Topalian, *et al.* 2014). Durch die Antikörpervermittelte Blockade dieser inhibitorischen Oberflächenmoleküle werden supprimierende Signale aufgehoben; erhöhte T-Zell-Proliferation sowie Zytokinsekretion sind die Folge, so dass die Immunantwort gegen den Tumor wieder verstärkt wird (Weber 2009). Der genaue Wirkmechanismus der Kontrollpunkt-Inhibitoren konnte jedoch noch nicht entschlüsselt werden und wirft trotz intensiver Forschung weiterhin Fragen auf (Blank und Enk 2015). Die klinische Entwicklung wird daher auch zukünftig entschlossen vorangetrieben. Aktuell verspricht man sich

beispielsweise großes Antitumor-Potenzial von der Kombination beider Kontrollpunkt-Inhibitoren; aber auch die Kombination von Kontrollpunkt-Inhibitoren mit anderen Antitumor-Agenzien wird derzeit diskutiert (Maio, *et al.* 2013; Callahan, *et al.* 2014; Blank und Enk 2015).

1.2.3.2 Trifunktionale bispezifische Antikörper

Neben monospezifischen Antikörpern werden auch immer mehr bispezifische Konstrukte für die Tumormimmuntherapie entwickelt. Diese vereinen zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen in einem Molekül (Nisonoff und Rivers 1961; Hämmerling, *et al.* 1968). Aufgrund dieser Struktur sind sie beispielsweise in der Lage, Effektorzellen wie CD3⁺ T-Zellen oder Fcγ-Rezeptor (FcγR) tragende NK-Zellen in unmittelbare Tumornähe zu dirigieren, wo sie ihr zytotoxisches Potenzial entfalten (Karpovsky, *et al.* 1984; Perez, *et al.* 1985; Staerz, *et al.* 1985). Nicht zuletzt haben steigende gentechnische Möglichkeiten dazu geführt, dass es mittlerweile eine Vielzahl erfolgsversprechender bispezifischer Formate gibt, die teilweise bereits Einzug in die Klinik gefunden haben (Heiss, *et al.* 2010; Riethmüller 2012; Topp, *et al.* 2015).

Aussichtsreiche Vertreter dieser Gruppe sind auch die trifunktionalen bispezifischen Antikörper (trAk) (Hess, *et al.* 2012). Diese setzen sich aus zwei Halb-Antikörpern mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften zusammen: einem murinen IgG2a-Halb-Antikörper, der TAA auf Tumorzellen erkennt, und einem Ratten-IgG2b-Halb-Antikörper, der T-Zellen über das CD3-Molekül rekrutiert. TrAk können sehr effizient mit Hilfe der Quadromtechnologie hergestellt werden (Milstein und Cuello 1983). Durch Fusion der beiden parentalen Hybridome entstehen Maus/Ratte-Quadrome, welche das gewünschte bispezifische Antikörperkonstrukt – aufgrund einer vorwiegend Spezies-restringierten Paarung der schweren und leichten Ketten – in hoher Ausbeute produzieren (Lindhofer, *et al.* 1995). Der Kulturüberstand wird anschließend chromatographisch aufgereinigt, wobei trAk mittels einer Protein-A-beladenen Säule und eines pH-Gradienten von ungewollten monospezifischen

Antikörpern abgetrennt werden (Lindhofer, *et al.* 1995). Aufgrund des beschriebenen Herstellungsverfahrens besitzen trAk einen intakten, aus zwei verschiedenen Spezies zusammengesetzten Fc-Teil, der sie zusätzlich befähigt, mit Fc γ R auf APZ in Interaktion zu treten (Zeidler, *et al.* 2000). Dies findet vorzugsweise mit den immunaktivierenden Fc γ RI, IIa und III, nicht jedoch mit dem inhibierenden Fc γ RIIb, statt (Zeidler, *et al.* 2000; Lindhofer, *et al.* 2011). Aufgrund dieser besonderen Struktur sind trAk also in der Lage, drei verschiedene Zelltypen gleichzeitig zu binden und einen sogenannten Tri-Zell-Komplex auszubilden (Abbildung 1).

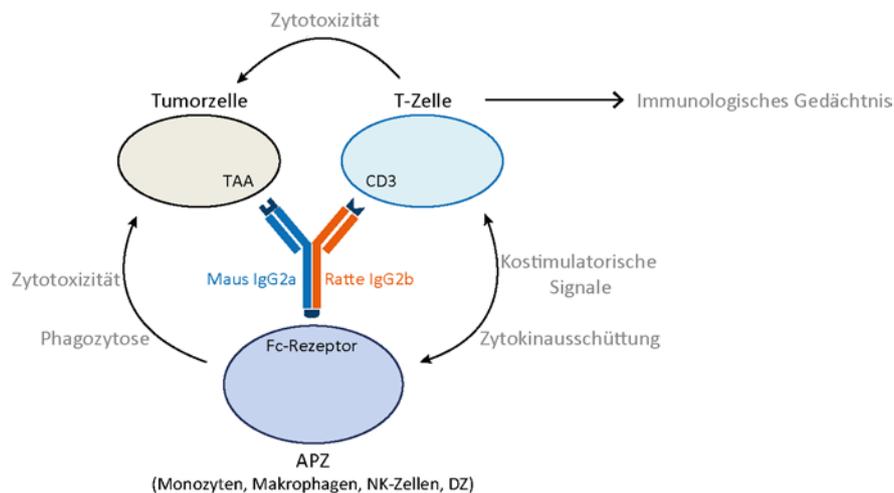


Abbildung 1: Postulierter Wirkmechanismus von trAk. TrAk vermitteln die Ausbildung eines Tri-Zell-Komplexes aus Tumorzellen, T-Zellen und APZ. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Immunzellen, zur Eliminierung der Tumorzellen und zur Induktion eines immunologischen Gedächtnisses (Abbildung adaptiert nach (Ruf und Lindhofer 2001)).

Die Bildung dieses Zellkomplexes gewährleistet eine vollständige T-Zell-Aktivierung. Das Aktivierungssignal 1 wird durch Bindung des CD3-TZR-Komplexes vermittelt. Das Aktivierungssignal 2 wird durch die unmittelbare Nachbarschaft der APZ bereitgestellt, welche kostimulatorische Moleküle hochregulieren und gleichzeitig eine Vielzahl von proinflammatorischen Th1-Zytokinen freisetzen, die die T-Zellantwort unterstützen. Die so ausgelösten zytotoxischen Wirkmechanismen führen letztlich zu einer effizienten Zerstörung der Tumorzelle (Zeidler, *et al.* 1999). Darüber hinaus werden durch die Beteiligung professioneller APZ in unmittelbarer Nähe zum Tumor TAA

phagozytiert, prozessiert und in Form immunogener Peptide präsentiert (Zeidler, *et al.* 1999). Auf diese Weise wird eine zusätzliche T-Zell-vermittelte Immunantwort generiert und ein immunologisches Gedächtnis induziert (Ruf und Lindhofer 2001; Eissler, *et al.* 2012). Für korrespondierende F(ab')₂ Fragmente – also trAk ohne intakten Fc-Teil – konnte dieser Vakzinierungseffekt nicht nachgewiesen werden, was die essenzielle Funktion des Fc-Teils unterstreicht (Eissler, *et al.* 2012). Die Besonderheit von trAk besteht somit darin, dass sie die angeborene sowie die adaptive Immunantwort ansprechen und so die klassische Antikörpertherapie mit einer *In-situ*-Immunisierung verknüpfen.

2009 erhielt Catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) als erster bispezifischer Antikörper weltweit die Zulassung für die klinische Anwendung. Er wird eingesetzt zur Behandlung des malignen Aszites, welcher durch EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) -exprimierende Tumoren (wie beispielsweise das Ovarialkarzinom) verursacht wird (Ströhlein, *et al.* 2009; Heiss, *et al.* 2010). Daneben befinden sich weitere trAk mit unterschiedlichen Zielstrukturen in der klinischen Entwicklung und konnten in ersten Studien bereits ihr therapeutisches Potenzial unter Beweis stellen (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009). Ein erfolgsversprechender Kandidat ist beispielsweise auch der gegen das Gangliosid GD2 gerichtete trAk Ektomab (Ruf, *et al.* 2004). Diese Zielstruktur wurde in humanen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, wie dem Neuroblastom, Gliom, Melanom sowie dem kleinzelligen Lungenkarzinom, nachgewiesen und ist daher von hoher klinischer Relevanz (Ragupathi, *et al.* 2003; Navid, *et al.* 2010).

Die Therapie mit immunaktivierenden, bispezifischen Antikörperformaten wird häufig begleitet vom sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndrom (Maher und Adami 2013; Teachey, *et al.* 2013). Dieses äußert sich in einer grippeähnlichen Symptomatik und geht einher mit heftigem Schüttelfrost sowie Fieber. Um diese behandlungsbezogenen Nebenwirkungen zu mindern, werden trAk in Form einer dosiseskalierenden Therapie verabreicht (Hess, *et al.* 2012; Maher und Adami 2013). Außerdem werden die Patienten intensiv überwacht, so dass bei einer überschießenden Immunreaktion

therapeutisch interveniert werden kann. In der Regel sind die auftretenden Nebenwirkungen durch den Einsatz von Standardmedikationen kontrollierbar und werden als mild und reversibel eingestuft (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009; Heiss, *et al.* 2010).

1.3 Aufgabenstellung

Wie oben erwähnt, werden trAk bereits erfolgreich in der Klinik eingesetzt (Hess, *et al.* 2012). Nichtsdestoweniger besteht für die therapeutische Anwendung weiterhin Verbesserungspotenzial im Hinblick auf Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag daher auf der Entwicklung von Strategien zur Optimierung der Therapie mit trAk. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze in Betracht gezogen und in einem präklinischen Mausmodell untersucht.

In diesem Mausmodell wurde exemplarisch der Surrogat-trAk Surek verwendet (Ruf, *et al.* 2012). Dieser bindet an CD3 auf murinen T-Zellen sowie an das Gangliosid GD2 auf Tumorzellen. Als transplantierbarer Modelltumor diente die murine Tumorzelllinie B78-D14. Dabei handelt es sich um eine Variante des murinen Melanoms B16 mit C57BL/6-Hintergrund, welche das TAA GD2 konstitutiv exprimiert (Haraguchi, *et al.* 1994). Die Wirksamkeit von Surek in diesem Tumormodell, genauer eine spezifische Eliminierung der B78-D14-Zellen, konnte bereits in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden (Eissler, *et al.* 2012; Ruf, *et al.* 2012; Eissler, *et al.* 2013).

(1) Therapieoptimierung durch Modifikation der Applikationsroute

TrAk wurden bereits in verschiedenen klinischen Studien sowohl intraperitoneal (i.p.) (Sebastian, *et al.* 2009; Ströhlein, *et al.* 2009; Heiss, *et al.* 2010; Ströhlein, *et al.* 2011) als auch i.v. appliziert (Kiewe, *et al.* 2006; Sebastian, *et al.* 2007; Buhmann, *et al.* 2009). Für eine breitere klinische Anwendung könnte jedoch auch die s.c. Gabe von trAk eine interessante Option darstellen. Verschiedene monoklonale therapeutische Antikörper, wie beispielsweise Rituximab (Davies, *et al.* 2014) oder Trastuzumab (Hamizi, *et al.* 2013), werden bereits erfolgreich s.c. appliziert. Auch für den klinischen Einsatz von trAk würde diese alternative Applikationsform mit verschiedenen Vorteilen verbunden sein; verglichen mit den herkömmlichen Applikationsformen verspricht man sich unter anderem eine verkürzte Infusionsdauer sowie ein verbessertes Nebenwirkungsprofil.

Die s.c. Applikation von trAk könnte somit die zukünftige Therapie erheblich vereinfachen.

Für die präklinische Evaluierung dieses Vorhabens wurden die i.v. und die s.c. Applikation des trAk Surek in Bezug auf Wirksamkeit und Verträglichkeit im beschriebenen Mausmodell direkt miteinander verglichen. Um das Auftreten von Nebenwirkungen einzuschätzen, wurden pharmakokinetische Unterschiede analysiert sowie die Zytokinfreisetzung in Abhängigkeit von der Applikationsroute untersucht.

(2) Therapieoptimierung durch Kombination von trAk mit Kontrollpunkt-Inhibitoren

Eine weitere Strategie, die verfolgt wurde, um die Effizienz der trAk-Therapie zu optimieren, war der kombinierte Einsatz von Kontrollpunkt-Inhibitoren, welche kürzlich für den klinischen Einsatz zugelassen wurden (siehe Abschnitt 1.2.3.1).

Die präklinische Evaluierung des Kombinationsansatzes wurde wiederum im oben beschriebenen B78-D14-Modell durchgeführt. Zusätzlich wurde der monoklonale Anti-CTLA-4-Antikörper HB304 verwendet, welcher inhibierende T-Zell-Signale blockiert und auf diese Weise die Surek-induzierte Immunantwort aufrechterhalten bzw. verstärken könnte. Dieser potenzielle Synergismus der Kombination aus trAk und CTLA-4-blockierendem Antikörper wurde in Bezug auf die therapeutische Wirksamkeit sowie die Induktion einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort untersucht. Nachdem eine genaue Charakterisierung der zellulären Immunantwort im B78-D14-Modell stattgefunden hatte, wurde im letzten Schritt die Generalisierbarkeit der Befunde überprüft und die Untersuchungen auf ein weiteres präklinisches Mausmodell ausgedehnt. Hierbei kamen der Surrogat-trAk BiLu – gerichtet gegen CD3 auf murinen T-Zellen und das TAA EpCAM auf Tumorzellen – und die EpCAM-exprimierende murine Tumorzelllinie B16-EpCAM zur Anwendung (Ruf und Lindhofer 2001). Analog zu den Untersuchungen im B78-D14-Modell wurde der Einfluss des CTLA-4-blockierenden Antikörpers HB304 auf Therapie und Vakzinierung analysiert.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bestrahlungsanlage HWM-D-200 (Strahlungsquelle: ¹³⁷ Caesium)	GammaCell40, Ottawa (Kanada)
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten 5/10/25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalzählkammer C-Chip	Peqlab, Erlangen
ELISA-Lesegerät Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen, klein	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Laborwaage Quintix® 5101-1S	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg
LumaPlate™-96	Perkin Elmer, Rodgau
Luminex Bio-Plex™ Systems	Bio-Rad, München
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Pipetten Eppendorf/Gilson	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
Plattenzentrifuge Labofug 400	Heraeus Instruments, Hanau

Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Air liquid, Düsseldorf
Szintillationsmessgerät TOPCount	Canberra Packard, Dreireich
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellsiebe	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafug 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid	Roche Diagnostics, Mannheim
Chrom-51 (185 mBq)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Diphtherietoxin (DT) (unnicked, <i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	EMD Chemicals, San Diego (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Frankfurt
Formaldehydlösung 4 %, gepuffert (pH 6,9)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Foxp3 Staining Buffer Set</i>	eBioscience, Frankfurt
Geneticin [®] Selective Antibiotic (G418 Sulfate)	Life Technologies, Frankfurt

Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm®	Krankenhausapotheke, Klinikum Großhadern, München
Hygromycin B	Life Technologies, Frankfurt
Ionomycin, Calcium-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>IC Fixation Buffer</i>	eBioscience, Frankfurt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
LPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Live/Dead® Fixable Blue-Lösung</i>	Life Technologies, Frankfurt
<i>MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)</i>	Life Technologies, Frankfurt
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Frankfurt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Life Technologies, Frankfurt
<i>OneComp eBeads</i>	eBioscience, Frankfurt
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Frankfurt
<i>10x Permeabilization Buffer</i>	eBioscience, Frankfurt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proleukin® S (IL-2, human)	Novartis, Nürnberg
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Life Technologies, Frankfurt
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i> (RPMI 1640) ohne L-Glutamin	Life Technologies, Frankfurt
Salzsäure, 1 M	Merck, Darmstadt
Streptavidin-β-Galactosidase (500 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Tissue Tek® O.C.T.™ Compound</i>	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Trypanblau	Life Technologies, Frankfurt
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Frankfurt
Tween 20	ICN, Eschwege

2.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 3: Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 % FKS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x) 50 µM 2-Mercaptoethanol
Selektionsmedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 8 % FKS (hitzeinaktiviert) 0,4 mg/ml Geneticin 0,5 mg/ml Hygromycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x)
T-Zell-Medium	Basismedium mit 10 % FKS (hitzeinaktiviert)
DZ-Medium	Basismedium mit 20 % FKS (hitzeinaktiviert)
Einfriermedium	90 % FKS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
Carbonatpuffer (pH 9,5)	0,1 M Natriumcarbonat in Millipore-Wasser
Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,4)	8,25 g Ammoniumchlorid 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat 37 mg Natrium-EDTA ad 100 ml Millipore-Wasser

FACS-Puffer	PBS
	2 % FKS (hitzeinaktiviert)
	2 mM EDTA
	1 % Natriumazid

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay	Bio-Rad, München
Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th17 Panel A 6-Plex Group I	Bio-Rad, München
Mouse IFN- γ ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt

2.1.5 Mäuse

Für *In-vivo*-Untersuchungen wurden C57BL/6-Mäuse von Taconic (Ry, Dänemark) bezogen. Außerdem wurden DEREK-Mäuse (*Depletion of Regulatory T Cells*) bei Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) erworben. Diese basieren auf C57BL/6-Hintergrund und exprimieren ein Fusionsprotein, welches sich aus dem DT-Rezeptor und dem grün-fluoreszierenden Protein zusammensetzt. Dieses Fusionsprotein steht unter Kontrolle des Foxp3-Locus (Lahl und Sparwasser 2011). Auf diese Weise können Foxp3-exprimierende Treg durch die Applikation von DT spezifisch depletiert und zusätzlich über das grün-fluoreszierende Protein direkt detektiert werden.

Alle Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen in der Tierhaltung des Hämatologikums, Großhadern, gehalten.

2.1.6 Antikörper und Multimere

Tabelle 5: Therapeutische Antikörper für *In-vivo*-Versuche

Bezeichnung	Klon	Spezifität	Isotyp
BiLu	BiLu 18.1.1.5-13	anti-human EpCAM x anti-Maus CD3	Ratte IgG2b x Maus IgG2a
Surek	TRBs05W19-1-1	anti-human GD2/GD3 x anti-Maus CD3	Ratte IgG2b x Maus IgG2a
HB304	UC10-4F10-11	anti-Maus CTLA-4	Hamster IgG1 kappa
HB304 Isotyp	HTK888		Arm. Hamster IgG

Therapeutische Antikörper wurden von Trion Research, Martinsried, zur Verfügung gestellt. Die für HB304 verwendete Isotypkontrolle wurde von BioLegend, Fell, bezogen.

Tabelle 6: Depletionsantikörper für *In-vivo*-Versuche

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	Literatur
RmCD8	anti-Maus CD8	Ratte IgG2b	(Reinecke, <i>et al.</i> 1994)

RmCD8 zur Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde freundlicherweise von Elisabeth Kremmer, München, bereitgestellt.

Tabelle 7: Antikörper für ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Bezeichnung/Klon	Spezifität	Isotyp	Hersteller
Fängerantikörper RG7/11.1	anti-Ratte IgG2b	Maus IgG1	BD Biosciences; Heidelberg
Detektionsantikörper R19-15 (biotinyliert)	anti-Maus IgG2a	Ratte IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
Fängerantikörper 17A2	anti-Maus CD3	Ratte IgG2b	Trion Research, Martinsried
Fängerantikörper Me361	anti-human GD2	Maus IgG2a	Trion Research, Martinsried
Detektionsantikörper (biotinyliert)	anti-Maus IgG (H+L)	Ziege	SouthernBiotech; Birmingham (USA)
Detektionsantikörper (biotinyliert)	anti-Maus IgG1	Ziege	SouthernBiotech, Birmingham (USA)

Tabelle 8: Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	SP7	Kaninchen IgG	DCS, Hamburg
Mac3	M3/84	Ratte IgG1, κ	BD Biosciences, Heidelberg
B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences, Heidelberg
MHC-II	MRC OX-6	Maus IgG1	Abcam plc, Cambridge (UK)
Ratte IgG (H+L) (Cy3-konjugiert)		Ziege	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)

Tabelle 9: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	17A2	Ratte IgG2b	eBioscience, Frankfurt
CD4	RM4-5	Ratte IgG2a, κ	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	KT15	Ratte IgG2a	AbD Serotec, Puchheim
CD8	53-6.7	Ratte IgG2a	eBioscience, Frankfurt
CD19	1D3	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg
CD69	H1.2F3	Armenischer Hamster IgG1, λ 3	BD Biosciences, Heidelberg
CD62L	MEL-14	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt
CD44	IM7	Ratte IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
IFN- γ	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	BioLegend, Fell
IL-10	JES5-16E3	Ratte IgG2b	eBioscience, Frankfurt
Ki-67	SolA15	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt
CTLA-4	UC-10-4B9	Arm. Hamster IgG	BioLegend, Fell
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	eBioscience, Frankfurt
CD137	17B5	Gold. Syr. Hamster IgG	eBioscience, Frankfurt

Tabelle 10: Multimere für die durchflusszytometrische Bestimmung Antigen-spezifischer T-Zellen

Bezeichnung	Fluorochrom	Hersteller
Trp-2-spezifisches Pro5 [®] MHC-I- Pentamer	Phycoerythrin	Proimmune, Oxford (UK)

2.1.7 Peptide

Mit folgenden Melanom-assoziierte Antigene wurde gearbeitet:

Tabelle 11: Peptidsequenzen Melanom-assoziiierter Tumorantigene

Antigen	Peptidsequenz	Literatur	Hersteller
gp100 ₂₅₋₃₃	EGSRNQDWL	(Overwijk, <i>et al.</i> 1998)	PSL, Heidelberg
MAGE-A5 ₅₋₁₂	HNTQYCNL	(Eggert, <i>et al.</i> 2004)	PSL, Heidelberg
Trp-2 ₁₈₀₋₁₈₈	SVYDFVWL	(Mansour, <i>et al.</i> 2007)	PSL, Heidelberg

2.1.8 Software

Tabelle 12: Software

Methode	Software	Hersteller
Bio-Plex	Bio-Plex Manager™ 4.1	Bio-Rad, München
Durchflusszytometrie	BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
	FlowJo 8.8.6	Treestar Inc., Ashland (USA)
ELISA	Magellan™ 7.2	Tecan, Crailsheim
Auswertung und Statistik	GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla (USA)
Grafik und Text	Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems, San José (USA)
	MS Office 2010	Microsoft, Redmond (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden nach dem Auftauen in den entsprechenden Medien (siehe auch Tabelle 3) bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Die folgenden Zelllinien auf C57BL/6-Hintergrund wurden verwendet:

Die Melanom-Zelllinie B16F0 (Fidler 1975; Nicolson, *et al.* 1978) wurde von der LGC Standards GmbH, Wesel, bezogen und in Basismedium kultiviert.

Die Zelllinie B78-D14 wurde von B16F0 abgeleitet (Haraguchi, *et al.* 1994; Schrama, *et al.* 2004). Sie entstand durch Transfektion mit Genen, welche für die β -1, 4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und die α -Sialyltransferase kodieren und die Expression der Disialoganglioside GD2 und GD3 induzieren. B78-D14 wurde von Trion Research, Martinsried, zur Verfügung gestellt und in Selektionsmedium kultiviert.

Die Zelllinie B16-EpCAM wurde generiert durch die Transfektion von B16F0 mit humanem EpCAM (Dohlsten, *et al.* 1995). B16-EpCAM-Zellen wurden in Basismedium kultiviert und ebenfalls von Trion Research, Martinsried, bereitgestellt.

Alle Zellen wurden nach dem Auftauen bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den oben beschriebenen Medien in Kultur gehalten. Alle 2 Tage wurden die adhären wachsenden Zelllinien nach Trypsinierung im Verhältnis 1:10 geteilt und mit frischem Medium kultiviert. Für die Trypsinierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert und anschließend mit frischem Medium vom Flaschenboden gelöst.

2.2.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milzen

Mäuse wurden mittels CO₂ euthanasiert. Anschließend wurden die Milzen entnommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden diese durch ein Zellsieb in PBS gedrückt. Nach Erythrozytenlyse wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und die Zellzahl mit Hilfe von Einmalzählkammern bestimmt.

2.2.3 Generierung von dendritischen Zellen

DZ wurden entsprechend dem Protokoll unserer Arbeitsgruppe generiert (Strehl, *et al.* 1999). Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen Femora und Tibiae unbehauelter Mäuse freigelegt, die Epiphysen entfernt und das Knochenmark unter Zuhilfenahme einer Kanüle sowie PBS aus den Diaphysen gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde nach Erythrozytenlyse und zwei Waschvorgängen in DZ-Medium aufgenommen und auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Unter Zugabe von 100 ng/ml GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in 6-Well-Platten ausplattiert und im Brutschrank kultiviert. Zur Reifung der DZ wurde an Tag 7 für 16 h 1 µg/ml LPS zugesetzt.

Für ihren Einsatz als Zielzellen im Chrom[51]-Freisetzungstest (siehe Abschnitt 2.2.11) wurden die reifen DZ mit Peptid beladen. Hierzu wurden $2,4 \times 10^6$ DZ/ml T-Zell-Medium mit 10 µl Trp-2 Peptid ($c=1$ µg/ml) für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die so generierten Zielzellen in FKS aufgenommen und im Folgenden mit ⁵¹Cr markiert.

2.2.4 *In-vivo*-Versuche

Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und im Einklang mit den gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt.

2.2.4.1 Analyse von T-Zellen

Für die Untersuchung von T-Zellen *in vivo* wurden Mäuse mit 10^5 bestrahlten B78-D14-Zellen (100 Gy) und 10 µg Surek i.p. bzw. 50 µg Surek s.c. oder i.v. inokuliert. Kontrolltiere erhielten bestrahlte B78-D14-Zellen allein oder blieben unbehandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation (48 h, 72 h, 96 h oder 7 d) wurden Milzen für FACS-Analysen (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) entnommen.

2.2.4.2 Pharmakokinetik und Anti-Antikörper

Für die pharmakokinetische Untersuchung von Surek wurden einmalig 50 µg des Antikörpers i.v. bzw. s.c. injiziert. Zu definierten Zeitpunkten nach Injektion wurden 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen, mit dem Antikoagulans Heparin-Natrium versetzt und abzentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bei - 20 °C gelagert. Später wurden die Plasmaproben mittels ELISA quantifiziert (siehe Abschnitt 2.2.6).

Um den Verlauf des Plasmaspiegels in einer Therapiesituation zu simulieren, wurden 20 µg Surek zu den Zeitpunkten 0 d, 2 d, 4 d i.v. bzw. s.c. injiziert. Die Probenentnahme und -aufbereitung erfolgte wie oben beschrieben.

Für den Nachweis von Anti-Antikörpern im Serum wurde wiederum eine Einmaldosis von 50 µg Surek i.v. bzw. s.c. appliziert. 15, 30 und 45 Tage nach Injektion wurden Blutproben entnommen und entsprechend aufgearbeitet. Anti-Antikörper Titer wurden mittels ELISA ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.7).

2.2.4.3 Therapieversuche

Um den therapeutischen Erfolg der s.c. Surek-Gabe mit der i.v. Injektion des trAk zu vergleichen, erfolgte nach Injektion von 10^5 B78-D14 Zellen i.p. an Tag 0, die Therapie mit 50 μ g Surek s.c. bzw. i.v. an den Tagen 2 und 7 sowie in einem erweiterten Therapieschema an den Tagen 2, 7 und 11 nach Tumorinokulation. Die Tumorkontrollgruppe erhielt keine Therapie. Anschließend wurde das Anwachsen des Tumors beobachtet. Sobald eine Abdomenschwellung erkennbar war, wurden die Tiere den Tierschutzrichtlinien entsprechend abgetötet.

Um den Allgemeinzustand der Versuchstiere zu beurteilen, wurde das Körpergewicht nach Therapie überwacht. Hierzu wurden die behandelten Mäuse täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen nach Antikörpergabe mit der Laborwaage Quintix® 5101-1S (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gewogen.

Um den Einfluss von Treg auf das Wachstum von B78-D14 zu überprüfen, wurden diese in DERE^G-Mäusen durch Applikation von DT spezifisch depletiert. Nach Tumorinokulation mit 10^5 B78-D14 i.p. an Tag 0 erhielten die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (d=9 und d=10) je 500 ng DT in 100 μ l PBS i.p.. Nach zwei Wochen wurde dieser Vorgang wiederholt (d=22 und d=23). Als Kontrolle wurden auch DERE^G Mäuse mit DT behandelt bzw. das Tumorstadium in DERE^G Tieren ohne DT-Gabe beobachtet.

Für die kombinierte Therapie mit Surek und HB304 (bzw. BiLu und HB304) wurden die Mäuse entsprechend dem abgebildeten Therapieschema behandelt (Abbildung 2A). Kontrollgruppen erhielten die jeweiligen Monotherapien oder keine Therapie.

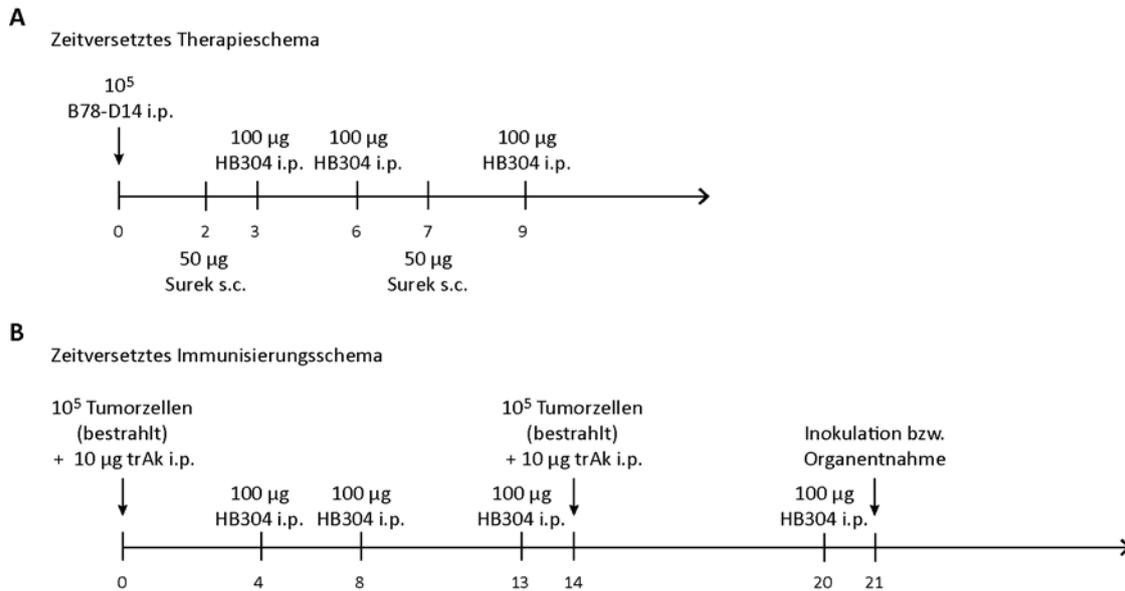


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Therapie (A) und der Vakzinierung (B) mit trAk Surek bzw. BiLu und dem CTLA-4 blockierenden Antikörper HB304.

2.2.4.4 Immunisierungen und Protektionsversuche

Immunisierungen wurden entsprechend dem abgebildeten Schema durchgeführt (Abbildung 2B). Vor Applikation wurden B78-D14 bzw. B16-EpCAM mit 100 Gy bestrahlt. An Tag 21 wurden Milzen entnommen und *in vitro* restimuliert (siehe Abschnitt 2.2.8). Zusätzlich wurde das Blut immunisierter Mäuse aufgearbeitet. Die Seren wurden bis zur Zytokinbestimmung bei - 20 °C aufbewahrt (siehe Abschnitt 2.2.9). Alternativ wurde die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses nach Immunisierung überprüft, indem die Mäuse an Tag 21 mit 3000 vitalen B16F0-Zellen inokuliert wurden.

Um den Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Tumorprotektion nach Immunisierung zu ermitteln, wurden diese an Tag 17 mit 0,5 mg des Depletionsantikörpers RmCD8 und darauffolgend an den Tagen 22, 31 und 35 mit je 0,1-0,2 mg RmCD8 depletiert. Jeweils einen Tag später wurde der Depletionserfolg durchflusszytometrisch im Blut (entnommen aus der Schwanzvene) kontrolliert. Nach Inokulation mit 3000 vitalen B16F0-Zellen i.p. an Tag 21 wurde dann das Überleben der Tiere beobachtet.

2.2.5 Histologische Methoden

Für die makroskopische Beurteilung der Haut nach Gabe von 50 µg Surek s.c. wurden die Flanken der Mäuse rasiert und die Hautreaktion um die Injektionsstelle herum beobachtet und photographisch festgehalten.

Zur histologischen Analyse wurden 2 und 7 Tage nach s.c. Injektion Hautproben entnommen und an das Institut für Pathologie am Helmholtz-Zentrum München übergeben. Histopathologische Untersuchungen, immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. F. Neff und Dr. M. Aichler nach Standardprotokollen durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt.

2.2.6 Quantifizierung von Surek in Plasmaproben

Die Plasmakonzentration von Surek wurde mittels ELISA quantifiziert. Etablierung und Durchführung wurden freundlich unterstützt von Trion Research, Martinsried.

Als Fängerantikörper diente ein Anti-Ratte-IgG2b-Antikörper, so dass Surek mit seinem Ratte-IgG2b-Anteil an die beschichtete Plattenoberfläche gebunden wurde. Der freie Maus-IgG2a-Anteil von Surek wurde mit einem biotinylierten Anti-Maus-IgG2a-Antikörper detektiert. Anschließend wurden Streptavidin-β-Galactosidase und das Substrat Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid zugegeben und die kolorimetrische Reaktion bei 570 nm gemessen. Die Plasmakonzentration von Surek wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.

2.2.7 Bestimmung der Anti-Antikörper-Titer

Anti-Antikörper im Serum wurden mittels ELISA ermittelt. Das Protokoll wurde freundlicherweise von Trion Research, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Als Fängerantikörper dienten die parentalen Antikörper 17A2 (Miescher, *et al.* 1989) für Maus-Anti-Ratten-Antikörper (MARA) und Me361 (Thurin, *et al.* 1986) für Maus-Anti-Maus-Antikörper (MAMA). Gebundene Anti-Antikörper wurden mittels biotinylierter Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)-Antikörper (für MARA) bzw. biotinylierter Ziege-anti-Maus-IgG1-Antikörper (für MAMA) detektiert. Anschließend wurden Streptavidin- β -Galactosidase und das Substrat Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid hinzugegeben und die optische Dichte bei 570 nm vermessen.

Zur Titerbestimmung wurden die Plasmaproben in einer log 2-Verdünnungsreihe titriert und als Kontrolle das Plasma aus unbehandelten Mäusen verwendet. Als Titer wurde der reziproke Wert derjenigen Verdünnung angegeben, welche als letzte ein positives Signal lieferte. Als Grenzwert war hierfür die mittlere Absorption des zur Verdünnung verwendeten Puffers plus die dreifache Standardabweichung festgelegt worden.

2.2.8 T-Zell-Stimulationen

In-vitro-Restimulationen von T-Zellen erfolgten durch Kokultur von 5×10^6 Splenozyten immunisierter Mäuse und 5×10^5 bestrahlten B78-D14 Zellen (100 Gy) in 24-Well-Platten in einem Intervall von 7 Tagen. Zusätzlich wurden 48 h nach Stimulation 30 U/ml IL-2 zugegeben. Für die wöchentliche Restimulation wurden alle Zellen geerntet, teilweise im FACS analysiert und Überstände zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration gesammelt (siehe Abschnitte 2.2.9 und 2.2.10). Anschließend wurden jeweils 10^6 der verbleibenden T-Zellen mit 10^6 bestrahlten syngen Milzzellen (30 Gy)

als APZ und $0,5 \times 10^6$ bestrahlten B78-D14 weiterstimuliert. Weiterhin erfolgte jeweils 48 h nach erneuter Stimulation die Zugabe von IL-2.

Alternativ wurden die Milzzellen immunisierter Mäuse mit 5×10^6 Peptid-beladenen Splenozyten naiver Mäuse kokultiviert. Peptid-beladene Splenozyten wurden generiert durch Inkubation von $2,4 \times 10^6$ naiven Milzzellen/ml T-Zell-Medium mit jeweils $10 \mu\text{l}$ der Peptide Trp-2, MAGE-A5 und gp100 (jeweils $c=1 \mu\text{g/ml}$). Nach 2 h wurden die Zellen abzentrifugiert, in T-Zell-Medium aufgenommen und mit 30 Gy bestrahlt. Es wurde in Intervallen von 7 Tagen restimuliert. Nach jeweils 48 h wurde IL-2 zugegeben.

Eine Ausnahme stellte die Verwendung der stimulierten T-Zellen als Effektoren im Chrom[51]-Freisetzungstest dar (siehe Abschnitt 2.2.11); in diesem Fall wurden die Splenozyten immunisierter Mäuse mit Peptid-beladenen Splenozyten naiver Mäuse für 6 Tage ohne Zugabe von IL-2 restimuliert.

Überstände zur Bestimmung der IFN- γ -Konzentration wurden nicht nur nach Ende jeder Restimulationsrunde gesammelt, sondern auch 24 h sowie 48 h nach Organentnahme bzw. erneuter Stimulation. Hierzu wurden 5×10^5 der isolierten Splenozyten mit 5×10^5 Peptid-beladenen Milzzellen aus unbehandelten Spendertieren für 24 h bzw. 48 h in 96-Well-Rundbodenplatten kokultiviert und die Überstände zur anschließenden Zytokinbestimmung (siehe Abschnitt 2.2.9) aufbewahrt.

2.2.9 Quantifizierung von Zytokinen

Die IFN- γ -Konzentration in Kulturüberständen wurde mittels ELISA-Kit nach Anweisung des Herstellers analysiert (siehe auch Tabelle 4). Zur simultanen Bestimmung mehrerer Zytokine in Kulturüberständen oder in Mausseren wurde das Bio-Plex® Multiplex-System verwendet.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Um Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie zu detektieren, wurden die zu analysierenden Zellen mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern (siehe Tabelle 9) in 50 µl FACS-Puffer gefärbt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Das beschriebene Färbeprotokoll wurde ergänzt durch die Verwendung der *Live/Dead®-Fixable-Blue*-Lösung, um eine zuverlässige Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zu gewährleisten.

Für intrazelluläre Zytokinfärbungen (IFN- γ und IL-10) war es notwendig, die zu untersuchenden Zellen mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (jeweils 1:1000 verdünnt) in T-Zell-Medium für 4 h im Brutschrank zu stimulieren. Alternativ wurde eine spezifische Stimulation mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern über 5 h unter Zugabe von Brefeldin A durchgeführt. Anschließend wurde die Zelloberfläche gefärbt und fixiert (*IC Fixation Buffer*; 20 min, RT). Im Folgenden wurden die Zellmembranen permeabilisiert (1x *Permeabilization Buffer*) und intrazelluläre Zytokine mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern in 100 µl 1x Permeabilisierungspuffer (20 min, RT) angefärbt. Um das nukleäre Antigen Ki-67, den Transkriptionsfaktor Foxp3 und das inhibitorische Molekül CTLA-4 intrazellulär zu detektieren, wurden die Zellen ohne vorherige Stimulation gefärbt. Im Anschluss an die Oberflächenfärbung, wurden sie mit dem *Foxp3 Staining Buffer Set* fixiert (40 min, RT oder 24h, 4 °C), permeabilisiert und für die intrazelluläre Färbung mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am *BD LSR II Flow Cytometer* durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der FlowJo-Software.

2.2.11 Zytotoxizität

Die Funktionalität von T-Zellen aus *In-vitro*-Restimulationen mit Peptid-beladenen DZ wurde mittels Chrom[51]-Freisetzungstest überprüft. Zielzellen wurden hierzu mit radioaktivem ^{51}Cr markiert und anschließend für 4 h mit den T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen (200:1 bis 25:1) koinkubiert. Durch spezifische Lyse wird ^{51}Cr in den Überstand freigesetzt. Um die Menge an freigesetztem ^{51}Cr zu bestimmen, wurden die Überstände auf LUMA-Platten überführt, getrocknet und in einem γ -Szintillationszähler vermessen. Als Zielzellen dienten in diesem Ansatz Trp-2-beladene DZ aus dem Knochenmark syngener Mäuse (siehe Abschnitt 2.2.3).

2.2.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm GraphPad Prism 5 zur Hilfe genommen. Die berechneten Signifikanzwerte wurden graphisch durch ein ($p < 0,05$), zwei ($p < 0,01$) bzw. drei ($p < 0,001$) Sternchen dargestellt. Nicht signifikante (ns) Unterschiede wurden entweder als „ns“ gekennzeichnet oder nicht gesondert markiert.

Zur Identifizierung statistischer Ausreißer innerhalb einer Stichprobe diente der Ausreißertest nach Grubbs. Um zwei unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde der ungepaarte Student's t-Test angewendet. Voraussetzung hierfür war, dass beide zu vergleichenden Gruppen die gleiche Varianz hatten (F-Test). Unterschieden sich die Varianzen signifikant, wurde dies durch die Welch-Korrektur ausgeglichen. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde verwendet, um eine Gruppe mit mehreren anderen Gruppen zu vergleichen. Für die durchgeführten Testverfahren wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen. Für eine statistische Bewertung der *In-vivo*-Versuche wurden Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven mittels Log-Rank-Test berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bedeutung der Applikationsroute für die Wirksamkeit trifunktionaler Antikörper

3.1.1 Therapeutische Wirksamkeit von s.c. verabreichtem Surek

Aus früheren Arbeiten ging hervor, dass die Wirksamkeit von trAk *in vivo* unter anderem mit T-Zell-Aktivierung und Th1-Zytokinfreisetzung korreliert (Eissler, *et al.* 2012). Eine zentrale Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang dem proinflammatorischen Zytokin IFN- γ zu (Dighe, *et al.* 1994; Egeter, *et al.* 2000; Shankaran, *et al.* 2001). Als prädiktives Modell für das therapeutische Potenzial von s.c. verabreichtem Surek wurde daher zunächst das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung und der T-Zell-Proliferation überprüft.

3.1.1.1 Surek s.c. führt zur Aktivierung von T-Zellen

Nach Applikation von Tumorzellen und Surek i.v. bzw. s.c. wurden T-Zellen aus Milzen durchflusszytometrisch analysiert. 48 h nach Surek-Gabe war die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontrollgruppen deutlich erhöht (Abbildung 3A). Außerdem zeigten beide T-Zellpopulationen 72 h nach Behandlung eine signifikante Hochregulation des intrazellulären Proliferationsmarkers Ki-67 (Abbildung 3B). Ferner wiesen CD8⁺ T-Zellen 48 h nach Surek i.v. bzw. s.c. eine vergleichbare Erhöhung des IFN- γ -Gehalts auf (Abbildung 3C). Insgesamt führte also Surek s.c. im Vergleich zu Surek i.v. zu einer ähnlich stark ausgeprägten T-Zell-Aktivierung und Proliferation *in vivo*.

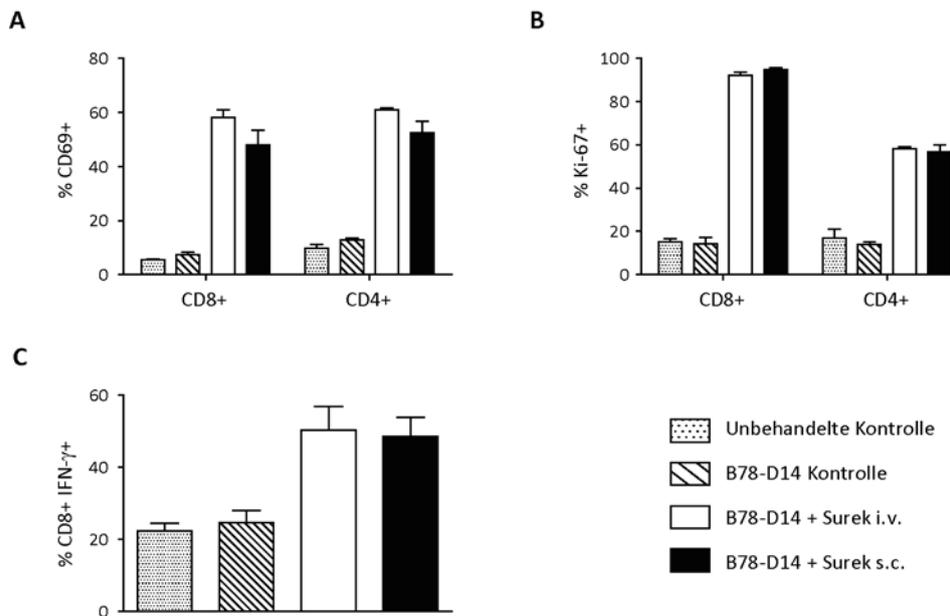


Abbildung 3: Aktivierung und Proliferation der T-Zellen nach Behandlung mit Surek. Mäuse erhielten entweder 10^5 B78-D14 Zellen und $50 \mu\text{g}$ Surek i.v. bzw. s.c. oder Tumorzellen alleine oder blieben unbehandelt. Nach 48 bzw. 72 h wurden T-Zellen aus Milzen durchflusszytometrisch analysiert. (A) Oberflächenfärbung des Aktivierungsmarkers CD69 auf T-Zellen. (B) Proliferation der T-Zellen, gemessen durch intrazelluläre Färbung von Ki-67. (C) Intrazelluläre Färbung von IFN- γ in CD8⁺ T-Zellen 48 h nach Behandlung. Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 4$). Behandelte und unbehandelte Tiere unterscheiden sich statistisch signifikant mit $p < 0,05$ (Student's t-Test). Die Variation der Applikationsroute führt zu keiner signifikanten Veränderung der analysierten Parameter.

3.1.1.2 Surek s.c. zeigt antitumorale Wirkung in vivo

Die Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, ist die Voraussetzung für eine effektive Tumorabstoßung durch trAk (Eissler, *et al.* 2012; Ruf, *et al.* 2012). Daher wurde im Folgenden die Antitumor-Wirkung der s.c. Applikation *in vivo* überprüft. Im Rahmen eines Therapieversuchs wurden alle Tiere mit Tumorzellen i.p. inokuliert. 2 und 7 Tage später wurde mit Surek behandelt und der Therapieerfolg der s.c. Applikation mit der herkömmlichen i.v. Applikation verglichen (Abbildung 4). Während die unbehandelten Kontrolltiere nach etwa 50 Tagen erkrankten und aufgrund erkennbarer Tumoren im Bauchraum abgetötet werden mussten, führte die zweimalige Gabe von Surek i.v. sowie Surek s.c. zu einer Verlängerung des mittleren Überlebens von über 100 Tagen. Um den Therapieerfolg zu verstärken, wurde Surek ein drittes Mal an Tag 11 nach Inokulation appliziert. Während das Überleben der Mäuse nach s.c.-Behandlung dadurch auf 85 % gesteigert werden konnte, mussten die i.v. therapierten Tiere

aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen, vermutlich ausgelöst durch die Aggregation von Surek und Anti-Antikörpern (siehe Abschnitt 3.1.3.3), unmittelbar nach der dritten Surek-Injektion eingeschlafert werden. Diese Beobachtungen belegten die *In-vivo*-Effektivität von s.c. verabreichtem Surek und legte eine verbesserte Verträglichkeit der s.c. Behandlung gegenüber der konventionellen Applikationsroute nahe.

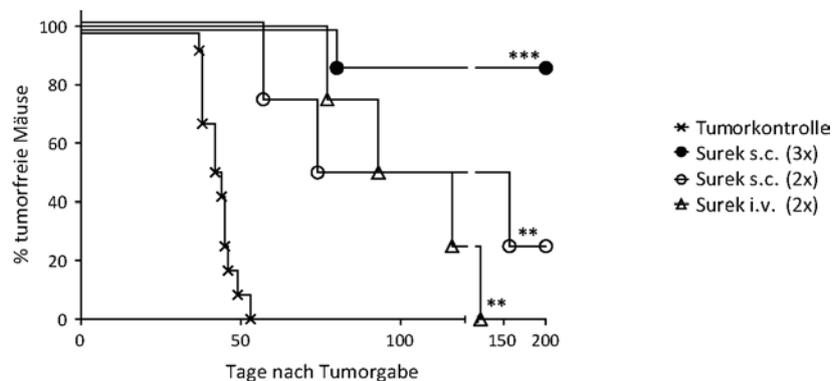


Abbildung 4: Wirksamkeit von Surek *in vivo*. Nach Injektion von 10^5 B78-D14 Zellen i.p. an Tag 0 erhielten die Mäuse entweder 3 (Tag 2, 7 und 11) oder 2 (Tag 2 und 7) Surek-Injektionen (à 50 µg) i.v. oder s.c. oder keine Therapie. Verglichen mit der Tumorkontrolle zeigten behandelte Mäuse ein signifikant verlängertes Überleben ($p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) , Log-Rank-Test). Die Gruppen bestanden aus 5 bis 10 Mäusen. Tiere der Gruppe Surek i.v. (3x) mussten nach der dritten trAk-Injektion eingeschlafert werden.

3.1.2 Lokale und systemische Verträglichkeit der s.c. Applikation von Surek

Für einen erfolgreichen Einsatz in der Klinik muss nicht nur die therapeutische Wirksamkeit geprüft, sondern auch die Verträglichkeit der s.c. Anwendung im Vergleich zur herkömmlichen i.v. Applikation nachgewiesen werden (EMA Committee for Proprietary Medicinal Products 2002).

3.1.2.1 Surek s.c. verursacht keine lokale Entzündungsreaktion

Da es sich bei trAk um immunaktivierende Agenzien handelt, war es denkbar, dass die s.c. Surek-Gabe zu lokalen Entzündungsreaktionen im Bereich der Einstichstelle führen

würde. Um mögliche Hautveränderungen festzustellen, wurden die Mäuse rasiert und der Injektionsbereich vor und nach s.c. Surek-Gabe engmaschig kontrolliert (Abbildung 5A). Während des gesamten Beobachtungszeitraums traten weder Rötungen noch andere Anzeichen einer entzündlichen Hautreaktion auf (Abbildung 5B). Um den makroskopischen Befund zu bestätigen, wurde die Haut weiterhin 48 h nach Surek s.c. histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Nach Surek s.c. wies die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollhaut keine trAk-bedingten Veränderungen auf (Abbildung 5C). Die Analyse der Marker CD3 für T-Zellen, Mac3 für Makrophagen und B220 für B-Zellen ergab eine normale Verteilung der Immunzellen in der Haut (Daten nicht gezeigt). Es kann daher eine durch Surek verursachte Entzündungsreaktion der Haut nach s.c. Applikation ausgeschlossen werden.

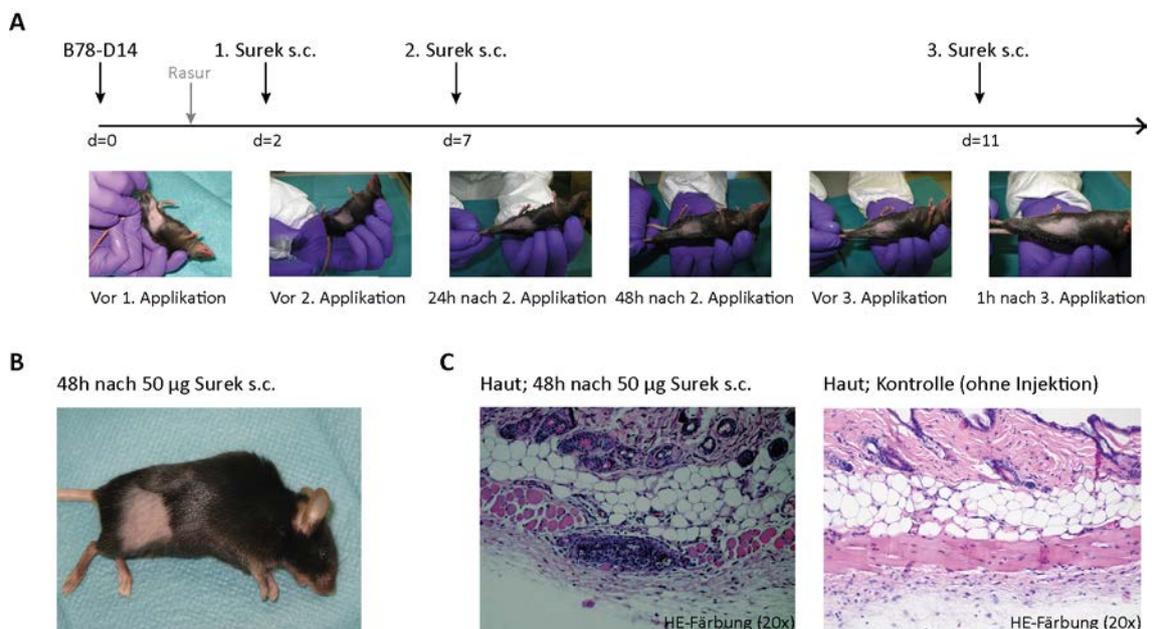


Abbildung 5: Lokale Verträglichkeit von Surek s.c.. (A) Kontrolle der Hautreaktion vor und nach Therapie mit 50 µg Surek s.c.. (B) Makroskopischer Befund 48 h nach s.c. Applikation des trAk. (C) Immunhistochemische Untersuchung 48 h nach Surek s.c.; HE-Färbung der Haut mit (links) und ohne (rechts) s.c.-Injektion. Im Vergleich zur Kontrolle (rechts, aufgenommen ohne Polfilter), zeigt die linke Abbildung (aufgenommen mit Polfilter) ein Granulom im Bereich der Einstichstelle, vermutlich entstanden durch die Injektion selbst und dabei eingebrachte Haarfragmente. Anfertigung der histologischen Schnitte durch F. Neff, Institut für Pathologie, Helmholtz-Zentrum München.

3.1.2.2 Surek s.c. zeigt ein verbessertes systemisches Nebenwirkungsprofil

Für die klinische Anwendung spielt die systemische Verträglichkeit von trAk eine entscheidende Rolle. Häufig treten therapiebedingt grippeähnliche Symptome, Fieber und Schüttelfrost auf (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009). Für die Evaluierung des Nebenwirkungsprofils im präklinischen Mausmodell sind diese Parameter jedoch ungeeignet. Stattdessen hat sich das Körpergewicht als ein zuverlässiger und sensitiver Marker bewährt, um den Allgemeinzustand behandelter Mäuse einzuschätzen (Ullman-Cullere und Foltz 1999). Daher wurde die Gewichtsentwicklung der Tiere nach Therapie engmaschig kontrolliert. Nach Injektion von Tumorzellen und Surek an Tag 0 verzeichneten beide Behandlungsgruppen einen erheblichen Gewichtsverlust bis einschließlich Tag 2, während die Kontrollgruppen ein konstantes Körpergewicht aufzeigten. Ab Tag 3 nach Behandlung erholten sich die s.c. behandelten Mäuse und nahmen an Körpergewicht zu, die i.v. behandelten Tiere hingegen verloren weiterhin an Gewicht (Abbildung 6).

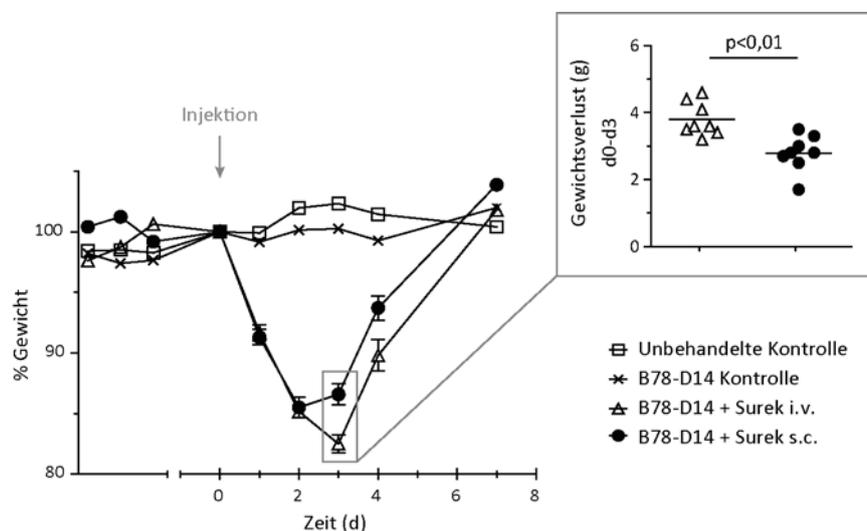


Abbildung 6: Systemische Verträglichkeit von Surek, gemessen am Gewichtsverlust der Tiere nach Therapie. Appliziert wurden 10^5 B78-D14 Zellen und $50 \mu\text{g}$ Surek i.v. oder s.c. an Tag 0. Kontrollgruppen erhielten Tumorzellen alleine oder blieben unbehandelt. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde das Gewicht der Mäuse täglich überprüft. Die Behandlung mit Surek führte zu einem starken Gewichtsverlust der Mäuse. An Tag 3 unterscheidet sich das Gewicht der i.v. behandelten Tiere statistisch signifikant von den s.c. behandelten Mäusen mit $p < 0,01$ (Student's t-Test, $n=8$). 100 % wurden definiert als das Gewicht an Tag 0. Die Kurve zeigt Mittelwerte \pm SEM ($n=8$), während in der Vergrößerung Einzelwerte dargestellt sind.

Da der relative Gewichtsverlust nach s.c. Behandlung am dritten Tag nach Therapie um etwa 40 % geringer war als nach i.v. Behandlung, kann im Vergleich eine verbesserte systemische Verträglichkeit der s.c. Applikation angenommen werden (Student's t-Test, $p=0,0032$).

3.1.3 Pharmakokinetik von Surek und Induktion von Anti-Antikörpern

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Surek s.c. im Vergleich zur herkömmlichen i.v. Injektion des trAk ähnlich effektiv und sogar besser verträglich ist. Da diese Beobachtung möglicherweise auf Unterschiede in der Pharmakokinetik zurückzuführen ist, wurden die beiden Applikationsrouten im Folgenden diesbezüglich verglichen.

3.1.3.1 Pharmakokinetisches Profil von Surek

Zunächst wurde Surek einmalig i.v. oder s.c. appliziert und die Plasmakonzentration über einen Zeitraum von 10 Tagen gemessen (Abbildung 7A). Nach i.v. Injektion war Surek direkt verfügbar und hatte bereits zum ersten Messzeitpunkt – 10 Minuten nach Antikörpergabe – seinen maximalen Wert im Messverlauf gezeigt. Danach wurde der trAk konstant eliminiert. Im Gegensatz dazu war nach s.c. Applikation von Surek eine verzögerte Absorption zu beobachten. Anstelle einer Konzentrationsspitze bildete sich nach 8 bis 24 h ein Konzentrationsplateau aus, gefolgt von einer Eliminationsphase. Ab Tag 5 nach Injektion konnte Surek – unabhängig von der Applikationsart – im Plasma nicht mehr nachgewiesen werden. Der quantitative Vergleich der qualitativ stark verschiedenen Kurven ergab – bezogen auf die Fläche unter der i.v.-Kurve – eine Bioverfügbarkeit von lediglich 50 % nach s.c. Gabe von Surek.

Wie bereits aus früheren Arbeiten hervorging, ist das Wirkpotenzial von Surek dosisabhängig (Ruf, *et al.* 2012). Daher wurde im Folgenden das pharmakokinetische Profil auch nach mehrfacher Antikörpergabe untersucht (Abbildung 7B). Während jede

i.v. Injektion mit der Ausbildung einer Plasmaspitze und einem anschließenden schnellen Konzentrationsabfall verbunden war, führte die wiederholte Gabe von Surek s.c. an den Tagen 0, 2 und 4 zum kontinuierlichen Aufbau eines Wirkspiegels ohne Konzentrationsspitzen.

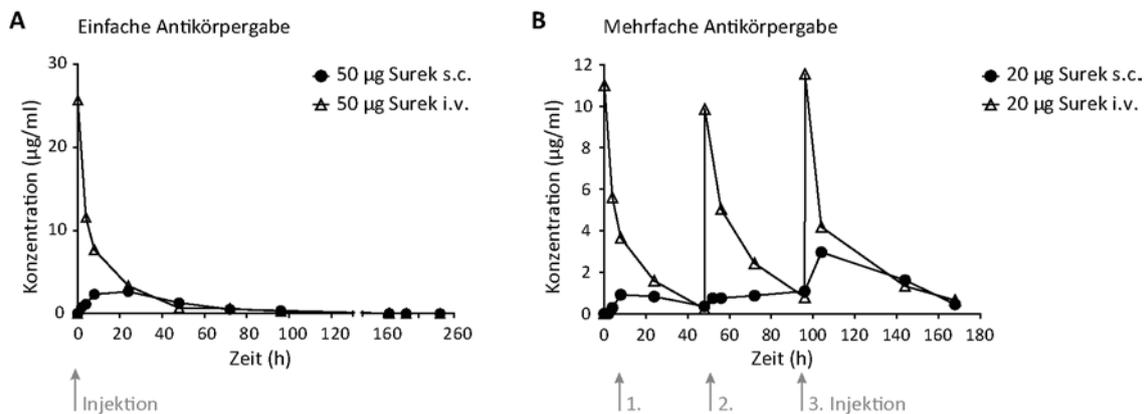


Abbildung 7: Pharmakokinetik des trAk Surek. (A) Plasmakonzentration nach Injektion von 50 µg Surek i.v. bzw. s.c.. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden Serumproben entnommen und mittels ELISA vermessen. Die Bioverfügbarkeit wurde berechnet durch Vergleich der Flächen unter den Kurven (AUC, *Area Under the Curve*). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen. (B) Plasmakonzentration nach multipler trAk-Gabe. An den Tagen 0, 2 und 4 wurden jeweils 20 µg Surek i.v. bzw. s.c. appliziert und entsprechend Serumproben gesammelt. Aufgetragen ist die mittlere Plasmakonzentration aus n=2 Mäusen.

Da das Auftreten von unerwünschten Wirkungen wahrscheinlich mit Konzentrationsspitzen im Zusammenhang steht, zeigte Surek s.c. insgesamt ein vielversprechendes pharmakokinetisches Profil für die klinische Anwendung von trAk.

3.1.3.2 Entstehung eines Wirkstoffdepots in der Haut nach Surek s.c.

Da Surek s.c. trotz der, im Vergleich zur i.v. Injektion, geringeren Bioverfügbarkeit *in vivo* therapeutisch wirksam war (Abbildung 4), lag die Vermutung nahe, dass sich nach s.c. Applikation des trAk ein Wirkstoffdepot in der Haut ausbildete. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde 7 Tage nach Surek s.c. die Haut im Bereich der Injektionsstelle präpariert und immunhistochemisch analysiert (Abbildung 8). In einem s.c.

Lymphknoten konnte Surek mittels eines Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers auch eine Woche nach Behandlung noch detektiert werden (Abbildung 8A). Zusätzlich wurde durch serielle Gewebsschnitte eine Assoziation mit MHC-II positiven Zellen beobachtet, an die die trAk offenbar über ihre Fc-Region binden (Abbildung 8B).

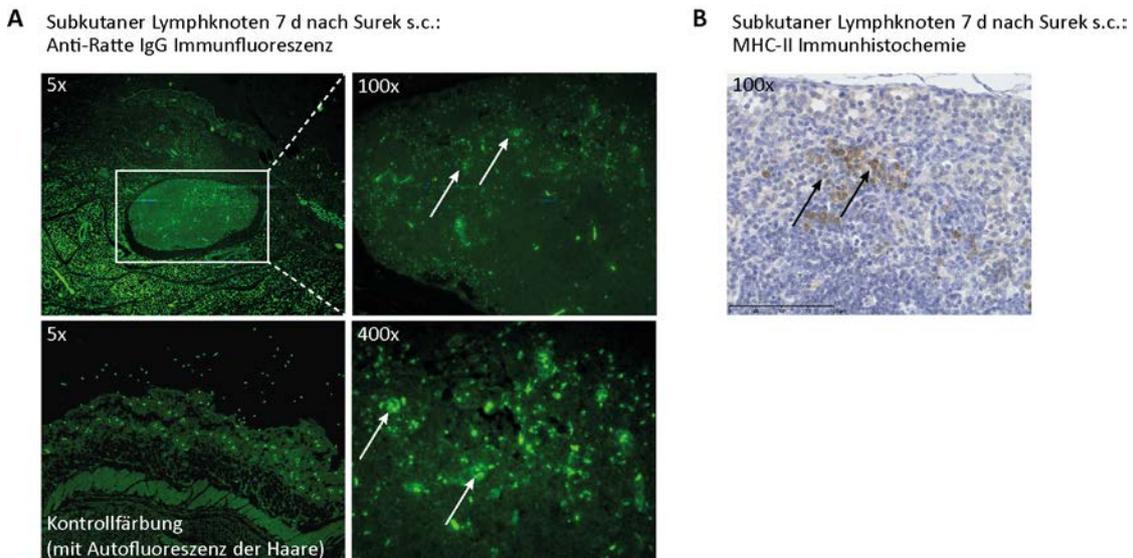


Abbildung 8: Immunfluoreszenz (A) und Immunhistochemie (B) der Haut 7 d nach 50 µg Surek s.c.. Haut (rasiert) im Bereich der Einstichstelle wurde präpariert. (A) Detektion von Surek in einem s.c. Lymphknoten mittels Cy2-markierter Anti-Ratten-IgG-Antikörper. Im Bild links oben ist der s.c. Lymphknoten (weißer Rahmen) in einer 5-fachen Vergrößerung zu sehen. Die weißen Pfeile in den Aufnahmen rechts oben (Vergrößerung 100x) und rechts unten (Vergrößerung 400x) weisen auf zellgebundenen Surek hin. Die Kontrollfärbung links unten zeigt Autofluoreszenz ohne Zugabe des Cy2-markierten Sekundärantikörpers in einer 5-fachen Vergrößerung. (B) Immunhistochemischer Nachweis MHC-II positiver Zellen (schwarze Pfeile) im s.c. Lymphknoten (100x Vergrößerung). Bei den abgebildeten Aufnahmen handelt es sich um Serienschnitte. Durchführung der Immunfluoreszenz sowie Immunhistochemie durch F. Neff, Institut für Pathologie, Helmholtz-Zentrum München.

3.1.3.3 Surek s.c. induziert Anti-Antikörper

Wie alle Antikörper führen trAk zur Entstehung von neutralisierenden Anti-Antikörpern, welche im weiteren Verlauf den Therapieerfolg limitieren könnten (Kiewe, *et al.* 2006; Ströhlein, *et al.* 2009; Maher und Adami 2013). Da es sich bei der Haut um ein Organ mit vielen professionellen APZ handelt, findet nach s.c. Applikation von Surek womöglich eine verstärkte Präsentation von trAk-Epitopen gegenüber dem Immunsystem statt. Eine gesteigerte Induktion von Anti-Antikörpern könnte die Folge

sein. Bei der Bestimmung von MAMA und MARA im Mausserum nach Behandlung mit Surek stellte sich jedoch deutlich heraus, dass die Entstehung von Anti-Antikörpern durch die Modifikation der Applikationsroute nicht beeinflusst wurde (Abbildung 9).

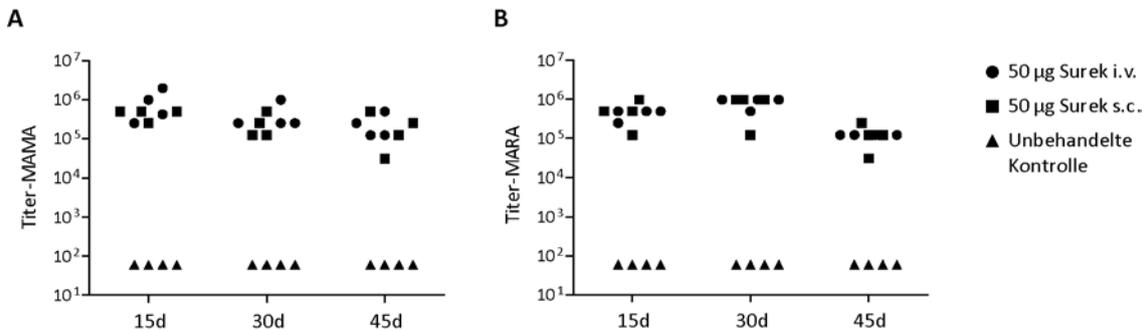


Abbildung 9: Entstehung von Anti-Antikörpern nach Behandlung mit trAk. Nach Applikation von 50 µg Surek i.v. bzw. s.c. wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen und Anti-Antikörper im Serum mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente das Serum un behandelter Mäuse. (A) MAMA-Titer 15, 30 und 45 d nach Surek-Injektion. (B) MARA-Titer 15, 30 und 45 d nach Surek-Injektion. Darstellung von Einzelwerten (n=4 pro Gruppe).

3.1.4 Verändertes Zytokinmilieu nach Surek s.c. versus i.v.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine verbesserte Verträglichkeit von s.c. verabreichtem Surek verglichen mit der i.v. Applikation und belegen, dass Surek s.c. trotz geringer Bioverfügbarkeit in der Lage ist, Tumoren abzustößen. Wie bereits erwähnt, spielen Zytokine für die therapeutische Wirksamkeit von trAk eine Schlüsselrolle; auf der anderen Seite zeichnen sie jedoch auch verantwortlich für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen (Zeidler, *et al.* 1999; Heiss, *et al.* 2005; Hess, *et al.* 2012). Die Beeinflussung des Zytokinmusters durch Modifikation der Applikationsroute soll daher im Folgenden analysiert werden.

3.1.4.1 Surek s.c. induziert eine moderate Ausschüttung von Th1-Zytokinen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapie wurde die Konzentration verschiedener Th1-Zytokine im Serum gemessen. Wie in Abbildung 10A gezeigt war nach Surek-Gabe

ein allgemeiner Anstieg aller untersuchten Th1-Zytokine zu beobachten. Allerdings unterschied sich die Kinetik der Zytokinfreisetzung nach i.v. und s.c. Applikation von Surek signifikant voneinander. Surek i.v. führte zu einem sofortigen Anstieg von IL-6, IFN- γ und TNF (Tumornekrosefaktor) innerhalb der ersten Stunde nach trAk-Injektion. Im Gegensatz dazu zeigte Surek s.c. eine verzögerte Zytokinfreisetzung. Das Konzentrationsmaximum wurde erst 3 h nach trAk-Applikation erreicht. Weiterhin konnte 24 h nach Surek s.c. *versus* i.v. ein rascherer Abfall der Th1-Zytokin-konzentration im Serum beobachtet werden.

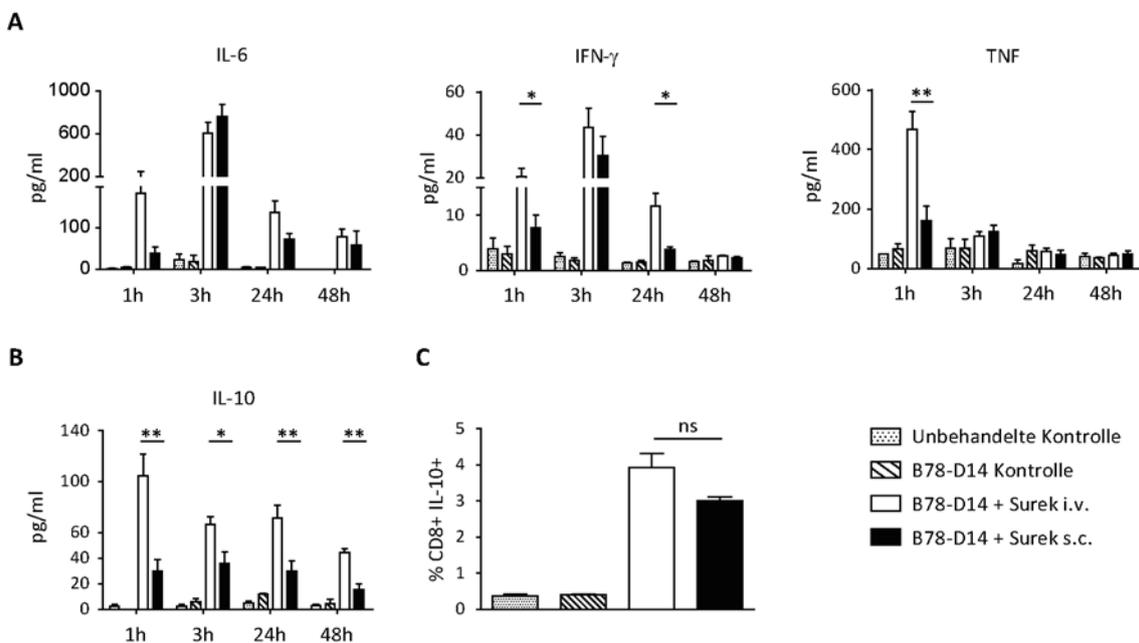


Abbildung 10: Verändertes Zytokinmuster nach Surek s.c. *versus* i.v.. Zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 24 h und 48 h nach Applikation von 10^5 B78-D14 Zellen und 50 μ g Surek i.v. bzw. s.c. wurde die Zytokinkonzentration im Serum mittels Bio-Plex[®] bestimmt. Kontrolltiere erhielten Tumorzellen alleine oder blieben unbehandelt. (A) Konzentration von IL-6, IFN- γ und TNF im Serum. (B) Konzentration von IL-10 im Serum. (C) Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten 48 h nach Behandlung wie beschrieben. Intrazelluläre Färbung von IL-10 in CD8⁺ T-Zellen. Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 4$). Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen i.v. und s.c. Applikation hin ($p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**), Student's t-Test).

Es ist anzunehmen, dass das Nebenwirkungsprofil von Surek s.c. durch die moderate Zytokinausschüttung günstig beeinflusst wird, während die rasante Freisetzung nach i.v. Injektion das sogenannte Zytokin-Freisetzungssyndrom – begleitet von einer grippeähnlichen Symptomatik – provoziert. In Bezug auf die therapeutische

Wirksamkeit scheinen T-Zell-Aktivierung und IFN- γ -Produktion (Abbildung 3) nach Surek s.c. – trotz reduzierter Freisetzung von Th1-Zytokinen ins Serum – jedoch offensichtlich auszureichen, um den Behandlungserfolg sicherzustellen.

3.1.4.2 Surek s.c. führt zur Reduktion gegenregulatorischer Mechanismen

Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von s.c. verabreichtem Surek (Abbildung 7A) waren der Therapieerfolg (Abbildung 4) sowie die ausgeprägte T-Zell-Aktivierung (Abbildung 3) nach s.c. Behandlung überraschend. Auf der Suche nach einer Erklärung wurde vermutet, dass neben der Ausbildung eines Wirkstoffdepots in der Haut (Abbildung 8) eine verminderte Freisetzung gegenregulatorischer Zytokine für die gute therapeutische Wirksamkeit von Surek s.c. verantwortlich sein könnte. In der Tat ergab die Analyse des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Serum einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Applikationsformen. Über den Beobachtungszeitraum von 48 h wurden nach Surek i.v. stark erhöhte IL-10-Spiegel im Serum gemessen (Abbildung 10B), während im Serum s.c. behandelte Tiere signifikant weniger IL-10 detektiert werden konnte. Dies ging einher mit einem gesteigerten IL-10-Gehalt in CD8⁺ T-Zellen 2 Tage nach Applikation von Tumorzellen und Surek i.v. verglichen mit Surek s.c. (Abbildung 10C). Auf zellulärer Ebene konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Expression des koinhibitorischen Rezeptors CTLA-4 auf CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen nach s.c. Behandlung signifikant reduziert war gegenüber Surek i.v. (Abbildung 11). Ferner wiesen s.c. therapierte Tiere tendenziell weniger CD4⁺Foxp3⁺ Treg auf (Abbildung 11C).

Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass Surek s.c. weniger gegenregulatorische Prozesse in Gang setzt, so dass die für den Therapieerfolg essenziellen Mechanismen wie die Aktivierung von Effektorzellen sowie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nur geringfügig beeinträchtigt werden. Diese Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Aktivierung und Suppression nach

Surek s.c. ermöglicht womöglich die beobachtete effiziente Tumorabstoßung trotz vergleichsweise geringer Bioverfügbarkeit.

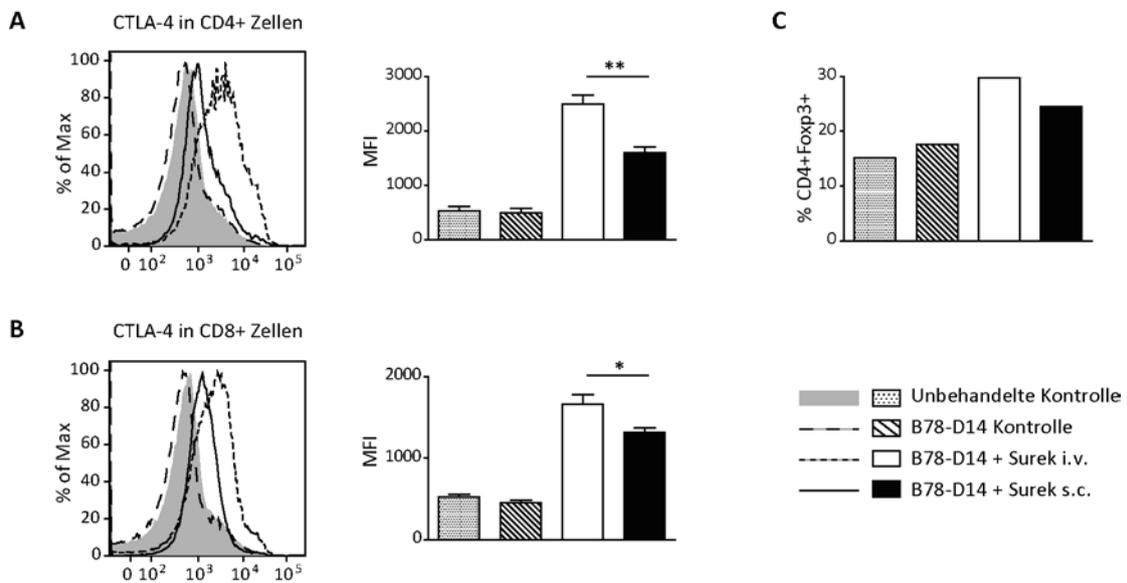


Abbildung 11: Reduktion der Gegenregulation nach Surek s.c. versus Surek i.v.. Mäuse erhielten entweder 10^5 B78-D14-Zellen und $50 \mu\text{g}$ Surek i.v. bzw. s.c. oder Tumorzellen alleine oder blieben unbehandelt. Nach 72 h wurden T-Zellen aus Milzen durchflusszytometrisch analysiert. Intrazelluläre Färbung von CTLA-4 in CD4^+ (A) und CD8^+ (B) T-Zellen. Links repräsentative Ergebnisse, rechts Darstellung der Mittelwerte \pm SEM (n=5). Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen i.v. und s.c. Applikation hin ($p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**), Student's t-Test). (C) Anteil der CD4^+ Foxp3⁺ Treg nach Behandlung. Kompilation von 4 Versuchen.

3.2 Kombination trifunktionaler Antikörper mit einem CTLA-4-blockierenden Antikörper

Beim Vergleich der Applikationsformen hatte sich bereits abgezeichnet, dass durch Surek neben aktivierenden auch gegenregulatorische Mechanismen angestoßen werden. Eine gezielte Blockade dieser inhibitorischen Effekte könnte die klinische Wirksamkeit von trAk verbessern und stellt daher einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Therapieoptimierung dar.

3.2.1 Entwicklung eines kombinierten Behandlungskonzeptes

3.2.1.1 Surek induziert regulatorische T-Zellen

Im vorherigen Kapitel wurde bereits ein Anstieg von Treg nach Surek-Therapie beschrieben (Abbildung 11C). Da diese T-Zellsubpopulation eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung einer Antitumor-Antwort einnimmt, wurde sie im Folgenden genauer untersucht. Hierzu wurden Splenozyten 2 und 4 Tage nach Behandlung durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 12A). Während 48 h nach Applikation von B78-D14-Zellen und Surek keine Zunahme der Treg-Population in der Milz zu beobachten war, stieg 96 h nach Surek-Gabe der Anteil $CD4^+ Foxp3^+$ Treg signifikant an (Abbildung 12B). Ferner nahm zu diesem Zeitpunkt die Frequenz $Ki-67^+$ Treg in Surek behandelten Tieren deutlich zu, was auf eine verstärkte Proliferation dieser Suppressorzellen unter Einfluss von Surek hinweist (Abbildung 12C). Bei der weiteren Charakterisierung wurde ferner festgestellt, dass die $Foxp3^+$ Fraktion der $CD4^+$ T-Zellen eine erhöhte Expression des koinhibitorischen Moleküls CTLA-4 aufweist (Abbildung 12D). CTLA-4 gilt als wichtiger Kontrollpunkt der Immunregulation, dessen gezielte Blockade durch monoklonale Antikörper bereits therapeutisch genutzt wird (Hodi, *et al.* 2010). Die Identifizierung dieser klinisch relevanten Zielstruktur innerhalb der Treg-Population war eine wichtige Beobachtung für die weitere Entwicklung eines neuen

Behandlungskonzeptes, welches durch gezielte Blockade gegenregulatorischer Mechanismen eine optimierte trAk-Therapie bewirken könnte.

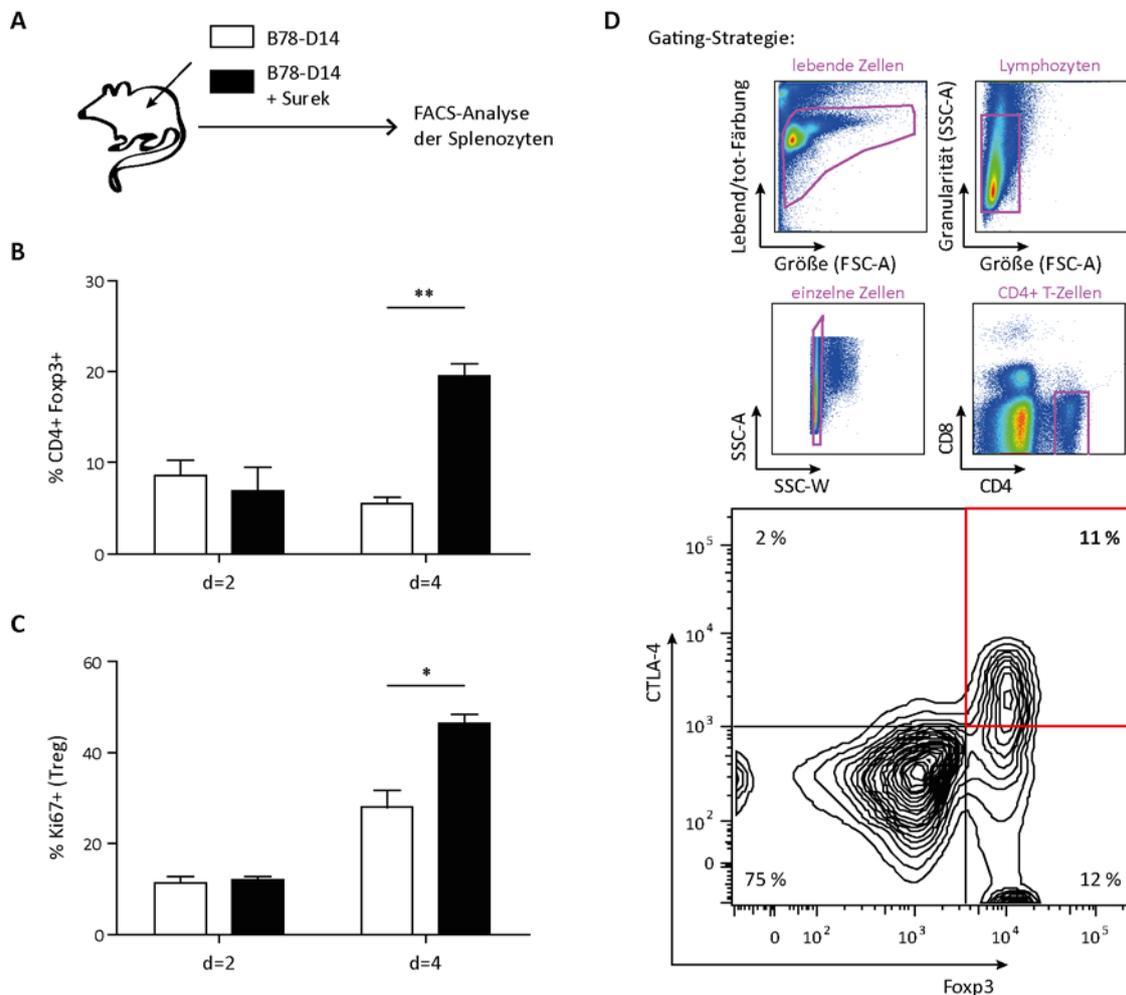


Abbildung 12: TrAk Surek induziert Treg. (A) Versuchsaufbau. 48 h und 96 h nach Applikation von 10⁵ B78-D14-Zellen ± Surek i.p. wurden Milzen entnommen und die T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (B) Anteil der CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 2 und 4 Tage nach Behandlung. (C) Proliferation der Treg gemessen durch intrazelluläre Färbung von Ki-67. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert ± SEM (n ≥ 3). Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede 4 Tage nach Behandlung hin (p < 0,05 (*) bzw. p < 0,01 (**), Student's t-Test). (D) Koexpression von CTLA-4 und Foxp3 in CD4⁺ T-Zellen 4 Tage nach Behandlung mit Surek; Repräsentative Darstellung inklusive Gating-Strategie.

3.2.1.2 Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf das Tumorwachstum

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Surek zur Anreicherung von Treg führt (Abbildung 12). Darüber hinaus wurde untersucht, ob die suppressive CD4⁺ Subpopulation auch für das Tumorwachstum *in vivo* von Bedeutung ist. Dazu wurden

DEREG-Mäuse eingesetzt, welche den DT-Rezeptor unter Kontrolle des Foxp3-Locus exprimieren, so dass Foxp3⁺ Treg durch Gabe von DT spezifisch depletiert werden können (siehe Abschnitt 2.1.5). Nach Inokulation mit einer letalen Dosis B78-D14-Zellen i.p. und gezielter Treg-Depletion mittels DT wurde sodann das Überleben der DEREG-Mäuse beobachtet (Abbildung 13A). Während die Kontrollgruppen etwa 50 Tage nach B78-D14-Applikation sichtbare Tumoren entwickelten, waren 50 % der DEREG-Mäuse allein durch Depletion der Treg in der Lage, den Tumor abzustößten (Abbildung 13B). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Anwesenheit von Treg relevant für die Entstehung von B78-D14-Tumoren *in vivo* ist und veranschaulicht, dass die Antitumor-Wirkung von trAk durch die gleichzeitige Induktion immunsuppressiver Treg sehr wahrscheinlich negativ beeinflusst wird.

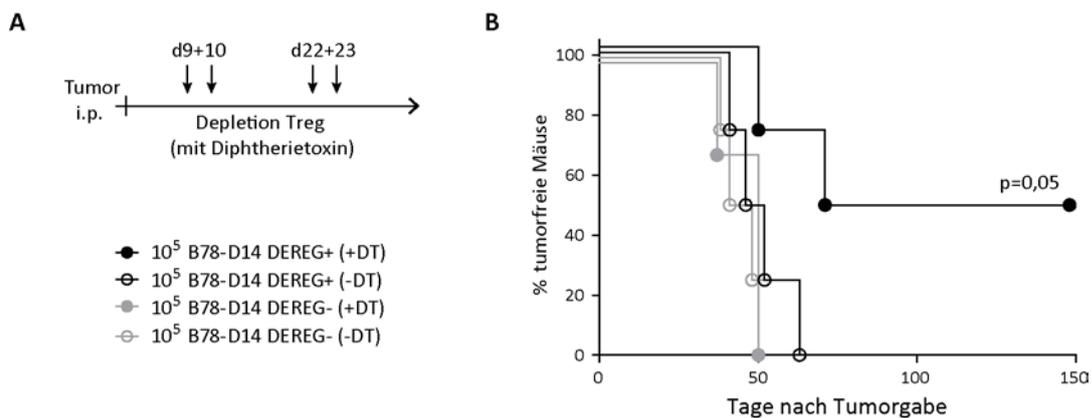


Abbildung 13: Einfluss von Treg auf das Tumorstadium. (A) Depletionsschema. Nach Applikation von 10⁵ B78-D14-Zellen wurden Treg durch Injektion von 500 ng DT i.p. an den Tagen 9, 10, 22 und 23 nach Tumorgabe in DEREG⁺ Mäusen gezielt depletiert. (B) Überleben nach letaler Tumordosis dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm. Kontrolliere erhielten kein DT. Als weitere Kontrolle ist das Überleben von DEREG⁻ Mäusen ± DT in grau gezeigt. Statistische Analyse durch Log-Rank-Test (n=3 bis 4).

3.2.1.3 Hypothese für ein kombiniertes Behandlungskonzept – Einfluss eines CTLA-4-blockierenden Antikörpers auf Therapie und Vakzinierung mit trifunktionalen Antikörpern

Die Erkenntnis, dass Surek zur Anreicherung von Treg führt, diese das koinhibitorische Molekül CTLA-4 exprimieren und auch *in vivo* eine essenzielle gegenregulatorische Funktion übernehmen, führte zur Entwicklung eines neuen Behandlungskonzepts. Durch die Kombination von trAk mit einem CTLA-4 blockierenden Antikörper könnte es gelingen, die angestoßenen supprimierenden Signale zumindest teilweise aufzuheben und die trAk-induzierte Antitumor-Antwort effizient zu verstärken (Abbildung 14).

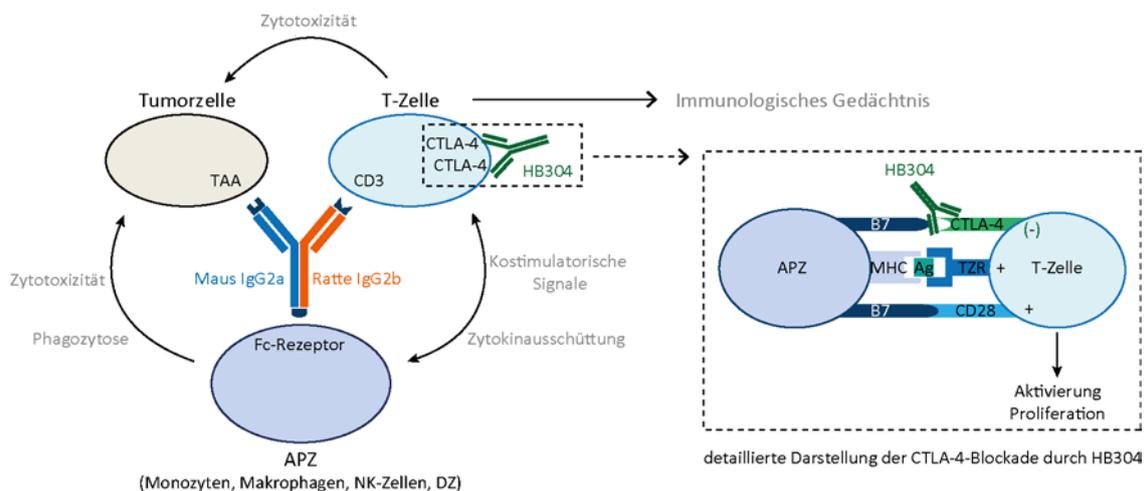


Abbildung 14: Therapieoptimierung durch ein kombiniertes Behandlungskonzept bestehend aus trAk und dem CTLA-4-blockierenden Antikörper HB304. Nach T-Zell-Aktivierung durch trAk wird CTLA-4 auf T-Zellen hochreguliert (linkes Bild). Anstelle eines kostimulatorischen Signals durch die Wechselwirkung von B7 und CD28, wird bei Kontakt einer APZ mit dieser T-Zelle durch Interaktion von B7 und CTLA-4 – aufgrund höherer Affinität – ein inhibitorisches Signal vermittelt (rechtes Bild). Durch die Antikörpervermittelte Blockade von CTLA-4 wird dieses aufgehoben. T-Zellen werden anhaltend aktiviert und die Immunantwort gegen den Tumor verstärkt. (Detailldarstellung adaptiert nach (Garber 2010)).

Im Folgenden soll daher der Einfluss des CTLA4-blockierenden Antikörpers HB304 auf die Wirksamkeit von Surek im Hinblick auf die direkte Tumorabstoßung sowie auf die Induktion einer langandauernden Gedächtnisantwort untersucht werden.

3.2.2 Evaluierung des Kombinationsansatzes im B78-D14-Modell: Therapie

Der direkte therapeutische Effekt des Kombinationsansatzes bestehend aus dem trAk Surek und dem CTLA-4-blockierenden Antikörper HB304 wurde zunächst im B78-D14-Melanommodell überprüft.

3.2.2.1 Verträglichkeit der Kombinationstherapie *in vivo*

Da es sich sowohl bei Surek als auch bei HB304 um immunstimulierende Agenzien handelt, wurde – um potenzielle Toxizitäten auszuschließen – die Verträglichkeit des kombinierten Behandlungskonzeptes *in vivo* überprüft. Nach zeitgleicher Applikation der beiden Antikörper an den Tagen 0 und 3 wurden die Tiere engmaschig kontrolliert sowie an Tag 6 Organe zur histopathologischen Analyse entnommen (Abbildung 15A).

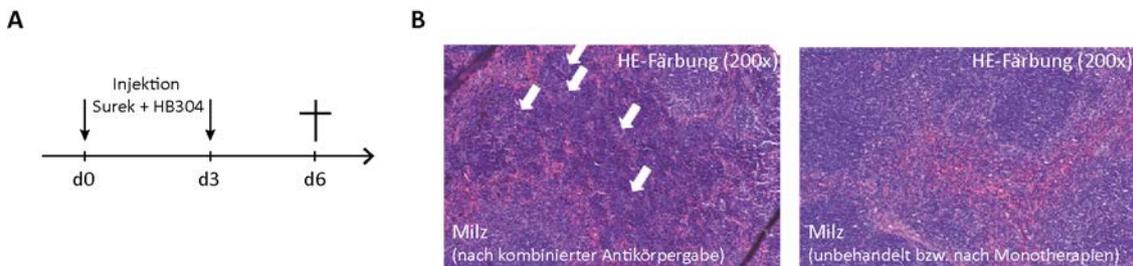


Abbildung 15: Histopathologische Analyse der Milz nach zeitgleicher Applikation von Surek und HB304. (A) Applikationsschema. An den Tagen 0 und 3 wurden 50 µg Surek und 100 µg HB304 i.p. injiziert. An Tag 6 wurden die Organe entnommen und histopathologisch untersucht. (B) Links, HE-Färbung der Milz nach kombinierter Antikörpergabe. Weiße Pfeile weisen auf die Ansammlung von Megakaryozyten hin. Rechts, Milz ohne histopathologischen Befund beobachtet nach den Monotherapien bzw. bei unbehandelten Kontrolltieren. Anfertigung der histologischen Schnitte durch M. Aichler, Institut für Pathologie, Helmholtz-Zentrum München.

Bei der körperlichen Kontrolle nach Kombinationsbehandlung wurde kein Unterschied gegenüber den allein mit Surek therapierten Tieren festgestellt. Auch die histopathologisch untersuchten Organe zeigten keine Auffälligkeiten. Allerdings wurden nach zeitgleicher, kombinierter Antikörpergabe in der Milz vermehrt Ansammlungen von Megakaryozyten gefunden, während die Milzen der Mäuse, die

entweder allein mit Surek oder allein mit HB304 behandelt wurden, ohne Befund blieben (Abbildung 15B). Diese Gewebeeränderung, bedingt durch eine mögliche Entzündungsreaktion, könnte auf eine HB304-vermittelte Überstimulation hindeuten. Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der beiden Antikörper legt diese Beobachtung eine zeitversetzte Applikation von Surek und HB304 nahe.

3.2.2.2 Kombinationstherapie zeigt kein synergistisches Potenzial

Um den Effekt der Kombinationsbehandlung auf die direkte Tumorabstoßung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein zeitversetztes Applikationsschema gewählt. Diese Entscheidung gründete auf dem histopathologischen Befund nach zeitgleicher Antikörpergabe (Abbildung 15) sowie auf der *in vivo* beobachteten verzögerten Hochregulation von CTLA-4 nach Surek-Gabe (Abbildung 12). Nachdem die Mäuse mit vitalen Tumorzellen inokuliert wurden, erhielten sie Surek an den Tagen 2 und 7 sowie HB304 an den Tagen 3, 6 und 9, um die Antitumor-Wirkung zu verstärken (Abbildung 16A). Kontrollgruppen wurden mit Surek bzw. HB304 alleine behandelt.

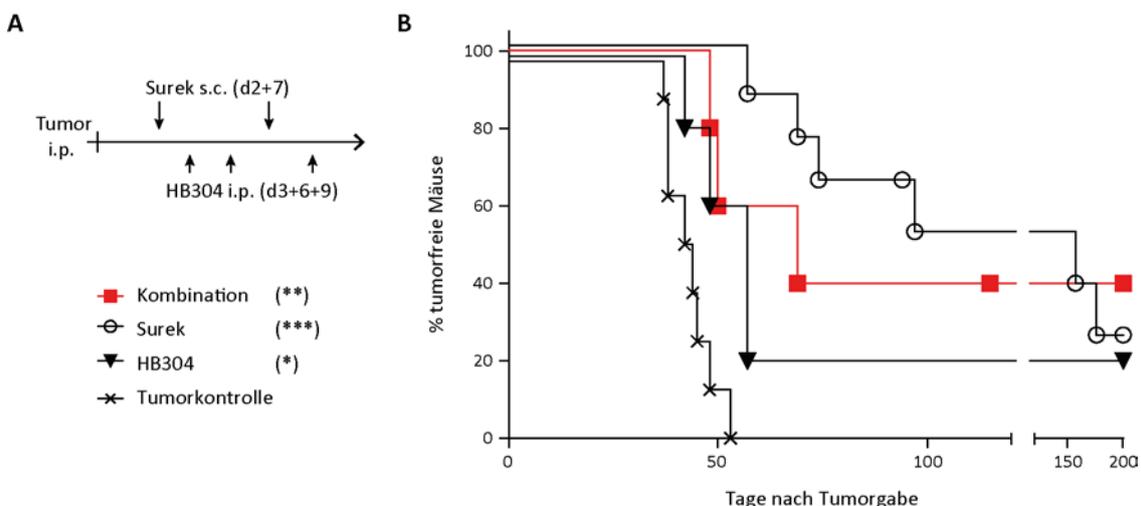


Abbildung 16: Keine Verbesserung des Therapieerfolgs durch die Kombinationstherapie. (A) Behandlungsschema. Nach Applikation von 10^5 B78-D14 Zellen i.p. werden die Tiere wie dargestellt mit jeweils 50 µg Surek s.c. und/oder 100 µg HB304 i.p. behandelt. (B) Überleben der Mäuse dargestellt im Kaplan-Meier-Diagramm. Statistische Analyse durch Log-Rank-Test (n=5 bis 9). Verglichen mit der Tumorkontrolle zeigten behandelte Mäuse ein signifikant verlängertes Überleben mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***)

Die Kombination aus Surek und HB304 zeigte zwar gegenüber der Tumorkontrolle einen signifikanten therapeutischen Effekt, erbrachte jedoch verglichen mit der Surek-Monotherapie keinen Überlebensvorteil (Abbildung 16B). Auch durch eine anschließende HB304-Erhaltungstherapie (1 x wöchentliche HB304-Gabe über den Zeitraum von 4 Wochen) ließen sich keine additiven Effekte der Kombinationsbehandlung hinsichtlich der direkten Tumorabstoßung feststellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Evaluierung des Kombinationsansatzes im B78-D14-Modell: Vakzinierung

Neben der direkten Tumorabstoßung vermittelt Surek auch die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses (Eissler, *et al.* 2012). Dieser Vakzinierungseffekt könnte durch die zusätzliche Blockade von CTLA-4 verstärkt werden. Aufgrund dessen wurde nachfolgend der Einfluss von HB304 auf die Induktion einer langdauernden tumorspezifischen Gedächtnisantwort im B78-D14-Modell überprüft.

3.2.3.1 Kombination führt zur Verbesserung des immunologischen Gedächtnisses *in vivo*

Um die Gedächtnisinduktion *in vivo* zu untersuchen, wurden die Mäuse entsprechend dem abgebildeten Schema vakziniert. Anschließend wurde die Tumorprotektion abgefragt (Abbildung 17A). Die Tiere wurden also an den Tagen 0 und 14 mit bestrahlten B78-D14-Zellen sowie Surek immunisiert und an Tag 21 mit vitalen B16F0-Zellen inokuliert. Zu den Zeitpunkten 4 d, 8 d, 13 d und 20 d wurde zur Wirkungsverstärkung HB304 verabreicht. Gegenüber der bisherigen Immunisierung mit bestrahlten Tumorzellen und Surek alleine führte die kombinierte Vakzinierung zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens. 80 % der Tiere waren in der Lage, das B16F0-Melanom erfolgreich abzustößen (Abbildung 17B). Der zusätzliche Einsatz von HB304 scheint also die entstandene polyvalente Immunantwort sowie deren Gedächtnisfunktion positiv zu beeinflussen. Im nächsten Schritt sollen nun

Mechanismen, welche für den *in vivo* beobachteten Synergismus verantwortlich zeichnen, identifiziert werden.

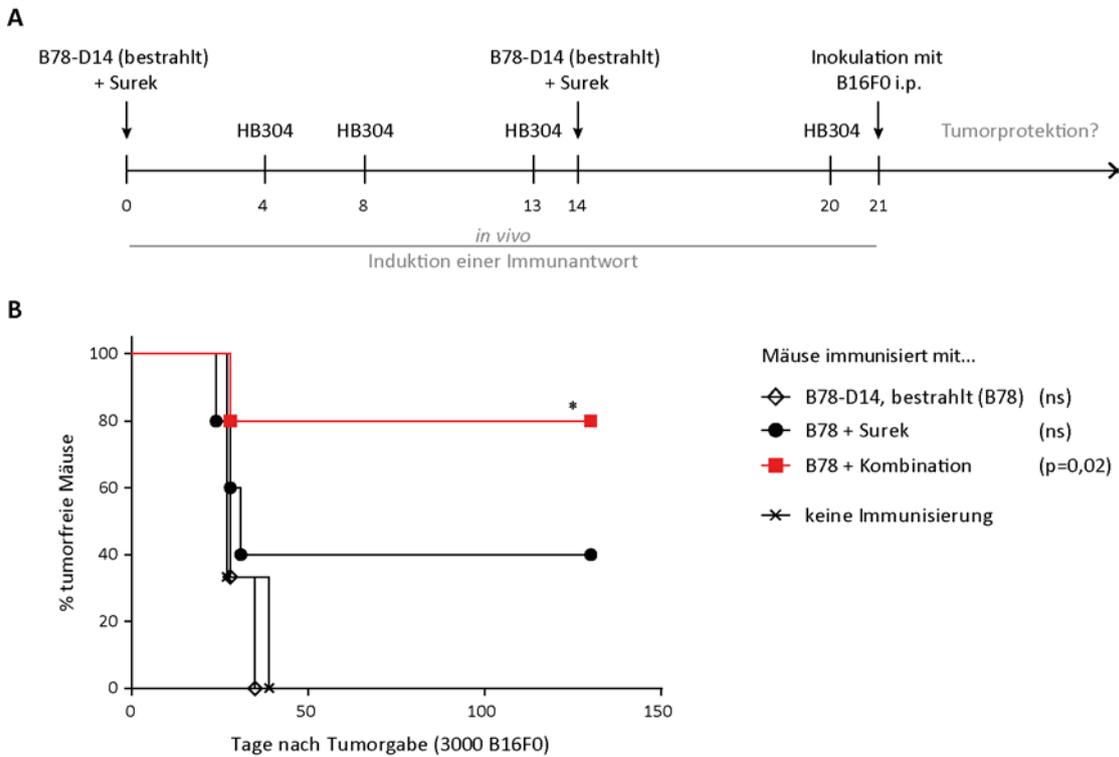


Abbildung 17: Kombinierte Vakzinierung verbessert die Gedächtnisinduktion *in vivo*. (A) Detaillierte Darstellung des zeitversetzten Immunisierungsschemas. An den Tagen 0 und 14 wurden die Mäuse mit 10^5 bestrahlten B78-D14 \pm 10 μ g Surek i.p. immunisiert. An den Tagen 4, 8, 13 und 20 erhielten die Tiere aus der Kombinationsgruppe zusätzlich 100 μ g HB304 i.p.. Anschließend wurden an Tag 21 alle immunisierten Mäuse mit 3000 vitalen B16F0 inokuliert und die Tumorprotektion abgefragt. (B) Tumorprotektion nach Immunisierung. Statistische Analyse durch Log-Rank-Test. Verglichen mit nicht immunisierten Kontrolltieren (n=3) zeigten die Mäuse nach kombinierter Vakzinierung (n=5) ein signifikant verlängertes Überleben mit $p < 0,05$ (*). Dasselbe gilt für den Vergleich mit der B78-D14-Kontrollgruppe (n=3). Von der Immunisierung mit B78-D14 und Surek alleine (n=5) unterscheidet sich die kombinierten Vakzinierung mit $p=0,2$.

3.2.3.2 Einfluss einer kombinierten Vakzinierung auf die Gedächtnisinduktion – Analyse der Zytokine

Da für die Wirkweise von trAk Zytokine eine Schlüsselfunktion übernehmen, wurden Th1- und Th2-Zytokine im Serum immunisierter Mäuse analysiert, um eine mögliche Beeinflussung der Immunantwort durch die zusätzliche CTLA-4-Blockade aufzudecken.

Nach Induktion einer Immunantwort, wie oben beschrieben, wurden die Seren immunisierter Mäuse an Tag 21 entnommen und mittels Multiplex-Analyse untersucht (Abbildung 18A). Die Seren aller Mäuse, die während der Vakzinierung Surek erhielten, wiesen ein vergleichbares Zytokinprofil auf. Neben erhöhten Konzentrationen der Th1-Zytokine IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF wurde auch ein Anstieg der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 im Serum nachgewiesen (Abbildung 18B). Die zusätzliche Gabe von HB304 hatte keinen Einfluss auf die Th1/Th2-Ausrichtung der durch Surek induzierten Immunantwort. Kontrolltiere, die mit bestrahlten Tumorzellen und HB304 alleine immunisiert wurden, zeigten keinen Konzentrationsanstieg der analysierten Zytokine im Serum.

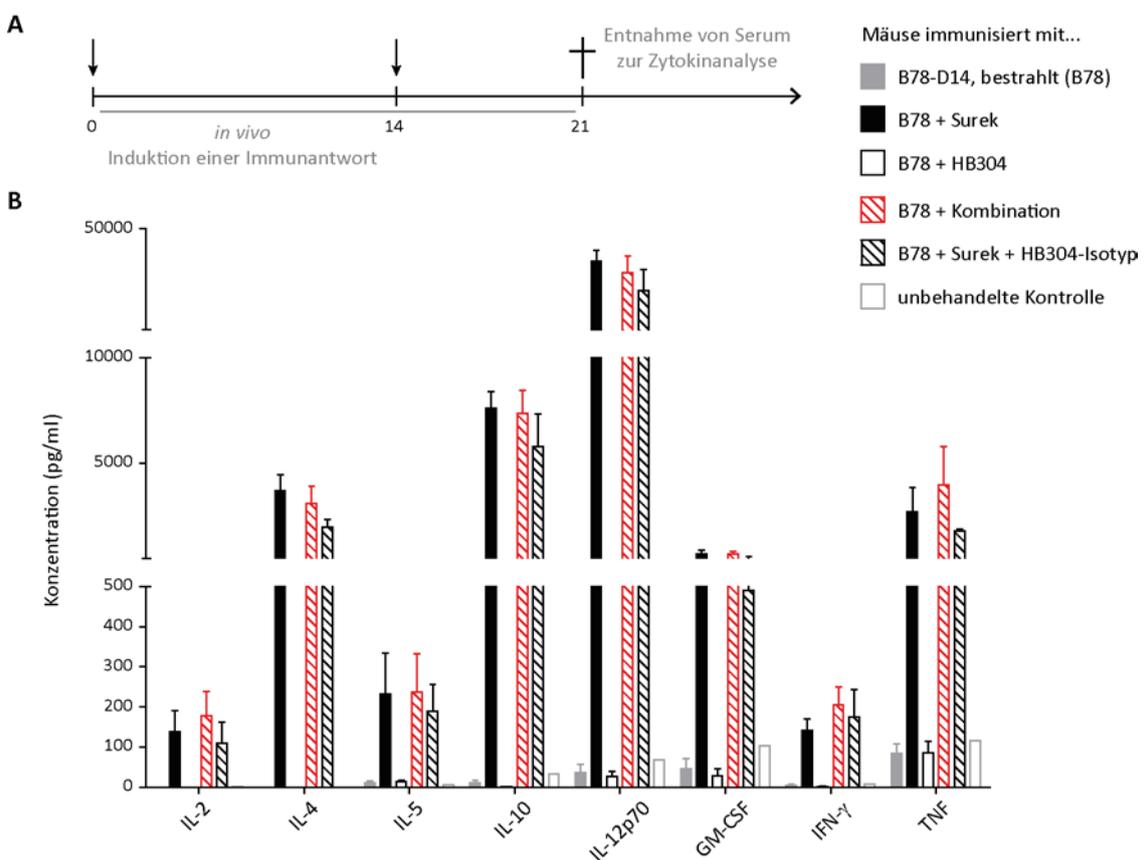


Abbildung 18: Unverändertes Zytokinprofil nach kombinierter Vakzinierung im B78-D14 Modell. (A) Vereinfachte Darstellung des Immunisierungsschemas zur Induktion einer Immunantwort *in vivo*. Nach der dreiwöchigen Immunisierungsphase wurden Seren von Mäusen entnommen und verschiedene Zytokin-Konzentrationen mittels Bio-Plex® analysiert. (B) Konzentration verschiedener Th1- und Th2-Zytokine im Serum. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM aus n=3 bis 8 Mäusen pro Gruppe. Bei der unbehandelten Kontrolle handelt es sich um die Analyse eines Serumpools aus n=5 Mäusen.

3.2.3.3 Einfluss einer kombinierten Vakzinierung auf die Gedächtnisinduktion – Analyse der T-Zellen

Da die Analyse der Zytokine im Serum keine Erklärung für die verbesserte Gedächtnisantwort *in vivo* lieferte, wurden im nächsten Schritt mögliche Veränderungen auf zellulärer Ebene untersucht. Um den Einfluss der kombinierten Vakzinierung auf T-Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Splenozyten aus immunisierten Mäusen isoliert, *in vitro* restimuliert und anhand verschiedener Parameter analysiert. Mithilfe dieses prädiktiven Systems war es möglich, die CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellantwort nach Gedächtnisinduktion genauer zu charakterisieren.

3.2.3.3.1 Anreicherung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Surek Peptid-spezifische T-Zellen induziert (Eissler, *et al.* 2012). Nach *In-vivo*-Induktion einer Immunantwort wie beschrieben und *In-vitro*-Stimulation mit bestrahlten Tumorzellen gelang es, die Entstehung Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch zu verfolgen (Abbildung 19A). Als Indikator für die Induktion tumorreaktiver T-Zellen wurde beispielhaft die Frequenz Trp-2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach *In-vitro*-Restimulation mit bestrahlten Tumorzellen bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein TAA, welches von B78-D14 überexprimiert wird (Eissler 2012). Während nach einwöchiger Restimulation noch keine tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Analyse detektiert werden konnten, hatte nach weiteren 7 Tagen die Induktion Trp-2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen begonnen. Eine erhöhte Frequenz wurde sowohl nach Immunisierung mit bestrahlten B78-D14 und Surek als auch nach kombinierter Vakzinierung festgestellt (Abbildung 19C). Im weiteren Verlauf zeichnete sich, gegenüber Surek alleine, eine sukzessive Anreicherung Trp-2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Kombinationsgruppe ab, welche an Tag 28 nach Beginn der *In-vitro*-Restimulation ihr Maximum erreichte (Abbildung 19B). An Tag 28 wurde die Zunahme der Trp-2⁺ CD8⁺ T-Zellfraktion auch in der Kontrollgruppe B78-D14 (bestrahlt) + HB304 sichtbar (Abbildung 19C).

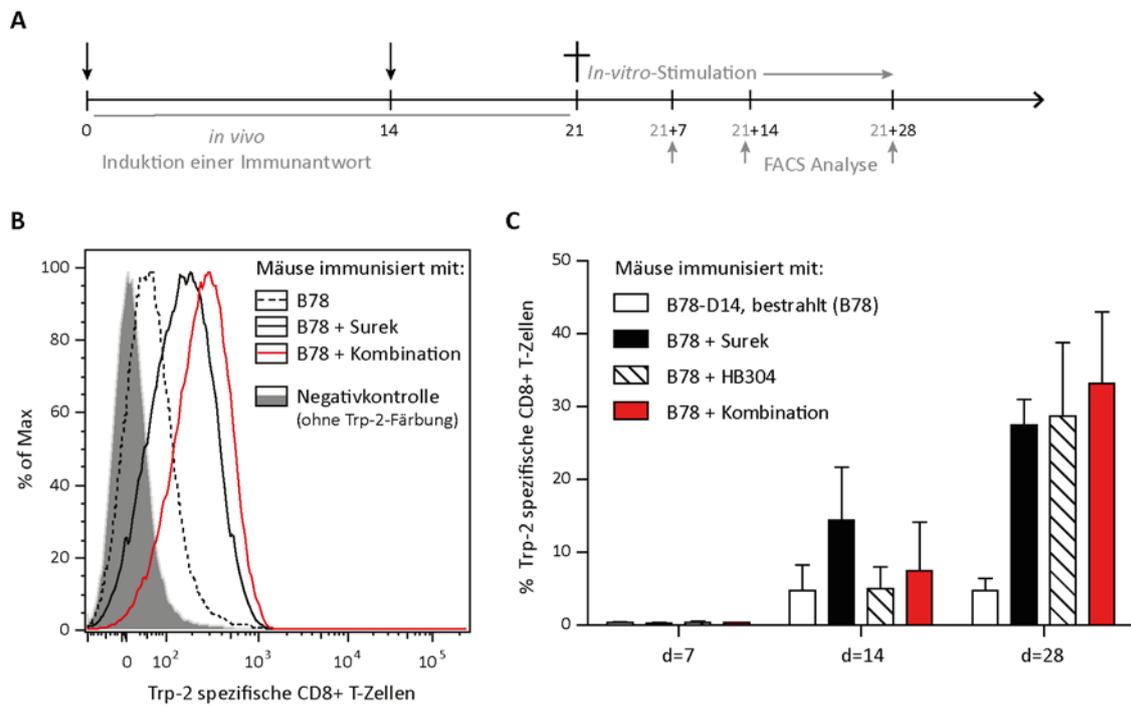


Abbildung 19: Anreicherung Trp-2 spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach *In-vitro*-Stimulation. (A) Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach Immunisierung wurden Splenozyten mit bestrahlten Tumorzellen *in vitro* restimuliert. 7 d, 14 d, und 28 d später wurde die Frequenz Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (B) Histogramm der Multimer-Färbung Trp-2 spezifischer CD8⁺ T-Zellen an Tag 28 nach Beginn der *In-vitro*-Stimulation. (C) Quantitative Darstellung der Trp-2⁺ CD8⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Restimulation. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils 3 Mäusen.

3.2.3.3.2 Beeinträchtigung der Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen

Nach kombinierter Vakzinierung konnte tendenziell eine Zunahme tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 19). Im Weiteren wurde die Funktionalität der CD8⁺ T-Effektorzellen im vorgestellten prädiktiven System untersucht. Aufgrund der essenziellen Bedeutung von IFN- γ für die Tumorabstoßung wurde als Indikator für die Effektorfunktion die Produktion und Freisetzung dieses Zytokins durch T-Zellen gemessen. Erneut wurden hierzu – nach *In-vivo*-Induktion einer Immunantwort – Splenozyten immunisierter Mäuse entnommen und *in vitro* restimuliert. 24 h, 48 h und 7 d später wurde die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde durchflusszytometrisch die Frequenz IFN- γ ⁺ T-Zellen erfasst (Abbildung 20A). Nach einwöchiger *In-vitro*-Restimulation ergab die Analyse der T-Zellen, dass die IFN- γ -Produktion hauptsächlich

durch CD8⁺ T-Zellen stattfindet (Abbildung 20B). Etwa 70 % der CD8⁺ T-Zellen aus dem kombinierten Vakzinierungsansatz waren nach TZR-unabhängiger Stimulation mit PMA und Ionomycin auch positiv für IFN- γ . Vergleichbare Werte wurden nach Immunisierung mit bestrahlten B78-D14 und Surek alleine ermittelt. CD4⁺ T-Zellen scheinen in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle zu spielen – lediglich 10 % sind in der Lage, IFN- γ zu produzieren.

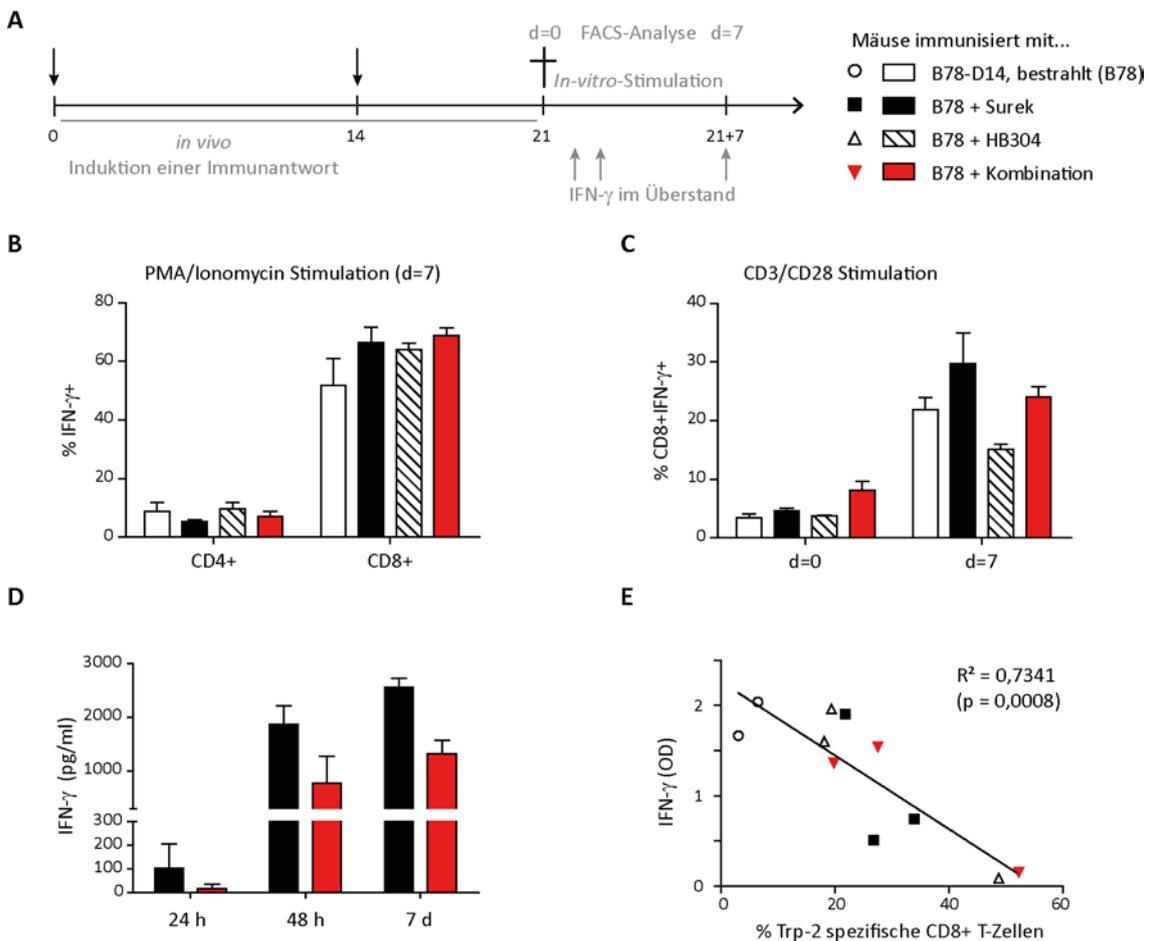


Abbildung 20: Analyse von IFN- γ nach Vakzinierung im B78-D14 Modell. (A) Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach Immunisierung wurden Splenozyten über den Zeitraum von einer Woche Peptid-spezifisch restimuliert. Anschließend wurden T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert und die IFN- γ -Konzentration in Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Alternativ wurden Splenozyten aus immunisierten Mäusen mit bestrahlten Tumorzellen über 28 Tage stimuliert und im Folgenden untersucht. (B) IFN- γ -Gehalt in PMA/Ionomycin-stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen 7 d nach Beginn der *In-vitro*-Stimulation. (C) IFN- γ -Gehalt in CD3/CD28-stimulierten CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Organentnahme (d=0) und nach *In-vitro*-Stimulation (d=7). (D) IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand nach 24 h, 48 h und 7 d der *In-vitro*-Stimulation. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM (n=3). (E) Negative Korrelation zwischen detektiertem IFN- γ im Überstand und der Frequenz Trp-2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen 28 d nach Restimulation mit bestrahlten Tumorzellen. Ein Symbol entspricht einer Maus.

Eine genauere Aussage zur Produktion von IFN- γ durch die induzierten CD8⁺ T-Zellen erhält man durch TZR-abhängige Stimulation der T-Zellen mittels Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern. Auf diese Weise wird eine natürliche T-Zell-Aktivierung simuliert. Während die CD8⁺ T-Zellen aus den immunisierten Mäusen zum Zeitpunkt der Organentnahme kaum IFN- γ produzierten, nahm der Anteil CD8⁺ IFN- γ ⁺ T-Zellen nach einwöchiger *In-vitro*-Restimulation zu (Abbildung 20C). CD8⁺ T-Zellen aus Mäusen, die mit bestrahlten B78-D14 und Surek immunisiert wurden, zeigten im Vergleich den höchsten IFN- γ -Gehalt. Nach kombinierter Vakzinierung hingegen war kaum eine Verbesserung der IFN- γ -Produktion gegenüber der B78-D14-Kontrolle festzustellen. Die Bestimmung der IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand ergab ein ähnliches Bild (Abbildung 20D). Zu allen Zeitpunkten wiesen die Überstände von T-Zellen aus Mäusen, die eine kombinierte Vakzinierung erhielten – gegenüber Tieren, die mit bestrahlten B78-D14 und Surek immunisiert wurden – deutlich reduzierte IFN- γ -Konzentrationen auf.

An diesem Punkt stellte sich die Frage, wie diese Erkenntnisse mit einer Anreicherung tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung zusammenpassten (Abbildung 19). Wenn der IFN- γ -Gehalt im Kulturüberstand und die Frequenz Trp-2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen der einzelnen Tiere gegeneinander aufgetragen wurde, zeichnete sich eine negative Korrelation dieser beiden Parameter ab (Abbildung 20E), was auf eine eingeschränkte Effektorfunktion der induzierten Trp-2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hindeutet.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das zytotoxische Potenzial von T-Zellen aus immunisierten Mäusen nach einwöchiger Peptid-spezifischer Restimulation mittels Chrom[51]-Freisetzungstest bestimmt (Abbildung 21A). Während T-Zellen aus Mäusen, die mit bestrahlten B78-D14 und Surek alleine immunisiert wurden, eine deutliche Zytotoxizität gegenüber Trp-2-Peptid-beladenen syngenen DZ zeigten, waren T-Zellen aus Mäusen, die die kombinierte Vakzinierung erhielten, nur wenig funktionell (Abbildung 21B, links). Bei einem Effektor:Zielzell Verhältnis von 200:1 unterschied sich die spezifische Lyse der beiden Gruppen signifikant voneinander ($p < 0,05$). T-Zellen

aus Mäusen, die mit bestrahlten B78-D14 und HB304 alleine vakziniert wurden, besaßen ein mittelmäßiges Lysevermögen. T-Zellen aus der B78-D14-Kontrollgruppe waren nicht in der Lage, die Zielzellen zu lysieren. Unbeladene DZ wurden durch die ZTL nicht zerstört, was die Antigen-spezifität dieser Effektorzellen bestätigte (Abbildung 21B, rechts).

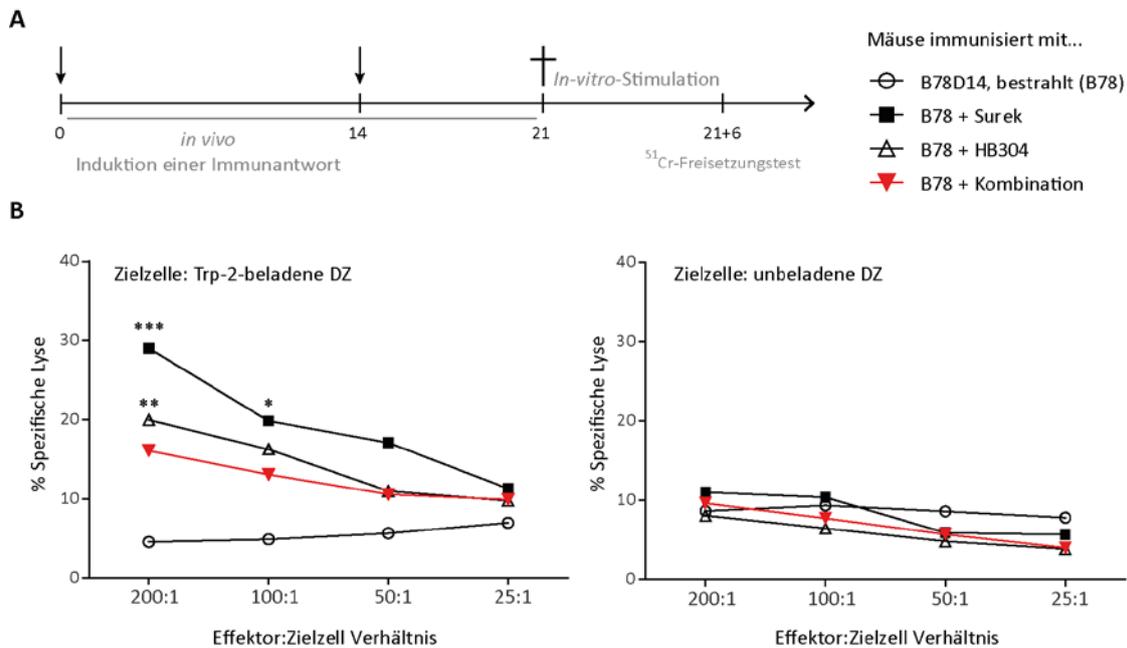


Abbildung 21: Eingeschränkte Zytotoxizität nach kombinierter Vakzinierung im B78-D14 Modell. (A) Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach Immunisierung wurden Splenozyten über 6 Tage Peptid-spezifisch restimuliert. Mittels Chrom[51]-Freisetzungstest wurde die Zytotoxizität der T-Zellen bestimmt. (B) Links, spezifische Lyse Trp-2-beladener Zielzellen durch Effektorzellen. Rechts, Kontrolle unter Verwendung unbeladener Zielzellen. Darstellung der Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n ≥ 5). Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur B78-D14-Kontrolle hin (p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***) ANOVA-Analyse).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die kombinierte Vakzinierung zu einer Anreicherung von Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führt. Allerdings weisen diese gegenüber der Vakzinierung mit B78-D14 und Surek alleine ein eingeschränktes Effektorpotenzial auf.

3.2.3.3.3 Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Tumorprotektion *in vivo*

Weiterhin wurde die Bedeutung der CD8⁺ T-Zellpopulation für die Tumorprotektion *in vivo* untersucht. Daher wurde nach Immunisierung und anschließender Tumordinokulation die Protektion mit und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen abgefragt (Abbildung 22A).

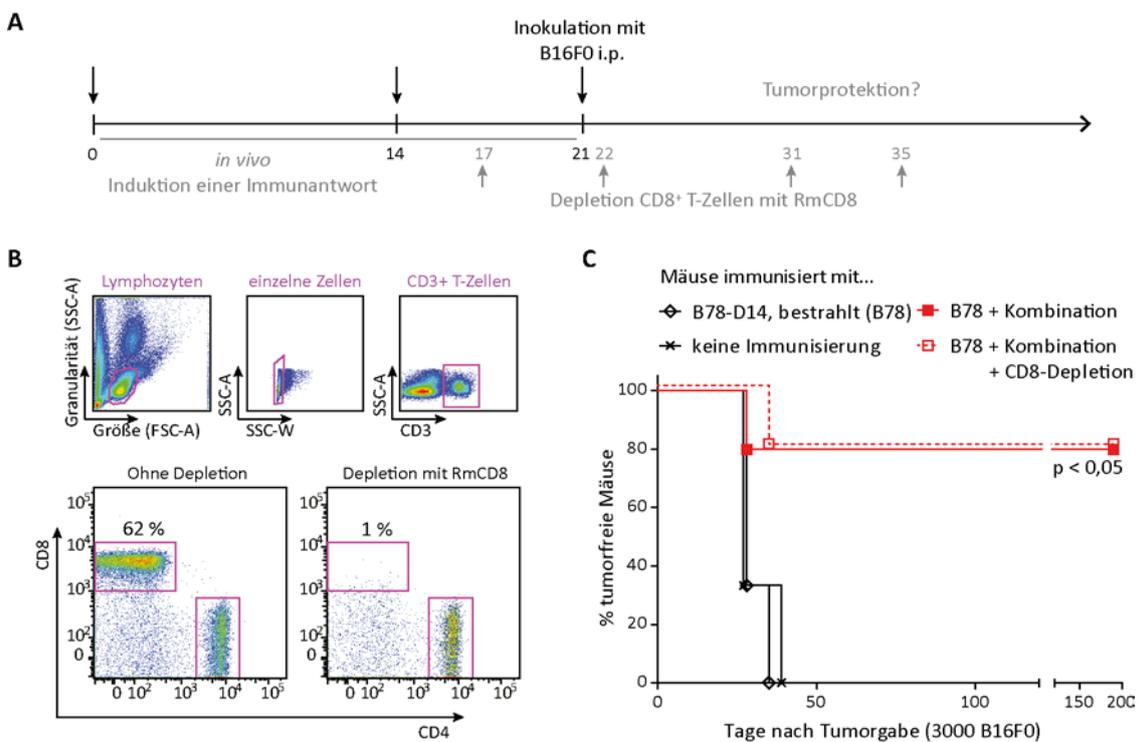


Abbildung 22: Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Tumorprotektion *in vivo*. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach *In-vivo*-Induktion einer Immunantwort werden die immunisierten Mäuse an Tag 21 mit 3000 vitalen B16F0 i.p. inokuliert und die Tumorprotektion überprüft. An den Tagen 17, 22, 31 und 35 werden CD8⁺ T-Zellen mittels RmCD8 depletiert. (B) Durchflusszytometrische Überprüfung der CD8⁺ T-Zelldepletion an Tag 18. Gating-Strategie und exemplarische Darstellung des Anteils der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut mit und ohne Depletion durch RmCD8. (C) Tumorprotektion nach kombinierter Immunisierung mit und ohne Depletion der CD8⁺ T-Zellen. Statistische Analyse durch Log-Rank-Test. Verglichen mit den Kontrollgruppen (jeweils n=3) zeigten die Mäuse nach kombinierter Vakzinierung (jeweils n=5) – unabhängig von der CD8-Depletion – ein signifikant verlängertes Überleben mit p < 0,05.

Zu definierten Zeitpunkten wurde mittels Durchflusszytometrie der Erfolg der CD8⁺ T-Zelldepletion im Blut überprüft (Abbildung 22B). Wie erwartet, war der Anteil CD8⁺ T-Zellen gegenüber undepletierten Kontrollen signifikant reduziert. Nichtsdestoweniger

waren Mäuse, die die kombinierte Vakzinierung erhielten, auch unter Depletion der CD8⁺ T-Zellen in der Lage, den Tumor effizient abzustoßen (Abbildung 22C). Das prozentuale Überleben unterschied sich nicht von der undepletierten Kombinationsgruppe.

Da auch unter CD8⁺ T-Zelldepletion eine ausgeprägte Tumormunität bestand, scheinen CD8⁺ T-Zellen keine essenzielle Funktion für die verbesserte Tumorstoßung nach kombinierter Vakzinierung zu übernehmen (siehe auch Abbildung 17). Auch lässt sich festhalten, dass die Beeinträchtigung der Effektorfunktion scheinbar keine Relevanz für die Tumorprotektion nach Immunisierung hat.

3.2.3.3.4 Induktion von CD4⁺ T-Gedächtniszellen

Die Analyse der IFN- γ -Produktion durch T-Zellen ergab, dass CD4⁺ T-Zellen diesbezüglich eine untergeordnete Rolle spielen (Abbildung 20B). Andererseits waren es die CD4⁺ T-Zellen, welche nach Behandlung mit Surek verstärkt den Transkriptionsfaktor Foxp3 sowie das koinhibitorische Molekül CTLA-4 exprimierten (Abbildung 12). Dies erforderte im Folgenden eine genaue Untersuchung der CD4⁺ T-Zellpopulation unter dem zusätzlichen Einfluss von HB304. Erneut wurde *in vivo* eine Immunantwort induziert und die Splenozyten immunisierter Mäuse *in vitro* restimuliert. Durchflusszytometrisch wurde der Phänotyp der induzierten CD4⁺ T-Zellen vor und nach *In-vitro*-Restimulation charakterisiert (Abbildung 23A). Zur Überprüfung der Gedächtnisinduktion wurde als prädiktiver Marker für die Entstehung von T-Gedächtniszellen das Adhäsionsmolekül CD44 an der Zelloberfläche angefärbt. Aufgrund der unterschiedlichen Expression des Aktivierungsmarkers CD62L konnte innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation zwischen CD44⁻ CD62L⁻ Effektoren, CD44⁺ CD62L⁻ Effektor-Gedächtnis- und CD44⁺ CD62L⁺ Zentral-Gedächtniszellen differenziert werden (Abbildung 23B).

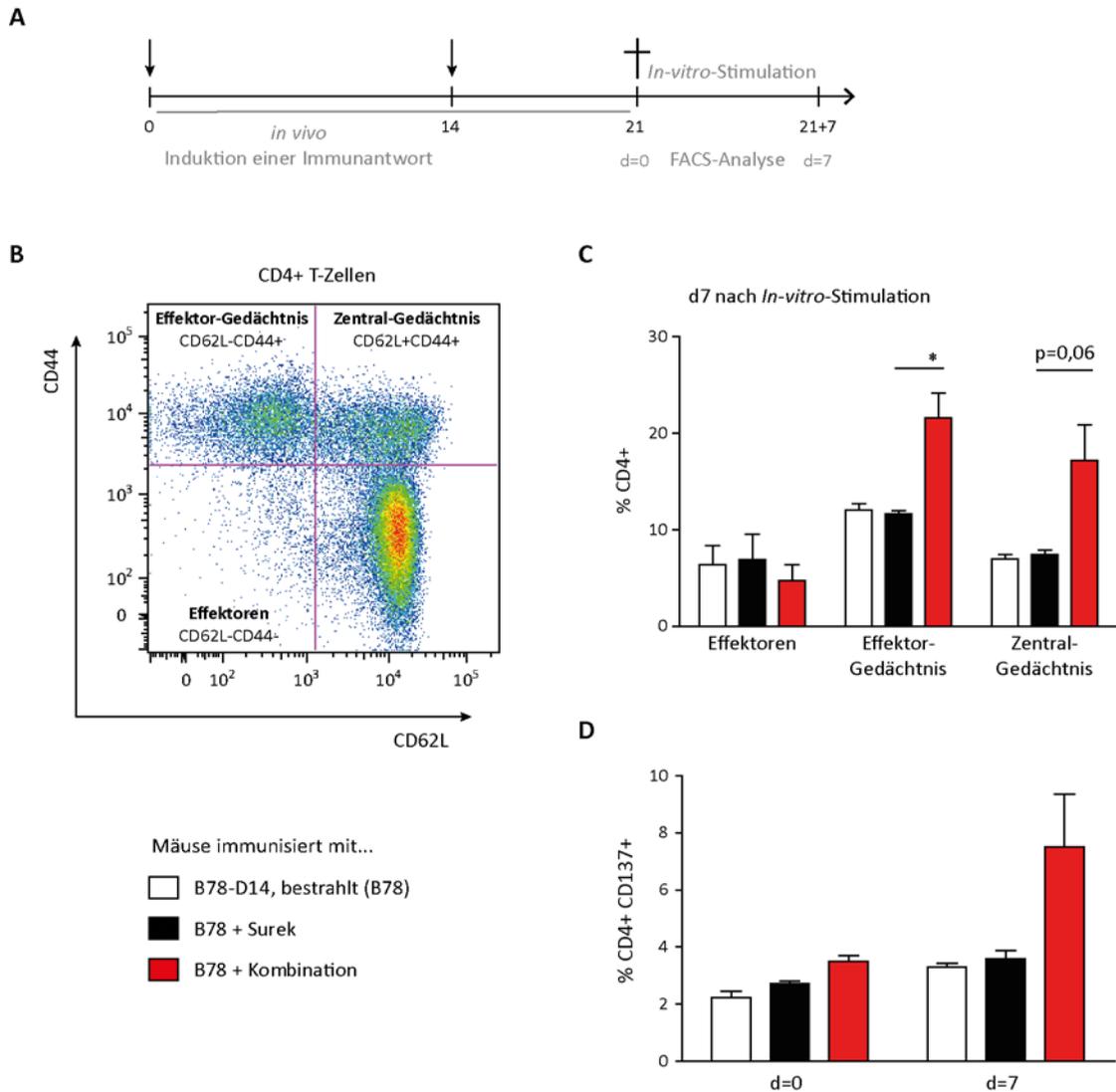


Abbildung 23: Induktion CD4⁺ Gedächtniszellen nach kombinierter Vakzinierung im B78-D14-Modell. (A) Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach Immunisierung wurden Milzen entnommen und *in vitro* Peptid-spezifisch restimuliert. Nach 7 Tagen wurden T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. (B) Repräsentative Darstellung zur Unterscheidung von Effektoren, Effektor-Gedächtnis- und Zentral-Gedächtniszellen innerhalb der CD4⁺ Zellpopulation mittels FACS-Oberflächenfärbung. (C) Quantitative Darstellung der Verteilung nach einwöchiger *In-vitro*-Restimulation. (D) Expression von CD137 auf CD4⁺ T-Zellen vor und nach *In-vitro*-Stimulation. Darstellung der Mittelwerte ± SEM (n ≥ 4). Statistische Auswertung unter Verwendung des Student's t-Test (p < 0,05 (*)).

Nach einwöchiger Peptid-spezifischer Restimulation der isolierten T-Zellen wurde nach kombinierter Vakzinierung, verglichen mit den Kontrollgruppen, eine signifikante Verschiebung in Richtung Gedächtnis-Phänotyp beobachtet (Abbildung 23C). Die Zunahme der Effektor-Gedächtnis- und Zentral-Gedächtniszellen lässt auf eine gesteigerte Gedächtnisantwort seitens der CD4⁺ T-Zellen im Kombinationsansatz schließen. Weiterhin ergab die durchflusszytometrische Analyse nach *In-vitro*-

Restimulation einen Anstieg der CD137⁺ CD4⁺ T-Zellpopulation nach kombinierter Vakzinierung (Abbildung 23D). Als kostimulatorisches Molekül wird CD137 an der Oberfläche derjenigen T-Zellen exprimiert, die bereits Antigene spezifisch über ihren TZR erkannt haben. Es handelt sich daher um einen aussagekräftigen Marker, um die Antigen-spezifität der induzierten CD4⁺ T-Zellen zu bewerten. Interessanterweise führte die Immunisierung mit bestrahlten B78-D14 und Surek allein, gegenüber der B78-D14-Kontrolle, nach *In-vitro*-Restimulation weder zum Zuwachs von CD4⁺ T-Gedächtniszellen noch zu einer gesteigerten Frequenz CD137⁺ CD4⁺ T-Zellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die verbesserte Tumorprotektion nach kombinierter Vakzinierung hauptsächlich auf eine Verstärkung des CD4⁺ T-Zell-Gedächtnisses zurückzuführen ist.

3.2.4 Evaluierung des Kombinationsansatzes im B16-EpCAM-Modell: Therapie und Vakzinierung

Um die Generalisierbarkeit der bisherigen Befunde zu überprüfen, wurde das Potenzial des kombinierten Behandlungskonzepts bestehend aus trAk und CTLA-4-Blockade auch im B16-EpCAM-Modell untersucht.

Dabei handelt es sich um ein präklinisches Mausmodell, welches zur Untersuchung des Surrogat-trAk BiLu entwickelt wurde (Ruf und Lindhofer 2001). BiLu bindet an CD3 auf murinen T-Zellen sowie an das epitheliale Oberflächenmolekül EpCAM auf Tumorzellen. Dieses TAA wird von der murinen Tumorzelllinie B16-EpCAM konstitutiv exprimiert (Dohlsten, *et al.* 1995), so dass diese als transplantierbarer Tumor in diesem Mausmodell verwendet wurde. Wie B78-D14 wurde auch B16-EpCAM vom B16-Melanom abgeleitet und besitzt C57BL/6-Hintergrund.

Um die direkte Antitumor-Wirkung der Kombinationstherapie im B16-EpCAM-Modell zu evaluieren, wurden die EpCAM-positiven Tumorzellen i.v. verabreicht und die Mäuse mit dem gegen EpCAM gerichteten trAk BiLu therapiert. Etwa 60 % der Tiere wurden auf diese Weise erfolgreich behandelt. Die zusätzliche, zeitversetzte Applikation von HB304 hatte auch in diesem Modell keinen additiven Effekt auf das Überleben der Tiere. Allerdings gelang es durch eine HB304-Erhaltungstherapie, das Therapieergebnis zu verbessern. Gegenüber den Monotherapien ergab sich ein Überlebensvorteil mit $p=0,18$ (Persönliche Mitteilung; Peter Ruf).

Für die Untersuchung der Gedächtnisantwort im B16-EpCAM-Modell wurden Mäuse, wie bereits für das B78-D14-Modell beschrieben, mit bestrahlten Tumorzellen und trAk immunisiert. Die *In-vivo*-Induktion der Immunantwort wurde unterstützt durch die zusätzliche, zeitversetzte Gabe von HB304. Nach 21 Tagen wurden Zytokinkonzentrationen im Serum immunisierter Mäuse bestimmt und Milzen zur *In-vitro*-Stimulation mit bestrahlten Tumorzellen entnommen. 24 h und 48 h später wurden Kulturüberstände auf ihren IFN- γ -Gehalt überprüft. Außerdem wurden

T-Zellen vor und nach 7-tägiger *In-vitro*-Stimulation durchflusszytometrisch charakterisiert.

Die Analyse der Zytokinkonzentrationen in den Seren immunisierter Tiere ergab dasselbe Profil wie im B78-D14-Modell (Abbildung 24). Die Immunisierung mit bestrahlten B16-EpCAM und BiLu führte also zu einem signifikanten Anstieg der Th1-Zytokine IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF sowie der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10. Die zusätzliche Applikation von HB304 während der Immunisierungsphase hatte darauf keinen Einfluss. Im Serum der Mäuse, die mit bestrahlten B16-EpCAM und HB304 alleine immunisiert wurden, konnten auch keine erhöhten Zytokinkonzentrationen festgestellt werden.

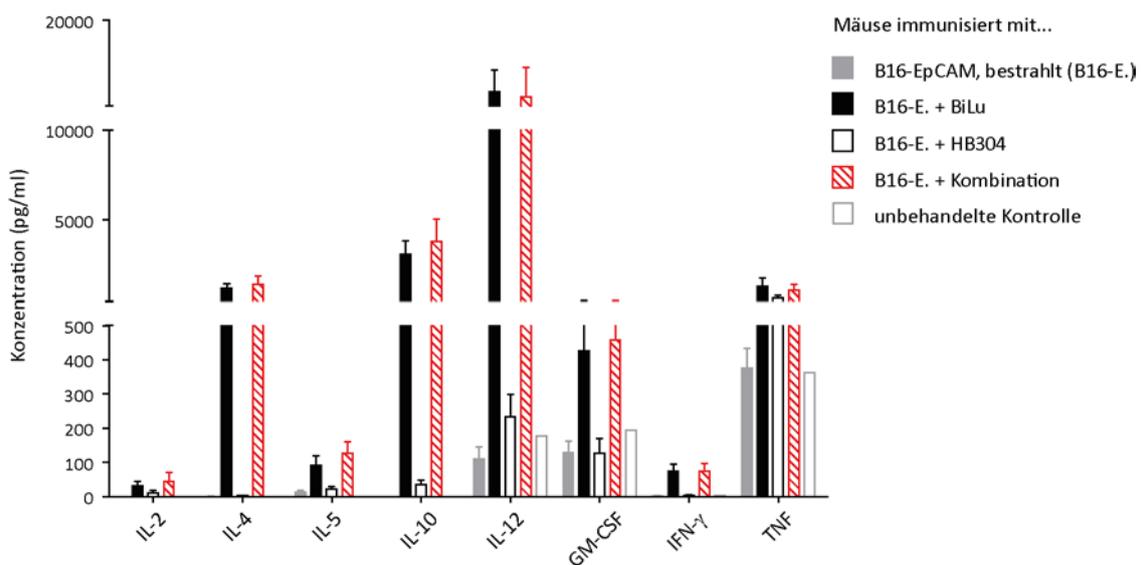


Abbildung 24: Unverändertes Zytokinprofil nach kombinierter Vakzinierung im B16-EpCAM-Modell. Nach Immunisierung werden Seren gesammelt und die Zytokinkonzentrationen mittels Bio-Plex® bestimmt. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM aus n=8 Mäuse pro Gruppe. Bei der unbehandelten Kontrolle handelt es sich um die Analyse eines Serumpools aus n=5 Mäusen.

Wiederum analog zu den Befunden im B78-D14-Modell wurde 24 h nach *In-vitro*-Stimulation in den Kulturüberständen der BiLu- sowie der Kombinationsgruppe eine beginnende IFN- γ -Ausschüttung nachgewiesen (Abbildung 25). Nach 48 h konnte ein weiterer Konzentrationsanstieg detektiert werden, der nach kombinierter

Vakzinierung jedoch wieder deutlich geringer ausfiel. Nach Immunisierung mit bestrahlten B16-EpCAM alleine \pm HB304 wurde kaum IFN- γ freigesetzt.

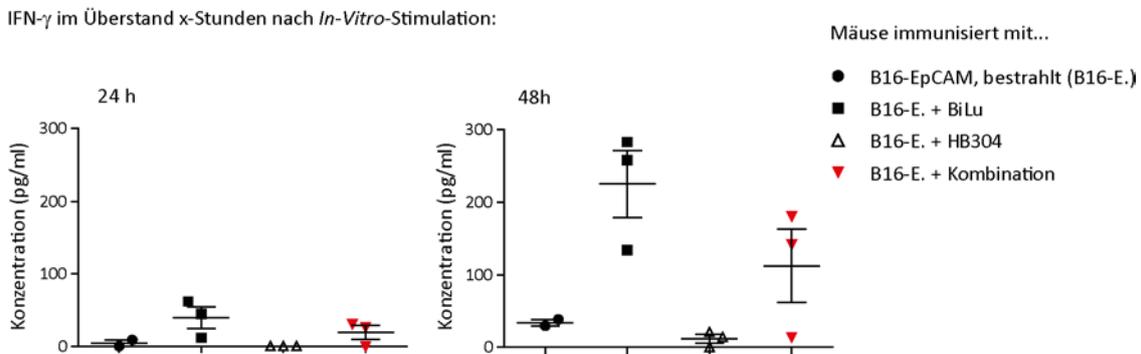


Abbildung 25: Reduktion der IFN- γ -Freisetzung nach kombinierter Vakzinierung im B16-EpCAM-Modell. Splenozyten aus immunisierten Mäusen wurden *in vitro* mit bestrahlten B16-EpCAM Zellen restimuliert. 24 h (links) und 48 h (rechts) später wurde der IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n=3); ein Symbol entspricht einer Maus.

Innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation fand nach kombinierter Vakzinierung und *In-vitro*-Restimulation, entsprechend den Beobachtungen im B78-D14-Modell, ebenfalls eine signifikante Anreicherung der Effektor-Gedächtnis- und Zentral-Gedächtniszellen statt (Abbildung 26A). Diese Verschiebung in Richtung Gedächtnis-Phänotyp konnte nach Immunisierung mit bestrahlten B16-EpCAM und Bilu alleine bzw. HB304 alleine nicht oder nur in geringem Ausmaß festgestellt werden. Weiterhin ergab die durchflusszytometrische Analyse, dass die CD4⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung und *In-vitro*-Restimulation verstärkt kostimulatorisches CD137 an ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 26B). Dies ging außerdem einher mit der gleichzeitigen Expression des Gedächtnismarkers CD44, was auf die Entstehung Antigen-spezifischer CD4⁺ Gedächtniszellen nach kombinierter Vakzinierung schließen lässt (Abbildung 26C).

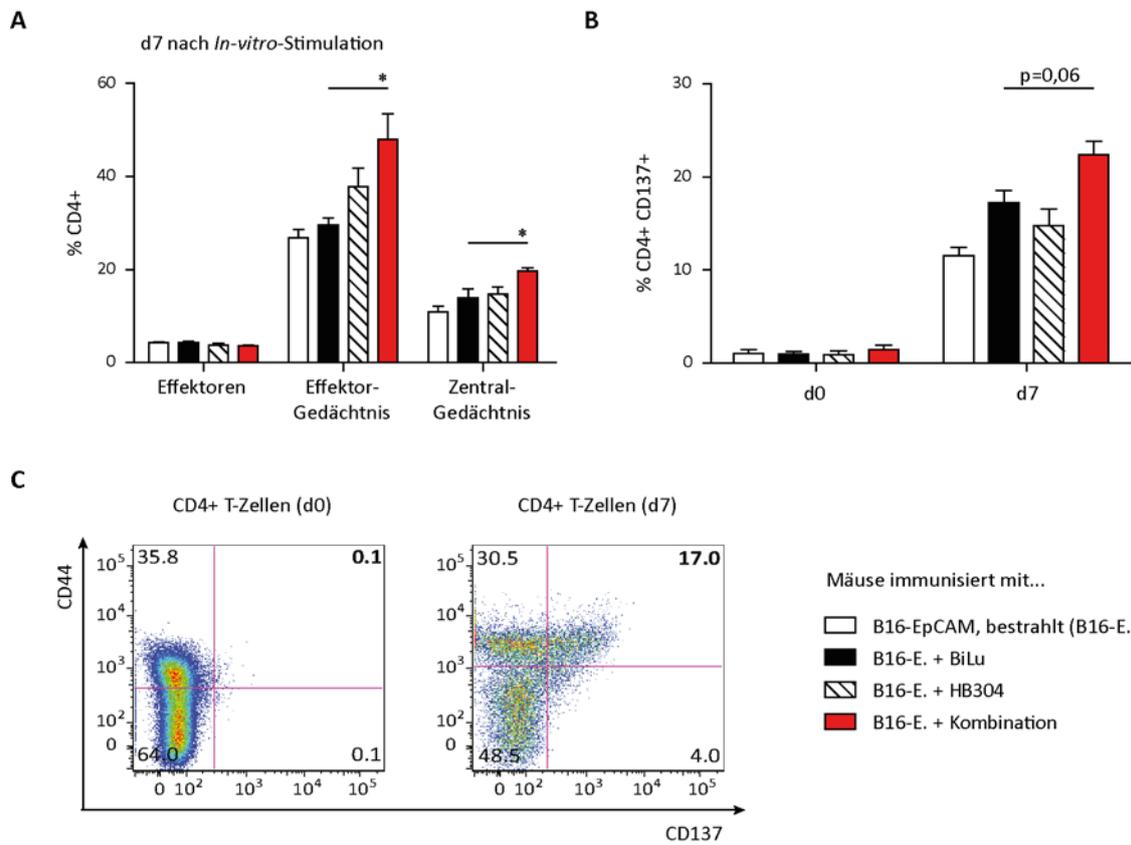


Abbildung 26: Induktion von CD4⁺ Gedächtniszellen nach kombinierter Vakzinierung im B16-EpCAM-Modell. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden Splenozyten aus immunisierten Mäusen mit bestrahlten B16-EpCAM Zellen *in vitro* restimuliert und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Anteil von Effektor-, Effektor-Gedächtnis- und Zentral-Gedächtniszellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation 1 Woche nach *In-vitro*-Restimulation. (B) Expression von CD137 auf CD4⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Organentnahme und nach einwöchiger Restimulation *in vitro*. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM (n \geq 3). Sternchen weisen auf statistisch signifikante Unterschiede nach kombinierter Vakzinierung im Vergleich zu BiLu alleine hin (p < 0,05 (*), Student's t-Test). (C) Repräsentative Darstellung der Koexpression von CD44 und CD137 auf CD4⁺ T-Zellen.

Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse aus der Untersuchung des B16-EpCAM-Modells die Beobachtungen aus dem B78-D14-Modell – die beiden Systeme verhalten sich demnach konsistent. Die Kombinationstherapie zeigte in Bezug auf die direkte Tumorabstoßung keinen bzw. nur einen geringfügigen Überlebensvorteil gegenüber der BiLu-Monotherapie. Hinsichtlich der Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses kann aufgrund vergleichbarer phänotypischer Veränderungen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation auch im B16EpCAM-Modell von einer Verstärkung des Vakzinierungseffekts *in vivo* durch zusätzliche CTLA-4-Blockade ausgegangen werden.

4 DISKUSSION

TrAk sind vielversprechende immunologische Agenzien, die großes Antitumor-Potenzial besitzen (Hess, *et al.* 2012). Im Laufe der letzten Jahre konnte durch *In-Vitro*-Analysen sowie die intensive Untersuchung präklinischer Mausmodelle ihr postulierter Wirkmechanismus weitgehend bestätigt werden (Lindhofer, *et al.* 1996; Zeidler, *et al.* 2000; Ruf, *et al.* 2012; Eissler, *et al.* 2013). TrAk sind aufgrund ihrer besonderen Struktur in der Lage, T-Zellen sowie APZ in unmittelbare Tumornähe zu dirigieren (Zeidler, *et al.* 1999). Im sogenannten Tri-Zell-Komplex werden direkt zytotoxische Mechanismen aktiviert, woraufhin die Tumorzelle effektiv getötet wird. Anschließend werden Tumordebris von professionellen APZ aufgenommen, prozessiert und in Form immunogener Antigene gegenüber T-Zellen präsentiert, so dass tumorspezifische T-Zellen entstehen und in der Folge ein langanhaltendes immunologisches Gedächtnis induziert wird (Ruf und Lindhofer 2001; Eissler, *et al.* 2012). Obwohl trAk bereits seit 2009 erfolgreich in der Klinik eingesetzt werden (Heiss, *et al.* 2010), besteht für die therapeutische Anwendung weiterhin Verbesserungspotenzial. Als potente Immunaktivatoren sind trAk häufig Auslöser des sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndroms, welches einhergeht mit grippeähnlichen Symptomen, heftigem Schüttelfrost und Fieber (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009). Zwar können diese Nebenwirkungen durch eine sukzessive Dosissteigerung und den Einsatz von Standardmedikationen kontrolliert werden (Heiss, *et al.* 2005; Kiewe, *et al.* 2006), nichtsdestoweniger besteht die Notwendigkeit, die Verträglichkeit der Behandlung zukünftig zu verbessern, um die volle Wirkkapazität nicht durch unerwünschte Ereignisse zu limitieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Strategien zu entwickeln, die die Effektivität von trAk weiter steigern sowie unerwünschte Wirkungen reduzieren. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ansätze im Mausmodell untersucht. Für die präklinische Evaluierung wurde exemplarisch der Surrogat-trAk Surek verwendet, welcher gegen GD2-exprimierende Tumorzellen und CD3 auf murinen T-Zellen gerichtet ist, sowie das

transplantierbare B78-D14-Melanom, welches von der murinen Tumorzelllinie B16F0 abgeleitet wurde und das TAA GD2 konstitutiv exprimiert (Ruf, *et al.* 2012).

4.1 Optimierung der Therapie mit trifunktionalen Antikörpern durch Modifikation der Applikationsroute

4.1.1 Therapeutische Wirksamkeit und Verträglichkeit von s.c. appliziertem Surek

Im Hinblick auf die therapeutische Optimierung von trAk wurde im Rahmen dieser Arbeit die herkömmliche i.v. Injektion mit der s.c. Applikation verglichen, welche verschiedene Vorteile bietet und zukünftig eine breitere klinische Anwendung von trAk ermöglichen könnte.

Bei der Betrachtung des pharmakokinetischen Profils war aufgefallen, dass die s.c. Applikation von Surek im Vergleich zur klassischen i.v. Injektion nicht zu Konzentrationsspitzen sondern zur Ausbildung eines sich kontinuierlich aufbauenden Plasmaspiegels führt (Abbildung 7B). Weiterhin korrelierten die Konzentrationsspitzen nach Surek i.v. mit einem sofortigen Anstieg der getesteten Th1-Zytokine IL-6, IFN- γ und TNF im Serum der behandelten Mäuse (Abbildung 10A). S.c. behandelte Tiere hingegen zeigten eine verzögerte Freisetzung dieser Zytokine ins Serum – Konzentrationsmaxima wurden erst 3 h nach Applikation des trAk festgestellt (Abbildung 10A). Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass die Aktivierung von T-Zellen sowie die Sekretion von Th1-Zytokinen, besonders IFN- γ , essenziell für die Induktion einer effektiven und langanhaltenden Immunantwort sind (Egeter, *et al.* 2000; Eissler, *et al.* 2012). Auf der anderen Seite wird eine überschießende Zytokinfreisetzung auch für das Auftreten von Nebenwirkungen beim Einsatz von immunaktivierenden Therapeutika verantwortlich gemacht (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009; Teachey, *et al.* 2013). Obwohl die Bioverfügbarkeit von Surek nach s.c. Gabe 50 % geringer war als nach i.v. Injektion (Abbildung 7A), scheinen die

T-Zellen ausreichend aktiviert worden zu sein (Abbildung 3), um ihre Antitumor-Wirkung zu entfalten (Abbildung 4). Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69, die T-Zell-Proliferation sowie die Produktion von IFN- γ bleiben offensichtlich unbeeinflusst von der Applikationsroute (Abbildung 3). Dennoch zeichnete sich bei der Gewichtskontrolle nach Behandlung eine bessere systemische Verträglichkeit der s.c. trAk-Therapie gegenüber der herkömmlichen i.v. Gabe ab (Abbildung 6). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das „flache“ pharmakokinetische Profil nach Surek s.c. liefern (Abbildung 7) – infolge fehlender Konzentrationsspitzen findet eine verzögerte und zumeist reduzierte Zytokinfreisetzung statt (Abbildung 10A).

Trotz eines verbesserten systemischen Nebenwirkungsprofils könnte die s.c. Applikation von trAk auch aus verschiedenen Gründen limitiert sein. Aufgrund des starken immunaktivierenden Potenzials von trAk ist es denkbar, dass die s.c. Applikation eine heftige Entzündungsreaktion im Bereich der Einstichstelle hervorruft. Nach s.c. Gabe von Surek fanden sich zwar weder makroskopisch noch immunhistochemisch Hinweise für eine trAk-bedingte Entzündung der Haut (Abbildung 5), dennoch kann das Auftreten einer lokalen Entzündungsreaktion aufgrund dieser Beobachtung nicht allgemein ausgeschlossen werden. Vielmehr ist die Hautreaktion mit hoher Wahrscheinlichkeit abhängig vom Expressionsmuster des Zielantigens, gegen das der applizierte trAk – neben CD3 – gerichtet ist. Das Gangliosid GD2 wird vorwiegend auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs exprimiert, während es auf gesundem Gewebe nur in geringem Maß nachzuweisen ist (Zhang, *et al.* 1997; Navid, *et al.* 2010), was die gute lokale Verträglichkeit von Surek vermutlich erklärt. Ein anderes Bild könnte eventuell nach s.c. Applikation des trAk Catumaxomab entstehen, welcher – neben T-Zellen – das weit verbreitete TAA EpCAM erkennt (Momburg, *et al.* 1987; Armstrong und Eck 2003; Seimetz, *et al.* 2010). Für die klinische Anwendung muss die lokale Verträglichkeit von trAk daher im Einzelfall überprüft werden.

Einen weiteren therapielimitierenden Faktor könnte die Induktion von neutralisierenden Anti-Antikörpern nach s.c. Applikation von trAk darstellen (Ternant und Paintaud 2005). Es ist bereits beschrieben, dass trAk aufgrund ihres Aufbaus,

bestehend aus einem Maus- und einem Ratten-Halbantikörper, zur Entstehung von Anti-Antikörpern führen (Kiewe, *et al.* 2006; Heiss, *et al.* 2010; Ott, *et al.* 2012). Da es in der Haut eine Vielzahl professioneller APZ, sogenannte Langerhans-Zellen, gibt, welche in der Lage sind, s.c. applizierte trAk zu phagozytieren, zu prozessieren und die trAk-Epitope anschließend gegenüber dem Immunsystem zu präsentieren, war davon auszugehen, dass die s.c. Therapie die Induktion von Anti-Antikörpern zusätzlich fördert. Beim Vergleich mit den erreichten MAMA- und MARA-Titern nach klassischer i.v. Injektion wurden nach s.c. Applikation von Surek jedoch keine erhöhten Anti-Antikörper-Titer festgestellt (Abbildung 9).

Nach mehreren Behandlungszyklen können induzierte Anti-Antikörper den therapeutischen Effekt von trAk negativ beeinflussen. Auch ist es theoretisch möglich, dass sich Aggregate bilden, welche in der Folge schwerwiegende Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine Embolie, verursachen könnten. In der Klinik wurden derartige Komplikationen bisher noch nicht beobachtet; allerdings könnte dies auch damit zusammenhängen, dass trAk in sehr geringen Mengen verabreicht werden und bereits in einem Konzentrationsbereich von ng/ml wirksam sind (Kiewe, *et al.* 2006; Ruf, *et al.* 2007). Die Ergebnisse der präklinischen Untersuchung legen dahingegen nahe, dass bei Wahl der geeigneten Applikationsroute wesentlich höhere trAk-Dosen verabreicht werden könnten. Denn trotz identischer Anti-Antikörper-Titer zeigten s.c. behandelte Tiere, im Gegensatz zu i.v. therapierten Mäusen, keine Anzeichen einer durch die Immunogenität von Surek verursachten Unverträglichkeit. Eine Erklärung hierfür liefert erneut das unterschiedliche pharmakokinetische Profil der beiden Applikationsformen (Abbildung 7). Unmittelbar nach i.v. Injektion von Surek wurde eine sehr hohe Plasmakonzentration erreicht; eine große Menge trAk steht somit zur Verfügung, um mit Anti-Antikörpern zu aggregieren, welche bereits durch eine vorausgehende Behandlung induziert wurden und noch im Blut zirkulieren. Nach s.c. Applikation von Surek hingegen bildet sich keine Konzentrationsspitze aus. Aufgrund der insgesamt geringeren Plasmakonzentration entstehen somit – trotz identischer Anti-Antikörper-Titer – weniger unerwünschte Aggregate. Erneut zeigt sich die s.c. Applikation von trAk als verträglichere Alternative zur i.v. Injektion und eröffnet zukünftig die Möglichkeit,

auch nach mehreren Behandlungszyklen höhere Antikörpermengen zu verabreichen und so den Therapieerfolg auszuweiten. In der Tat war im untersuchten präklinischen Modell eine dritte s.c. Gabe von Surek möglich und führte zu einem verbesserten Gesamtüberleben der Mäuse (Abbildung 4), während eine dritte i.v. Injektion schwerwiegende Nebenwirkungen auslöste, deren Symptomatik am wahrscheinlichsten auf eine durch die Aggregation von Surek und Anti-Antikörpern bedingte Embolie schließen lässt. Die i.v. behandelten Tiere mussten daraufhin eingeschläfert werden.

Das Th2-Zytokin IL-10 ist bekannt dafür, dass es immunregulierende Signale vermittelt und eine Th1-gerichtete Antitumor-Antwort unterdrückt (O' Garra und Vieira 2007; Naujoks, *et al.* 2014). Interessanterweise wurde bei der Analyse des Zytokinprofils festgestellt, dass das Serum i.v. behandelter Mäuse, im Vergleich zu s.c. therapierten Tieren, höhere IL-10 Konzentrationen aufweist (Abbildung 10B). Mithilfe einer weiteren durchflusszytometrischen Untersuchung konnte geklärt werden, dass vermutlich $CD8^+$ T-Zellen für diesen Unterschied verantwortlich zeichnen (Abbildung 10C), denn nach i.v. Injektion war die Frequenz $CD8^+$ IL-10⁺ T-Zellen höher als in der Vergleichsgruppe. Weiterhin exprimierten $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen nach s.c. Applikation von Surek signifikant weniger CTLA-4 (Abbildung 11A und B), welches ebenfalls als negatives Regulatormolekül im Rahmen der T-Zellaktivierung fungiert (Walunas, *et al.* 1994; Krummel und Allison 1995). Ergänzend kommt hinzu, dass s.c. verabreichter Surek offenbar weniger Treg induziert als i.v. injizierter trAk (Abbildung 11C). All diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass nach s.c. Applikation von trAk weniger gegenregulatorische Mechanismen in Gang gesetzt werden, so dass die Immunaktivierung anhält und der Tumor, trotz geringerer Bioverfügbarkeit des trAk (Abbildung 7A), erfolgreich abgestoßen werden kann (Abbildung 4). Unterstützt wird dieser Prozess möglicherweise auch durch eine kontinuierliche Freisetzung von trAk aus einem s.c. Wirkstoffdepot (Abbildung 8).

4.1.2 Auswirkungen auf den klinischen Einsatz von trifunktionalen Antikörpern

Die präklinische Evaluierung verschiedener Applikationsrouten hatte gezeigt, dass s.c. verabreichter Surek gegenüber i.v. injiziertem trAk eine vergleichbare Wirksamkeit erreicht (Abbildung 4), während das Nebenwirkungsprofil nach s.c. Applikation sogar Verbesserungen im Vergleich zur herkömmlichen Applikationsform verspricht (Abbildung 6). Da sowohl therapeutische Wirksamkeit als auch Verträglichkeit der s.c. trAk-Behandlung im Mausmodell nachgewiesen werden konnten, bietet es sich an, die gewonnen Erkenntnisse auch auf das humane System zu übertragen. Hier könnte eine s.c. Formulierung ganz neue Behandlungsperspektiven eröffnen und die Therapie mit trAk erheblich vereinfachen.

Einige therapeutische monoklonale Antikörper, wie Rituximab (Davies, *et al.* 2014), Trastuzumab (Hamizi, *et al.* 2013) oder der gegen CD52-gerichtete Alemtuzumab (Lundin, *et al.* 2002) werden bereits erfolgreich s.c. appliziert. Aus klinischen Studien geht die s.c. Applikation – im Vergleich zur herkömmlichen i.v. Injektion – als gut verträgliche Behandlungsalternative hervor, die eine ambulante Therapie ermöglicht (EMA Committee for Proprietary Medicinal Products 2002; Leveque 2014). Auf diese Weise steigt die Patientenzufriedenheit, wodurch auch Therapietreue sowie Lebensqualität positiv beeinflusst werden. Auch wird im Zusammenhang mit der s.c. Applikation von therapeutischen Antikörpern eine erhebliche Kostenreduktion für das Gesundheitswesen diskutiert (Launay-Vacher 2013; Leveque 2014).

Für bispezifische Antikörperformate wurde eine s.c. Applikation bisher nicht beschrieben. Im Gegenteil ist die Behandlung mit bispezifischen Konstrukten in der Regel mit zeitintensiven, aufwändigen Applikationschemata verbunden. Beispielsweise muss der erst kürzlich zugelassene Blinatumomab aufgrund seines geringen Molekulargewichts mittels mehrwöchiger Dauerinfusion appliziert werden, um ausreichende Wirkspiegel zu generieren (Topp, *et al.* 2015). Wie in dieser Arbeit anhand der trAk gezeigt stellt die s.c. Darreichung auch für bispezifische Antikörperkonstrukte eine vielversprechende Alternative zu bisherigen

Applikationsschemata dar. An die Stelle einer mehrstündigen i.v. Infusion würde dann eine nur wenige Minuten in Anspruch nehmende s.c. Applikation treten; so dauert die s.c. Applikation von 600 mg Trastuzumab nur noch etwa 5 Minuten, während sich die herkömmliche i.v. Injektion auf 30 bis 90 Minuten erstreckte (Hamizi, *et al.* 2013). Durch den Zusatz von Hyaluronidase zur Antikörperlösung bereitet auch die s.c. Applikation großer Volumina keine Schwierigkeit mehr. Die Hyaluronidase katalysiert vorübergehend den Abbau der extrazellulären Matrix, so dass Absorption und Verteilung der Antikörperlösung erleichtert werden und große Volumina in kurzer Zeit appliziert werden können (Hamizi, *et al.* 2013; Launay-Vacher 2013).

4.2 Differenzieller Effekt einer Kombinationsbehandlung aus trifunktionalen Antikörpern und CTLA-4-Blockade auf Tumorelimination und Gedächtnisinduktion

Der Vergleich der beiden Applikationsformen hatte unter anderem gezeigt, dass Surek neben immunaktivierenden auch gegenregulatorische Mechanismen vermittelt (Abbildung 10B und C, Abbildung 11). Um das volle Wirkpotenzial von trAk auszuschöpfen, erschien es daher sinnvoll, diese immunregulatorischen Vorgänge genauer zu untersuchen und daraus zusätzliche Angriffspunkte im Sinne einer Therapieoptimierung abzuleiten.

Nach Behandlung mit Surek konnte eine zeitversetzte Induktion von Treg beobachtet werden, welche proliferieren und das negative Regulatormolekül CTLA-4 exprimieren (Abbildung 12). Es ist allgemein akzeptiert, dass immunsuppressive Treg an der Immunevasion des Tumors beteiligt sind (Liu, *et al.* 2007; Nishikawa und Sakaguchi 2010; Oleinika, *et al.* 2013). Neben T-Effektorzellen hemmen sie auch die Funktion der NK-Zellen und tragen auf diese Weise zur Immuntoleranz des Tumors bei (Ralainirina, *et al.* 2007; Kerdiles, *et al.* 2013). Ferner konnte bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eine erhöhte Frequenz von Treg nachgewiesen werden, welche häufig mit einer schlechten Prognose korreliert (Liyanage, *et al.* 2002; Wolf, *et al.* 2005; Ling, *et al.* 2007; Oleinika, *et al.* 2013). Um den Einfluss dieser immunsuppressiven T-Zellpopulation auf das Tumorstadium *in vivo* zu untersuchen, wurde das DREG-Mausmodell verwendet. In diesen Mäusen können Foxp3⁺ Treg mittels Applikation von DT gezielt depletiert werden (Lahl und Sparwasser 2011). Für verschiedene Tumoren wurde bereits ein verringertes Tumorstadium nach Treg-Depletion bestätigt (Klages, *et al.* 2010; Teng, *et al.* 2010; Mattarollo, *et al.* 2013; Pastille, *et al.* 2014). In der Tat beeinflussen Treg auch das Wachstum von B78-D14 *in vivo*; so waren 50 % der Treg-depletierten DREG-Mäuse in der Lage, das transplantierte Melanom ohne weitere Therapie abzustößen (Abbildung 13). Treg übernehmen also eine essenzielle gegenregulatorische Funktion im untersuchten Tumormodell. Wie bereits erwähnt, konnte für die angereicherten Treg auch die

Expression von CTLA-4 nachgewiesen werden (Abbildung 12D). Eine hohe Expression koinhibierender Rezeptoren, wie CTLA-4 oder PD-1, wurde für Treg bereits beschrieben und verstärkt offenbar deren suppressive Kapazität (Wing, *et al.* 2008; Sakaguchi, *et al.* 2009; Francisco, *et al.* 2010). Durch Einsatz eines CTLA-4-blockierenden Antikörpers könnten die immunsuppressiven Effekte CTLA-4 exprimierender Treg zukünftig zumindest teilweise gehemmt werden (Byrne, *et al.* 2011; Lindau, *et al.* 2013), was die Möglichkeit eröffnet, die therapeutische Wirksamkeit von trAk weiter auszubauen (Abbildung 14).

Die zusätzliche Blockade des CTLA-4-Signalwegs stellt ein erfolgversprechendes therapeutisches Ziel dar. Seit 2011 ist der monoklonale Anti-CTLA-4-Antikörper Ipilimumab aufgrund einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens (10,1 versus 6,4 Monate) zur Therapie des vorbehandelten, fortgeschrittenen (nicht-resezierbaren oder metastasierten) Melanoms bei Erwachsenen zugelassen (Hodi, *et al.* 2010). 2013 folgte dann die Zulassungserweiterung als Erstlinien-Therapeutikum, was das Potenzial dieses immunonkologischen Ansatzes unterstreicht (Margolin, *et al.* 2013; Patt, *et al.* 2013), obwohl der genaue Wirkmechanismus trotz intensiver Forschung nach wie vor Fragen aufwirft.

Bisher ist postuliert, dass die Antikörper-vermittelte Blockade von CTLA-4 zur Unterbrechung des negativen T-Zell-Signalwegs führt, so dass die T-Effektorzelle in einen aktivierten Zustand zurückversetzt wird (Weber 2009). Infolgedessen wird die T-Zell-vermittelte Immunität gegenüber dem Tumor potenziert und eine wirksame Antitumor-Antwort aufgebaut (Peggs, *et al.* 2006; Robert und Ghiringhelli 2009). Im Mausmodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Antitumor-Wirkung CTLA-4-blockierender Antikörper nicht nur durch eine Reaktivierung von T-Effektorzellen bedingt ist, sondern auch von der gleichzeitigen Inhibierung der Treg-Population abhängt (Peggs, *et al.* 2009). Auch wurde in diesem Zusammenhang eine Fc γ R-vermittelte, selektive Depletion von Treg im Tumorgewebe beschrieben, woraus eine Verbesserung des T-Effektorzellen/Treg-Verhältnisses resultiert (Simpson, *et al.* 2013). Allen Anstrengungen zum Trotz konnte bisher jedoch noch kein zuverlässiger

Biomarker identifiziert werden, der das klinische Ansprechen auf eine Anti-CTLA-4-Therapie vorhersagt (Grosso und Jure-Kunkel 2013). Nichtsdestoweniger wird aufgrund des klinischen Erfolgs dieses sogenannten Kontrollpunkt-Inhibitors die weitere Entwicklung entschieden vorangetrieben; momentan zeichnet sich ab, dass eine einzelne Immuntherapie wohl nicht ausreicht, um eine optimale Wirksamkeit zu erzielen, weshalb sich immer mehr Kombinationsansätze in der klinischen Prüfphase befinden (Maio, *et al.* 2013; Callahan, *et al.* 2014). Durch den Einsatz unterschiedlicher, sich ergänzender Substanzen hofft man, synergistische Wirkmechanismen zu aktivieren und den therapeutischen Effekt weiter zu verbessern (Melero, *et al.* 2013).

4.2.1 Einfluss der CTLA-4-Blockade auf die Therapie mit trifunktionalen Antikörpern

Wirkmechanismus-bedingt treten sowohl beim Einsatz von trAk als auch von Anti-CTLA-4-Antikörpern immunvermittelte Nebenwirkungen auf (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009; Hodi, *et al.* 2010). Diese sind, zeitnah und leitlinienkonform behandelt, zwar beherrschbar, können jedoch auch lebensbedrohliches Ausmaß annehmen (Weber 2007; Wolchok, *et al.* 2010). Für die präklinische Evaluierung einer potenziellen Kombinationstherapie war es daher unerlässlich, das Auftreten behandlungsbedingter Toxizitäten zu überprüfen. Im Mausmodell zeigte die Kombination aus Surek und dem CTLA-4-blockierenden Antikörper HB304 eine akzeptable Verträglichkeit, führte jedoch bei zeitgleicher Applikation zu histopathologischen Veränderungen der Milz (Abbildung 15). Aufgrund dessen und in Anbetracht der Tatsache, dass die Hochregulation von CTLA-4 nach Surek-Behandlung verzögert stattfindet (Abbildung 12D), wurde für die präklinische Evaluierung des Kombinationskonzeptes eine zeitversetzte Behandlung mit den beiden immunaktivierenden Agenzien angestrebt.

Bei der Überprüfung des direkten Antitumor-Potenzials *in vivo* zeigte die Kombinationstherapie gegenüber der Surek-Monotherapie keinen Überlebensvorteil

(Abbildung 16). Allerdings war auch der direkte therapeutische Effekt der HB304-Monotherapie im untersuchten B78-D14-Modell nur geringfügig ausgeprägt (Abbildung 16). Das verwendete B16-Tumormodell gilt als schwach immunogen (Dranoff, *et al.* 1993; Hung, *et al.* 1998; van Elsas, *et al.* 1999); diese Eigenschaft wird möglicherweise durch die Expression des TAA GD2 zusätzlich verstärkt, da dieses als immunsuppressiv beschrieben wurde (Potapenko, *et al.* 2007). Für die Therapie mit CTLA-4-blockierenden Antikörpern wurde jedoch berichtet, dass nur bereits vorhandene, gegen den Tumor gerichtete Immunantworten verstärkt werden können, weshalb ihre Antitumor-Wirkung bisher auch nur in besonders immunogenen Tumormodellen (Leach, *et al.* 1996; Kwon, *et al.* 1997) oder in Kombination mit verschiedenen Impfstrategien (van Elsas, *et al.* 1999; Sundstedt, *et al.* 2012) bestätigt werden konnte.

4.2.2 Einfluss der CTLA-4-Blockade auf die Vakzinierung mit trifunktionalen Antikörpern

Aufgrund ihrer einzigartigen Struktur verknüpfen trAk die klassische Antikörpertherapie mit einer *In-Situ*-Immunisierung (Ruf und Lindhofer 2001; Ströhlein, *et al.* 2009; Eissler, *et al.* 2012). Entsprechend der oben genannten Hypothese konnte durch eine zusätzliche Antikörper-vermittelte Blockade von CTLA-4 der Vakzinierungseffekt von Surek alleine positiv verstärkt werden (Abbildung 17). Infolge einer Blockade des inhibierenden T-Zell-Oberflächenmoleküls ist offenbar eine zelluläre Mikroumgebung im Tumorgewebe generiert worden, die die Induktion einer protektiven tumorspezifischen T-Zell-Antwort zusätzlich stimuliert und so eine langanhaltende Immunantwort hervorruft. Nach kombinierter Vakzinierung waren die Mäuse in der Lage, eine letale Dosis des murinen Melanoms B16F0 abzustößen, welches das TAA GD2 nicht exprimiert (Abbildung 17). Dies spricht für die Entstehung einer polyvalenten Immunantwort, welche eine dauerhafte Kontrolle des Tumorwachstums ermöglicht, da auch entartete Zellen erkannt werden können, die

das TAA beispielsweise aufgrund weiterer Mutationen verloren haben (Kronenberger, *et al.* 2002; Kronenberger, *et al.* 2008).

Um den potenziellen Wirkmechanismus besser zu verstehen, wurde das Zytokinprofil im Serum nach Vakzinierung untersucht (Abbildung 18), da dieses eine Schlüsselrolle beim Aufbau einer effektiven Antitumor-Immunantwort spielt (Egeter, *et al.* 2000; Lüking, *et al.* 2008). Die Analyse ergab erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ und TNF, was für eine Th1-Ausrichtung der Immunantwort spricht. Auf der anderen Seite konnten auch die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 nachgewiesen werden. Diese sind unabdinglich für eine effiziente Th1-Antwort (Schüler, *et al.* 1999; Lüking, *et al.* 2008) und gleichzeitig notwendig für die Selbstlimitierung der Immunreaktion (O' Garra und Vieira 2007). Durch den zusätzlichen Einsatz von HB304 zeichneten sich zum untersuchten Zeitpunkt allerdings keine Unterschiede in der Ausrichtung des Zytokinprofils gegenüber Surek alleine ab (Abbildung 18). Dennoch konnte auf zellulärer Ebene eine Verschiebung der Immunantwort nach kombinierter Vakzinierung beobachtet werden (Abbildung 19 bis Abbildung 23).

Nach kombinierter Vakzinierung und anschließender *In-vitro*-Stimulation wurde eine sukzessive Anreicherung Peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen beobachtet (Abbildung 19), was auf Stimulation der tumorspezifischen T-Zell-Antwort hindeutet. Eine Verstärkung der tumorspezifischen T-Zell-Aktivität konnte auch im Blut von Patienten nach Anti-CTLA-4-Behandlung nachgewiesen werden (Kvistborg, *et al.* 2014); so geht aus den Untersuchungen von Kvistborg *et al.* hervor, dass Ipilimumab die Entstehung neuer tumorspezifischer T-Zell-Reaktivitäten fördert. Ein Zusammenhang mit der klinischen Ansprechrate konnte jedoch nicht hergestellt werden. Demgegenüber wurde nach kombinierter Vakzinierung und *In-vitro*-Stimulation eine eingeschränkte Funktionalität der CD8⁺ ZTL festgestellt, was sich in einer reduzierten IFN- γ -Produktion (Abbildung 20) sowie einem limitierten Lysevermögen äußerte (Abbildung 21). Diese Beobachtung lässt sich eventuell auf eine Überstimulation der CD8⁺ T-Zellen zurückführen, die in Folge der Kombinationsbehandlung anerg werden (Deeths, *et al.* 1999). Die spezifische Depletion der CD8⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung zeigte allerdings auch,

dass diese T-Zellpopulation anscheinend nicht essenziell für die Tumorprotektion *in vivo* ist; trotz fehlender CD8⁺ T-Zellen waren kombiniert vakzinierter Mäuse in der Lage, eine letale Tumordosis abzustoßen (Abbildung 22).

Infolgedessen wurde die Rolle der CD4⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung und *In-vitro*-Stimulation genauer untersucht (Abbildung 23). Durch den zusätzlichen Einsatz des CTLA-4-blockierenden Antikörpers HB304 konnte im untersuchten Modell eine Beeinflussung der CD4⁺ T-Zellpopulation beobachtet werden. Die Zunahme der CD62L⁻ CD44⁺ Effektor- und der CD62L⁺ CD44⁺ Zentral-Gedächtnis-T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung deutet höchstwahrscheinlich auf eine Verstärkung der Gedächtnisinduktion auf Seiten der CD4⁺ T-Zellen hin (Abbildung 23B und C). Gleichzeitig konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte Frequenz von CD4⁺ CD137⁺ T-Zellen festgestellt werden, was die Antigenspezifität dieser T-Zellen anzeigt (Abbildung 23D) und zu der Annahme führt, dass die verbesserte Tumorprotektion nach kombinierter Vakzinierung durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird. Es ist allgemein bekannt, dass CD4⁺ Th-Zellen die vollständige Aktivierung von ZTL fördern und deren Effektorfunktion unterstützen; daneben sind CD4⁺ Th-Zellen jedoch auch direkt an der Tumorabstoßung nach Vakzinierung beteiligt (Dranoff, *et al.* 1993; Hung, *et al.* 1998). Durch die Produktion von Th1-Zytokinen – besonders IFN- γ – sowie Th2-Zytokinen rekrutieren und aktivieren sie weitere Immuneffektorzellen, wie beispielsweise Eosinophile, NK-Zellen und proinflammatorische Makrophagen, die sodann eine ZTL-unabhängige Tumorzerstörung nach Vakzinierung vermitteln (Levitsky, *et al.* 1994; Hung, *et al.* 1998; Egeter, *et al.* 2000). Diese Hypothese muss jedoch noch durch gezielte Depletion der CD4⁺ T-Zellen nach kombinierter Vakzinierung *in vivo* überprüft werden.

In einem zweiten Maus-Melanommodell, dem B16-EpCAM-Modell, wurde nach kombinierter Vakzinierung ebenfalls ein Th1/Th2 Zytokinprofil beobachtet (Abbildung 24). Außerdem konnte nach kombinierter Vakzinierung die Verschiebung der Immunantwort auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Während die IFN- γ -Freisetzung in den Kulturüberständen reduziert war (Abbildung 25), wurde auf Seiten der CD4⁺

T-Zellen ein Anstieg der Gedächtniszellen festgestellt (Abbildung 26A). Ferner konnte eine erhöhte Frequenz von CD4⁺ CD137⁺ T-Zellen detektiert werden, die mit der Expression des Gedächtnismarkers CD44 assoziiert war (Abbildung 26B und C). Diese Ergebnisse entsprechen den bisherigen, im B78-D14-Modell gewonnen Erkenntnissen und unterstreichen daher deren Validität.

4.2.3 Bedeutung der präklinischen Untersuchungen für die Anwendung in der Klinik

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand scheint die zusätzliche Gabe eines CTLA-4-blockierenden Antikörpers im Rahmen einer Behandlung mit trAk keinen synergistischen Effekt auf die direkte Tumorabstoßung zu vermitteln (Abbildung 16). Allerdings zeichnet sich *in vivo* eine Verbesserung der Gedächtnisinduktion ab (Abbildung 17), die vermutlich durch den Anstieg der CD4⁺ T-Gedächtniszellen bedingt ist (Abbildung 23 und Abbildung 26). Verschiedene Arbeiten zur Untersuchung der Wirkungsweise von Anti-CTLA-4-Antikörpern beschreiben ein ähnliches Bild. So wurde nach Behandlung mit Ipilimumab eine erhöhte Frequenz von ICOS⁺ (*Inducible Costimulator*) T-Zellen im Tumorgewebe sowie im Patientenblut festgestellt (Liakou, *et al.* 2008); dabei handelt es sich um ein T-Zell-spezifisches Molekül, welches ebenfalls im Rahmen der T-Zell-Aktivierung hochreguliert wird und anscheinend an der Verstärkung der Immunantwort sowie Gedächtnisinduktion beteiligt ist (Hutloff, *et al.* 1999; Fan, *et al.* 2014). Die weitere Analyse ergab, dass es sich bei den ICOS⁺ T-Zellen hauptsächlich um tumorspezifische, IFN- γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen handelt (Liakou, *et al.* 2008). Retrospektiv konnte außerdem gezeigt werden, dass das Auftreten von CD4⁺ ICOS⁺ T-Zellen nach Behandlung mit Ipilimumab mit einem verbesserten Patientenüberleben korrelierte (Carthon, *et al.* 2010).

Klinische Studien belegen das Antitumor-Potenzial der Anti-CTLA-4-Monotherapie (Hodi, *et al.* 2010; Prieto, *et al.* 2012); allerdings sind die Ansprechraten nach wie vor relativ gering. Damit in Zukunft ein größeres Patientenkollektiv von der Behandlung

profitiert, versucht man durch Kombinationsansätze den therapeutischen Erfolg auszuweiten (Maio, *et al.* 2013; Callahan, *et al.* 2014). Für den klinischen Einsatz verspricht die Kombination von trAk mit einem CTLA-4-blockierenden Antikörper eine Verbesserung des Vakzinierungseffekts durch positive Verstärkung der langanhaltenden tumorspezifischen Immunantwort, so dass eine dauerhafte Kontrolle des Tumorwachstums durch das Immunsystem gewährleistet wird.

4.3 Ausblick

Seit der Zulassung von Catumaxomab (Anti-CD3 x Anti-EpCAM) im Jahr 2009 werden trAk erfolgreich in der Klinik eingesetzt (Heiss, *et al.* 2010; Seimetz, *et al.* 2010). Auch trAk mit Spezifität gegen Her2/neu (Kiewe, *et al.* 2006) sowie CD20 (Buhmann, *et al.* 2009) werden derzeit im Rahmen klinischer Studien auf ihr Antitumor-Potenzial überprüft. Nach wie vor besteht allerdings großes Verbesserungspotenzial hinsichtlich therapeutischer Wirksamkeit und Sicherheit der Tumorbehandlung mit trAk.

Im Hinblick auf eine Vereinfachung der Studienprotokolle liegt es nahe, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse über eine s.c. trAk-Behandlung im Mausmodell auch auf das humane System zu übertragen. Zur Überprüfung der präklinischen Resultate sollte vor allem das Zytokinprofil nach Therapie analysiert werden (Vergleich Abbildung 10); neben den Th1-Zytokinen sind insbesondere die Plasmaspiegel des immunregulierenden Zytokins IL-10 von großem Interesse und sollten daher mit den Konzentrationen nach i.v. Applikation verglichen werden.

Um in Zukunft das volle Antitumor-Potenzial von trAk auszuschöpfen, ist es des Weiteren von hoher Priorität, die trAk-induzierten gegenregulatorischen Mechanismen genauer zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits festgestellt werden, dass trAk zur Anreicherung von Treg führen (Abbildung 12), deren immunsuppressive Funktion bereits hinlänglich beschrieben wurde (Sakaguchi, *et al.* 2009; Oleinika, *et al.* 2013). Eine weitere regulatorische Zellpopulation, deren Rolle in der Tumorentstehung ebenfalls häufig diskutiert wird, sind die myeloiden Suppressorzellen, welche durch die Ausschüttung inhibitorischer Botenstoffe T-Zellen sowie NK-Zellen unterdrücken und deren Anwesenheit sich förderlich auf die Angiogenese auswirkt (Gabrilovich und Nagaraj 2009; Ostrand-Rosenberg und Sinha 2009). Ein negativer Einfluss von myeloiden Suppressorzellen auf das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom konnte bereits beschrieben werden; und auch eine inverse Korrelation mit der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen wurde im Rahmen dieser Untersuchung festgestellt (Kiessling, *et al.* 2014; Weide, *et al.* 2014). Für den klinischen Einsatz von

trAk ließen sich aus den neuen Erkenntnissen wiederum potenzielle Angriffspunkte für therapieverbessernde Kombinationsansätze ableiten. Auch ist in diesem Zusammenhang die Expression des negativen Regulatormoleküls PD-1 bzw. seiner Liganden PD-L1/PD-L2 interessant. Denn neben dem CTLA-4-blockierenden Antikörper Ipilimumab hat auch der PD1-blockierende Antikörper Nivolumab kürzlich die Zulassung erhalten und verspricht unter anderem bessere Ansprechraten sowie eine verbesserte Verträglichkeit als sein Vorgänger (Topalian, *et al.* 2014).

Die präklinische Evaluierung der Kombination bestehend aus trAk und dem CTLA-4-blockierenden Antikörper HB304 hatte ergeben, dass CD4⁺ T-Zellen womöglich eine entscheidende Rolle für die Tumorprotektion nach Immunisierung spielen (Abbildung 23 und Abbildung 26). In Zukunft gilt es deren Funktion für die Tumorabstoßung *in vivo* (durch Antikörper-vermittelte Depletion) sowie *in vitro* (durch Veränderung der Stimulationsbedingungen, so dass vornehmlich die Differenzierung zu CD4⁺ Th-Zellen unterstützt wird) gründlich zu analysieren. Da CD4⁺ Th-Zellen durch die Ausschüttung verschiedener Th1- sowie Th2-Zytokine neben ZTL allerdings auch NK-Zellen sowie APZ in ihrer Funktionalität unterstützen (Hung, *et al.* 1998; Egeter, *et al.* 2000), sollten – um den Mechanismus der Tumorprotektion nach Immunisierung mit trAk weiter aufzuklären – auch diese Immuneffektorzellen in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass für einen optimalen Einsatz von trAk in der Tumorthherapie ein genaues Verständnis der Wirkweise dieser immunologisch hochpotenten Agenzien sowie des komplexen Zusammenspiels der beteiligten zellulären und löslichen Komponenten essenziell ist. In diesem Sinne könnte durch die Einführung einer s.c. Formulierung der Grundstein für eine breitere Anwendung gelegt und gleichzeitig die klinische Entwicklung von trAk entschieden vorangetrieben werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. und PILLAI, S. (2014) Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders W.B.
- ARMSTRONG, A. und ECK, S.L. (2003) EpCAM: a new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biology & Therapy* 2 (4): 320-325.
- BLANK, C.U. und ENK, A. (2015) Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *International Immunology* 27 (1): 3-10.
- BUHMANN, R., SIMOES, B., STANGLMAIER, M., YANG, T., FALTIN, M., BUND, D., LINDHOFER, H. und KOLB, H.J. (2009) Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplantation* 43 (5): 383-397.
- BURNET, M. (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British Medical Journal* 1 (5023): 841-847.
- BYRNE, W.L., MILLS, K.H.G., LEDERER, J.A. und O' SULLIVAN, G.C. (2011) Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Research* 71 (22): 6915-6920.
- CALLAHAN, M.K., POSTOW, M.A. und WOLCHOK, J.D. (2014) CTLA-4 and PD-1 pathway blockade: combinations in the clinic. *Frontiers in Oncology* 4: 385.
- CARTHON, B.C., WOLCHOK, J.D., YUAN, J., KAMAT, A., NG TANG, D.S., SUN, J., KU, G., TRONCOSO, P., LOGOTHETIS, C.J., ALLISON, J.P. und SHARMA, P. (2010) Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clinical Cancer Research* 16 (10): 2861-2871.
- CHAMBERS, C.A., KUHNS, M.S., EGEN, J.G. und ALLISON, J.P. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual Review of Immunology* 19 (1): 565-594.
- COBLEIGH, M.A., VOGEL, C.L., TRIPATHY, D., ROBERT, N.J., SCHOLL, S., FEHRENBACHER, L., WOLTER, J.M., PATON, V., SHAK, S. und LIEBERMAN, G. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of Clinical Oncology* 17 (9): 2639-2639.
- COUZIN-FRANKEL, J. (2013) Cancer immunotherapy. *Science* 342 (6165): 1432-1433.
- CRESPO, J., SUN, H., WELLING, T.H., TIAN, Z. und ZOU, W. (2013) T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology* 25 (2): 214-221.

- DAVIES, A., MERLI, F., MIHALJEVIC, B., SIRITANARATKUL, N., SOLAL-CÉLIGNY, P., BARRETT, M., BERGE, C., BITTNER, B., BOEHNKE, A., MC INTYRE, C. und MAC DONALD, D. (2014) Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab in follicular lymphoma (SABRINA): stage 1 analysis of a randomised phase 3 study. *The Lancet Oncology* 15 (3): 343-352.
- DE VISSER, K.E., EICHTEN, A. und COUSSENS, L.M. (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* 6 (1): 24-37.
- DEETHS, M.J., KEDL, R.M. und MESCHER, M.F. (1999) CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *The Journal of Immunology* 163 (1): 102-110.
- DIGHE, A.S., RICHARDS, E., OLD, L.J. und SCHREIBER, R.D. (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1 (6): 447-456.
- DOHLSTEN, M., HANSSON, J., OHLSSON, L., LITTON, M. und KALLAND, T. (1995) Antibody-targeted superantigens are potent inducers of tumor-infiltrating T lymphocytes in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (21): 9791-9795.
- DRANOFF, G., JAFFEE, E., LAZENBY, A., GOLUMBEK, P., LEVITSKY, H., BROSE, K., JACKSON, V., HAMADA, H., PARDOLL, D. und MULLIGAN, R.C. (1993) Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (8): 3539-3543.
- DRIESESENS, G., KLINE, J. und GAJEWSKI, T.F. (2009) Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews* 229 (1): 126-144.
- DUNN, G.P., BRUCE, A.T., IKEDA, H., OLD, L.J. und SCHREIBER, R.D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3 (11): 991-998.
- DUNN, G.P., OLD, L.J. und SCHREIBER, R.D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21 (2): 137-148.
- EGETER, O., MOCIKAT, R., GHORESCHI, K., DIECKMANN, A. und RÖCKEN, M. (2000) Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Research* 60 (6): 1515-1520.
- EGGERT, A.O., ANDERSEN, M.H., VOIGT, H., SCHRAMA, D., KAMPGEN, E., STRATEN, P.T. und BECKER, J.C. (2004) Characterization of mouse MAGE-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes. *European Journal of Immunology* 34 (11): 3285-3290.
- EHRlich, P. (1909) Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5: 273-290.
- EISSLER, N. (2012) Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Therapie mit einem trifunktionalen bispezifischen Antikörper. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

- EISSLER, N., MYSLIWIETZ, J., DEPPISCH, N., RUF, P., LINDHOFER, H. und MOCIKAT, R. (2013) Potential of the trifunctional bispecific antibody surek depends on dendritic cells: rationale for a new approach of tumor immunotherapy. *Molecular Medicine* 19: 54-61.
- EISSLER, N., RUF, P., MYSLIWIETZ, J., LINDHOFER, H. und MOCIKAT, R. (2012) Trifunctional bispecific antibodies induce tumor-specific T cells and elicit a vaccination effect. *Cancer Research* 72 (16): 3958-3966.
- EMA Committee for Proprietary Medicinal Products. (2002) Note for guidance on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for subcutaneous and intramuscular use (CPMP/BPWG/283/00). London.
- FAN, X., QUEZADA, S.A., SEPULVEDA, M.A., SHARMA, P. und ALLISON, J.P. (2014) Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *The Journal of Experimental Medicine* 211 (4): 715-725.
- FIDLER, I.J. (1975) Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research* 35 (1): 218-224.
- FONTENOT, J.D., GAVIN, M.A. und RUDENSKY, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4 (4): 330-336.
- FRANCISCO, L.M., SAGE, P.T. und SHARPE, A.H. (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews* 236: 219-242.
- FREEMAN, G.J., LONG, A.J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L.J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T. und BYRNE, M.C. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027-1034.
- GABRILOVICH, D.I. und NAGARAJ, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* 9 (3): 162-174.
- GARBER, K. (2010) Industry makes strides in melanoma. *Nature Biotechnology* 28 (8): 763-764.
- GREENFIELD, E.A., NGUYEN, K.A. und KUCHROO, V.K. (1998) CD28/B7 costimulation: a review. *Critical Reviews™ in Immunology* 18 (5).
- GROSSO, J.F. und JURE-KUNKEL, M.N. (2013) CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunity* 13.
- HAMIZI, S., FREYER, G., BAKRIN, N., HENIN, E., MOHTARAM, A., LE SAUX, O. und FALANDRY, C. (2013) Subcutaneous trastuzumab: development of a new formulation for treatment of HER2-positive early breast cancer. *Onco Targets and Therapy* 6: 89-94.
- HÄMMERLING, U., AOKI, T., DE HARVEN, E., BOYSE, E.A. und OLD, L.J. (1968) Use of hybrid antibody with anti-gamma-G and anti-ferritin specificities in locating cell surface antigens by electron microscopy. *The Journal of Experimental Medicine* 128 (6): 1461-1473.
- HARAGUCHI, M., YAMASHIRO, S., YAMAMOTO, A., FURUKAWA, K., TAKAMIYA, K., LLOYD, K.O., SHIKU, H. und FURUKAWA, K. (1994) Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (22): 10455-10459.

- HEISS, M.M., MURAWA, P., KORALEWSKI, P., KUTARSKA, E., KOLESNIK, O.O., IVANCHENKO, V.V., DUDNICHENKO, A.S., ALEKNAVICIENE, B., RAZBADAUSKAS, A., GORE, M., GANEA-MOTAN, E., CIULEANU, T., WIMBERGER, P., SCHMITTEL, A., SCHMALFELDT, B., BURGESS, A., BOKEMEYER, C., LINDHOFER, H., LAHR, A. und PARSONS, S.L. (2010) The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: results of a prospective randomized phase II/III trial. *International Journal of Cancer* 127 (9): 2209-2221.
- HEISS, M.M., STRÖHLEIN, M.A., JÄGER, M., KIMMIG, R., BURGESS, A., SCHOBERTH, A., JAUCH, K.W., SCHILDBERG, F.W. und LINDHOFER, H. (2005) Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *International Journal of Cancer* 117 (3): 435-443.
- HESS, J., RUF, P. und LINDHOFER, H. (2012) Cancer therapy with trifunctional antibodies: linking innate and adaptive immunity. *Future Oncology* 8 (1): 73-85.
- HODI, F.S., O'DAY, S.J., MC DERMOTT, D.F., WEBER, R.W., SOSMAN, J.A., HAANEN, J.B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J.C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A.J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J.M., LINETTE, G.P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C.H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J.I., WOLCHOK, J.D., WEBER, J.S., TIAN, J., YELLIN, M.J., NICHOL, G.M., HOOS, A. und URBA, W.J. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363 (8): 711-723.
- HUNG, K., HAYASHI, R., LAFOND-WALKER, A., LOWENSTEIN, C., PARDOLL, D. und LEVITSKY, H. (1998) The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *The Journal of Experimental Medicine* 188 (12): 2357-2368.
- HUTLOFF, A., DITTRICH, A.M., BEIER, K.C., ELJASCHEWITSCH, B., KRAFT, R., ANAGNOSTOPOULOS, I. und KROCZEK, R.A. (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397 (6716): 263-266.
- JACOBS, J.F., NIERKENS, S., FIGDOR, C.G., DE VRIES, I.J.M. und ADEMA, G.J. (2012) Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *The Lancet Oncology* 13 (1): e32-e42.
- KARPOVSKY, B., TITUS, J.A., STEPHANY, D.A. und SEGAL, D.M. (1984) Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* 160 (6): 1686-1701.
- KERDILES, Y., UGOLINI, S. und VIVIER, E. (2013) T cell regulation of natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* 210 (6): 1065-1068.
- KIESSLING, R., MAO, Y. und PICO DE COANA, Y. (2014) Myeloid suppressors decrease melanoma survival by abating tumor-fighting T cells. *Clinical Cancer Research* 20 (6): 1401-1403.
- KIEWE, P., HASMÜLLER, S., KAHLERT, S., HEINRIGS, M., RACK, B., MARME, A., KORFEL, A., JÄGER, M., LINDHOFER, H., SOMMER, H., THIEL, E. und UNTCH, M. (2006) Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research* 12 (10): 3085-3091.

- KLAGES, K., MAYER, C.T., LAHL, K., LODDENKEMPER, C., TENG, M.W.L., NGIOW, S.F., SMYTH, M.J., HAMANN, A., HUEHN, J. und SPARWASSER, T. (2010) Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma. *Cancer Research* 70 (20): 7788-7799.
- KÖHLER, G. und MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497.
- KRONENBERGER, K., DIECKMANN, A., SELMAYR, M., STREHL, J., WAHL, U., LINDHOFER, H., KRAAL, G. und MOCIKAT, R. (2002) Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells. *Blood* 99 (4): 1327-1331.
- KRONENBERGER, K., NÖSSNER, E., FRANKENBERGER, B., WAHL, U., DREYLING, M., HALLEK, M. und MOCIKAT, R. (2008) A polyvalent cellular vaccine induces T-cell responses against specific self-antigens overexpressed in chronic lymphocytic B-cell leukemia. *Journal of Immunotherapy* 31 (8): 723-730.
- KRUMMEL, M.F. und ALLISON, J.P. (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine* 182 (2): 459-465.
- KVISTBORG, P., PHILIPS, D., KELDERMAN, S., HAGEMAN, L., OTTENSMEIER, C., JOSEPH-PIETRAS, D., WELTERS, M.J., VAN DER BURG, S., KAPITEIJN, E., MICHIELIN, O., ROMANO, E., LINNEMANN, C., SPEISER, D., BLANK, C., HAANEN, J.B. und SCHUMACHER, T.N. (2014) Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Science Translational Medicine* 6 (254): 254ra128-254ra128.
- KWON, E.D., HURWITZ, A.A., FOSTER, B.A., MADIAS, C., FELDHAUS, A.L., GREENBERG, N.M., BURG, M.B. und ALLISON, J.P. (1997) Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (15): 8099-8103.
- LAHL, K. und SPARWASSER, T. (2011) In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DREG mouse model. *Methods in Molecular Biology* 707: 157-172.
- LAUNAY-VACHER, V. (2013) An appraisal of subcutaneous trastuzumab: a new formulation meeting clinical needs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 72 (6): 1361-1367.
- LEACH, D.R., KRUMMEL, M.F. und ALLISON, J.P. (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271 (5256): 1734-1736.
- LEVEQUE, D. (2014) Subcutaneous administration of anticancer agents. *Anticancer Research* 34 (4): 1579-1586.
- LEVITSKY, H.I., LAZENBY, A., HAYASHI, R.J. und PARDOLL, D.M. (1994) In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression. *The Journal of Experimental Medicine* 179 (4): 1215-1224.
- LIAKOU, C.I., KAMAT, A., TANG, D.N., CHEN, H., SUN, J., TRONCOSO, P., LOGOTHETIS, C. und SHARMA, P. (2008) CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4+ICOS $^+$ cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (39): 14987-14992.

- LINDAU, D., GIELEN, P., KROESEN, M., WESSELING, P. und ADEMA, G.J. (2013) The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138 (2): 105-115.
- LINDHOFER, H., HESS, J. und RUF, P. (2011) Trifunctional Triomab antibodies for cancer therapy. In: Kontermann, R.E. (Hrsg.) *Bispecific Antibodies*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
- LINDHOFER, H., MENZEL, H., GÜNTHER, W., HÜLTNER, L. und THIERFELDER, S. (1996) Bispecific antibodies target operationally tumor-specific antigens in two leukemia relapse models. *Blood* 88 (12): 4651-4658.
- LINDHOFER, H., MOCIKAT, R., STEIPE, B. und THIERFELDER, S. (1995) Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *The Journal of Immunology* 155 (1): 219-225.
- LING, K.L., PRATAP, S.E., BATES, G.J., SINGH, B., MORTENSEN, N.J., GEORGE, B.D., WARREN, B.F., PIRIS, J., RONCADOR, G., FOX, S.B., BANHAM, A.H. und CERUNDOLO, V. (2007) Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immunity* 7: 7.
- LIU, V.C., WONG, L.Y., JANG, T., SHAH, A.H., PARK, I., YANG, X., ZHANG, Q., LONNING, S., TEICHER, B.A. und LEE, C. (2007) Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β . *The Journal of Immunology* 178 (5): 2883-2892.
- LIYANAGE, U.K., MOORE, T.T., JOO, H.-G., TANAKA, Y., HERRMANN, V., DOHERTY, G., DREBIN, J.A., STRASBERG, S.M., EBERLEIN, T.J., GOEDEGEBUURE, P.S. und LINEHAN, D.C. (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *The Journal of Immunology* 169 (5): 2756-2761.
- LÜKING, C., KRONENBERGER, K., FRANKENBERGER, B., NÖSSNER, E., RÖCKEN, M. und MOCIKAT, R. (2008) Antitumor effector functions of T cells are dependent on in vivo priming and restricted T-cell receptor expression. *International Journal of Cancer* 122 (10): 2280-2285.
- LUNDIN, J., KIMBY, E., BJÖRKHOLM, M., BROLIDEN, P.-A., CELSING, F., HJALMAR, V., MÖLLGÅRD, L., REBELLO, P., HALE, G. und WALDMANN, H. (2002) Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 100 (3): 768-773.
- MAHER, J. und ADAMI, A.A. (2013) Antitumor immunity: easy as 1, 2, 3 with monoclonal bispecific trifunctional antibodies? *Cancer Research* 73 (18): 5613-5617.
- MAIO, M., DI GIACOMO, A.M., ROBERT, C. und EGGERMONT, A.M. (2013) Update on the role of ipilimumab in melanoma and first data on new combination therapies. *Current Opinion in Oncology* 25 (2): 166-172.
- MANSOUR, M., POHAJDAK, B., KAST, W.M., FUENTES-ORTEGA, A., KORETS-SMITH, E., WEIR, G.M., BROWN, R.G. und DAFTARIAN, P. (2007) Therapy of established B16-F10 melanoma tumors by a single vaccination of CTL/T helper peptides in VacciMax. *Journal of Translational Medicine* 5: 20.

MARGOLIN, K., WONG, S., PENROD, J., SONG, J., CHANG, I., HEBDEN, T., JOHNSON, D., JANG, S., CLARK, J. und MC DERMOTT, D. (2013) Effectiveness and safety of first-line ipilimumab (IPI) 3 mg/kg therapy for advanced melanoma (AM): evidence from a US multisite retrospective chart review. *European Journal of Cancer* 49: S869-S869.

MATTAROLLO, S.R., STEEGH, K., LI, M., DURET, H., FOONG NGIOW, S. und SMYTH, M.J. (2013) Transient Foxp3+ regulatory T-cell depletion enhances therapeutic anticancer vaccination targeting the immune-stimulatory properties of NKT cells. *Immunology & Cell Biology* 91 (1): 105-114.

MC LAUGHLIN, P., GRILLO-LÓPEZ, A.J., LINK, B.K., LEVY, R., CZUCZMAN, M.S., WILLIAMS, M.E., HEYMAN, M.R., BENICE-BRUCKLER, I., WHITE, C.A. und CABANILLAS, F. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *Journal of Clinical Oncology* 16 (8): 2825-2833.

MELERO, I., GRIMALDI, A.M., PEREZ-GRACIA, J.L. und ASCIERTO, P.A. (2013) Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. *Clinical Cancer Research* 19 (5): 997-1008.

MIESCHER, G.C., SCHREYER, M. und MAC DONALD, H.R. (1989) Production and characterization of a rat monoclonal antibody against the murine CD3 molecular complex. *Immunology Letters* 23 (2): 113-118.

MILSTEIN, C. und CUELLO, A.C. (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 305 (5934): 537-540.

MITTAL, D., GUBIN, M.M., SCHREIBER, R.D. und SMYTH, M.J. (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* 27: 16-25.

MOMBURG, F., MOLDENHAUER, G., HÄMMERLING, G.J. und MÖLLER, P. (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Research* 47 (11): 2883-2891.

MURPHY, K.M., TRAVERS, P. und WALPORT, M. (2009) Janeway Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

NAUJOKS, M., WEIß, J., RIEDEL, T., HÖMBERG, N., PRZEWOZNIK, M., NÖSSNER, E., RÖCKEN, M. und MOCIKAT, R. (2014) Alterations of costimulatory molecules and instructive cytokines expressed by dendritic cells in the microenvironment of an endogenous mouse lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63 (5): 491-499.

NAVID, F., SANTANA, V.M. und BARFIELD, R.C. (2010) Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Current Cancer Drug Targets* 10 (2): 200-209.

NICOLSON, G.L., BRUNSON, K.W. und FIDLER, I.J. (1978) Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Research* 38 (11 Part 2): 4105-4111.

NISHIKAWA, H. und SAKAGUCHI, S. (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* 127 (4): 759-767.

- NISONOFF, A. und RIVERS, M.M. (1961) Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93: 460-462.
- O' GARRA, A. und VIEIRA, P. (2007) T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology* 7 (6): 425-428.
- OLEINIKA, K., NIBBS, R.J., GRAHAM, G.J. und FRASER, A.R. (2013) Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical & Experimental Immunology* 171 (1): 36-45.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. und SINHA, P. (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *The Journal of Immunology* 182 (8): 4499-4506.
- OTT, M.G., MARMÉ, F., MOLDENHAUER, G., LINDHOFER, H., HENNIG, M., SPANNAGL, R., ESSING, M.M., LINKE, R. und SEIMETZ, D. (2012) Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *International Journal of Cancer* 130 (9): 2195-2203.
- OVERWIJK, W.W., TSUNG, A., IRVINE, K.R., PARKHURST, M.R., GOLETZ, T.J., TSUNG, K., CARROLL, M.W., LIU, C., MOSS, B., ROSENBERG, S.A. und RESTIFO, N.P. (1998) gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *The Journal of Experimental Medicine* 188 (2): 277-286.
- PARDOLL, D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252-264.
- PARKIN, J. und COHEN, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357 (9270): 1777-1789.
- PASTILLE, E., BARDINI, K., FLEISSNER, D., ADAMCZYK, A., FREDE, A., WADWA, M., VON SMOLINSKI, D., KASPER, S., SPARWASSER, T., GRUBER, A.D., SCHULER, M., SAKAGUCHI, S., ROERS, A., MÜLLER, W., HANSEN, W., BUER, J. und WESTENDORF, A.M. (2014) Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Research* 74 (16): 4258-4269.
- PATT, D., WONG, S., JUDAY, T., PENROD, J., CHEN, C. und HEBDEN, T. (2013) A community-based, real-world, study of treatment-naïve advanced melanoma (AM) patients treated with 3 mg/kg ipilimumab (IPI) in the United States. *European Journal of Cancer* 49: S872-S872.
- PEGGS, K.S., QUEZADA, S.A., CHAMBERS, C.A., KORMAN, A.J. und ALLISON, J.P. (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of Experimental Medicine* 206 (8): 1717-1725.
- PEGGS, K.S., QUEZADA, S.A., KORMAN, A.J. und ALLISON, J.P. (2006) Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 18 (2): 206-213.
- PEREZ, P., HOFFMAN, R.W., SHAW, S., BLUESTONE, J.A. und SEGAL, D.M. (1985) Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature* 316 (6026): 354-356.
- POTAPENKO, M., SHURIN, G.V. und DE LEON, J. (2007) Gangliosides as immunomodulators. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 601: 195-203.

- PRIETO, P.A., YANG, J.C., SHERRY, R.M., HUGHES, M.S., KAMMULA, U.S., WHITE, D.E., LEVY, C.L., ROSENBERG, S.A. und PHAN, G.Q. (2012) CTLA-4 Blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research* 18 (7): 2039-2047.
- RAGUPATHI, G., LIVINGSTON, P.O., HOOD, C., GATHURU, J., KROWN, S.E., CHAPMAN, P.B., WOLCHOK, J.D., WILLIAMS, L.J., OLDFIELD, R.C. und HWU, W.J. (2003) Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clinical Cancer Research* 9 (14): 5214-5220.
- RALAINIRINA, N., POLI, A., MICHEL, T., POOS, L., ANDRÈS, E., HENTGES, F. und ZIMMER, J. (2007) Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 81 (1): 144-153.
- REINECKE, K., MYSLIWIEZ, J. und THIERFELDER, S. (1994) Single as well as pairs of synergistic anti-CD4+CD8 antibodies prevent graft-versus-host disease in fully mismatched mice. *Transplantation* 57 (3): 458-461.
- RIETHMÜLLER, G. (2012) Symmetry breaking: bispecific antibodies, the beginnings, and 50 years on. *Cancer Immunity* 12: 12.
- ROBERT, C. und GHIRINGHELLI, F. (2009) What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *The Oncologist* 14 (8): 848-861.
- RUF, P., GIRES, O., JÄGER, M., FELLINGER, K., ATZ, J. und LINDHOFER, H. (2007) Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *British Journal of Cancer* 97 (3): 315-321.
- RUF, P., JÄGER, M., ELLWART, J., WOSCH, S., KUSTERER, E. und LINDHOFER, H. (2004) Two new trifunctional antibodies for the therapy of human malignant melanoma. *International Journal of Cancer* 108 (5): 725-732.
- RUF, P. und LINDHOFER, H. (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 98 (8): 2526-2534.
- RUF, P., SCHÄFER, B., EISSLER, N., MOCIKAT, R., HESS, J., PLOSCHER, M., WOSCH, S., SUCKSTORFF, I., ZEHETMEIER, C. und LINDHOFER, H. (2012) Ganglioside GD2-specific trifunctional surrogate antibody surek demonstrates therapeutic activity in a mouse melanoma model. *Journal of Translational Medicine* 10: 219.
- SAKAGUCHI, S., ONO, M., SETOGUCHI, R., YAGI, H., HORI, S., FEHERVARI, Z., SHIMIZU, J., TAKAHASHI, T. und NOMURA, T. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* 212: 8-27.
- SAKAGUCHI, S., WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P. und YAMAGUCHI, T. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* 21 (10): 1105-1111.
- SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T. und ONO, M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133 (5): 775-787.

SCHRAMA, D., XIANG, R., EGGERT, A.O., ANDERSEN, M.H., PEDERSEN LS, L.O., KAMPGEN, E., SCHUMACHER, T.N., REISFELD, R.R. und BECKER, J.C. (2004) Shift from systemic to site-specific memory by tumor-targeted IL-2. *The Journal of Immunology* 172 (10): 5843-5850.

SCHREIBER, R.D., OLD, L.J. und SMYTH, M.J. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331 (6024): 1565-1570.

SCHÜLER, T., QIN, Z., IBE, S., NOBEN-TRAUTH, N. und BLANKENSTEIN, T. (1999) T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 189 (5): 803-810.

SCOTT, A.M., WOLCHOK, J.D. und OLD, L.J. (2012) Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 278-287.

SEBASTIAN, M., KIEWE, P., SCHUETTE, W., BRUST, D., PESCHEL, C., SCHNELLER, F., RUHLE, K.H., NILIUS, G., EWERT, R., LODZIEWSKI, S., PASSLICK, B., SIENEL, W., WIEWRODT, R., JAGER, M., LINDHOFER, H., FRICCIUS-QUECKE, H. und SCHMITTEL, A. (2009) Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x anti-CD3): results of a phase 1/2 study. *Journal of Immunotherapy* 32 (2): 195-202.

SEBASTIAN, M., PASSLICK, B., FRICCIUS-QUECKE, H., JÄGER, M., LINDHOFER, H., KANNIESS, F., WIEWRODT, R., THIEL, E., BUHL, R. und SCHMITTEL, A. (2007) Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56 (10): 1637-1644.

SEIMETZ, D., LINDHOFER, H. und BOKEMEYER, C. (2010) Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM× anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 36 (6): 458-467.

SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A.T., WHITE, J.M., SWANSON, P.E., OLD, L.J. und SCHREIBER, R.D. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410 (6832): 1107-1111.

SHARMA, P., WAGNER, K., WOLCHOK, J.D. und ALLISON, J.P. (2011) Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews Cancer* 11 (11): 805-812.

SHARPE, A.H. und ABBAS, A.K. (2006) T-cell costimulation—biology, therapeutic potential, and challenges. *New England Journal of Medicine* 355 (10): 973-975.

SIMPSON, T.R., LI, F., MONTALVO-ORTIZ, W., SEPULVEDA, M.A., BERGERHOFF, K., ARCE, F., RODDIE, C., HENRY, J.Y., YAGITA, H., WOLCHOK, J.D., PEGGS, K.S., RAVETCH, J.V., ALLISON, J.P. und QUEZADA, S.A. (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of Experimental Medicine* 210 (9): 1695-1710.

STAERZ, U.D., KANAGAWA, O. und BEVAN, M.J. (1985) Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 314 (6012): 628-631.

STREHL, J., SELMAYR, M., KREMER, J.P., HULTNER, L., LINDHOFER, H. und MOCIKAT, R. (1999) Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells. *International Journal of Cancer* 83 (1): 113-120.

STRÖHLEIN, M.A., LORDICK, F., RÜTTINGER, D., GRÜTZNER, K.U., SCHEMANSKI, O.C., JÄGER, M., LINDHOFER, H., HENNIG, M., JAUCH, K.W., PESCHEL, C. und HEISS, M.M. (2011) Immunotherapy of peritoneal carcinomatosis with the antibody catumaxomab in colon, gastric, or pancreatic cancer: an open-label, multicenter, phase I/II trial. *Onkologie* 34 (3): 101-108.

STRÖHLEIN, M.A., SIEGEL, R., JÄGER, M., LINDHOFER, H., JAUCH, K.W. und HEISS, M.M. (2009) Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28: 18.

SUNDSTEDT, A., CELANDER, M., ERIKSSON, H., TORNGREN, M. und HEDLUND, G. (2012) Monotherapeutically nonactive CTLA-4 blockade results in greatly enhanced antitumor effects when combined with tumor-targeted superantigens in a B16 melanoma model. *Journal of Immunotherapy* 35 (4): 344-353.

TEACHEY, D.T., RHEINGOLD, S.R., MAUDE, S.L., ZUGMAIER, G., BARRETT, D.M., SEIF, A.E., NICHOLS, K.E., SUPPA, E.K., KALOS, M., BERG, R.A., FITZGERALD, J.C., APLENC, R., GORE, L. und GRUPP, S.A. (2013) Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood* 121 (26): 5154-5157.

TENG, M.W.L., NGIOW, S.F., VON SCHEIDT, B., MC LAUGHLIN, N., SPARWASSER, T. und SMYTH, M.J. (2010) Conditional regulatory T-cell depletion releases adaptive immunity preventing carcinogenesis and suppressing established tumor growth. *Cancer Research* 70 (20): 7800-7809.

TERNANT, D. und PAINAUD, G. (2005) Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5 Suppl 1: S37-S47.

THOMAS, L. (1959) Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper.

THURIN, J., THURIN, M., HERLYN, M., ELDER, D.E., STEPLEWSKI, Z., CLARK, W.H. und KOPROWSKI, H. (1986) GD2 ganglioside biosynthesis is a distinct biochemical event in human melanoma tumor progression. *FEBS Letters* 208 (1): 17-22.

TOPALIAN, S.L., SZNOL, M., MC DERMOTT, D.F., KLUGER, H.M., CARVAJAL, R.D., SHARFMAN, W.H., BRAHMER, J.R., LAWRENCE, D.P., ATKINS, M.B., POWDERLY, J.D., LEMING, P.D., LIPSON, E.J., PUZANOV, I., SMITH, D.C., TAUBE, J.M., WIGGINTON, J.M., KOLLIA, G.D., GUPTA, A., PARDOLL, D.M., SOSMAN, J.A. und HODI, F.S. (2014) Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of Clinical Oncology* 32 (10): 1020-1030.

TOPP, M.S., GÖKBUGET, N., STEIN, A.S., ZUGMAIER, G., O'BRIEN, S., BARGOU, R.C., DOMBRET, H., FIELDING, A.K., HEFFNER, L., LARSON, R.A., NEUMANN, S., FOÀ, R., LITZOW, M., RIBERA, J.-M., RAMBALDI, A., SCHILLER, G., BRÜGGEMANN, M., HORST, H.A., HOLLAND, C., JIA, C., MANIAR, T., HUBER, B., NAGORSEN, D., FORMAN, S.J. und KANTARJIAN, H.M. (2015) Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 16 (1): 57-66.

- ULLMAN-CULLERE, M.H. und FOLTZ, C.J. (1999) Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science* 49 (3): 319-323.
- VAN ELSAS, A., HURWITZ, A.A. und ALLISON, J.P. (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *The Journal of Experimental Medicine* 190 (3): 355-366.
- VOGEL, C.L., COBLEIGH, M.A., TRIPATHY, D., GUTHEIL, J.C., HARRIS, L.N., FEHRENBACHER, L., SLAMON, D.J., MURPHY, M., NOVOTNY, W.F. und BURCHMORE, M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20 (3): 719-726.
- VOLLMAR, A., ZÜNDORF, I. und DINGERMANN, T. (2012) Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- WALUNAS, T.L., LENSCHOW, D.J., BAKKER, C.Y., LINSLEY, P.S., FREEMAN, G.J., GREEN, J.M., THOMPSON, C.B. und BLUESTONE, J.A. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1 (5): 405-413.
- WEBER, J. (2007) Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *The Oncologist* 12 (7): 864-872.
- WEBER, J. (2009) Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (5): 823-830.
- WEIDE, B., MARTENS, A., ZELBA, H., STUTZ, C., DERHOVANESEAN, E., DI GIACOMO, A.M., MAIO, M., SUCKER, A., SCHILLING, B., SCHADENDORF, D., BUTTNER, P., GARBE, C. und PAWELEC, G. (2014) Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. *Clinical Cancer Research* 20 (6): 1601-1609.
- WING, K., ONISHI, Y., PRIETO-MARTIN, P., YAMAGUCHI, T., MIYARA, M., FEHERVARI, Z., NOMURA, T. und SAKAGUCHI, S. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322 (5899): 271-275.
- WOLCHOK, J.D., NEYNS, B., LINETTE, G., NEGRIER, S., LUTZKY, J., THOMAS, L., WATERFIELD, W., SCHADENDORF, D., SMYLIE, M., GUTHRIE, T., GROB, J.J., CHESNEY, J., CHIN, K., CHEN, K., HOOS, A., O'DAY, S.J. und LEBBE, C. (2010) Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *The Lancet Oncology* 11 (2): 155-164.
- WOLF, D., WOLF, A.M., RUMPOLD, H., FIEGL, H., ZEIMET, A.G., MULLER-HOLZNER, E., DEIBL, M., GASTL, G., GUNSILIUS, E. und MARTH, C. (2005) The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor foxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 11 (23): 8326-8331.
- ZEIDLER, R., MYSLIWIETZ, J., CSANADY, M., WALZ, A., ZIEGLER, I., SCHMITT, B., WOLLENBERG, B. und LINDHOFER, H. (2000) The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *British Journal of Cancer* 83 (2): 261-266.

ZEIDLER, R., REISBACH, G., WOLLENBERG, B., LANG, S., CHAUBAL, S., SCHMITT, B. und LINDHOFER, H. (1999) Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *The Journal of Immunology* 163 (3): 1246-1252.

ZHANG, S., CORDON-CARDO, C., ZHANG, H.S., REUTER, V.E., ADLURI, S., HAMILTON, W.B., LLOYD, K.O. und LIVINGSTON, P.O. (1997) Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *International Journal of Cancer* 73 (1): 42-49.

ZHENG, Y., JOSEFOWICZ, S.Z., KAS, A., CHU, T.T., GAVIN, M.A. und RUDENSKY, A.Y. (2007) Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445 (7130): 936-940.

6 ANHANG

6.1 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

6.1.1 Fachpublikation

Nina Deppisch, Peter Ruf, Nina Eissler, Frauke Neff, Raymund Buhmann, Horst Lindhofer, Ralph Mocikat (2015) Efficacy and tolerability of a GD2-directed trifunctional bispecific antibody in a preclinical model: Subcutaneous administration is superior to intravenous delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, pii: molcanther.0156.2015.

6.1.2 Poster und Vorträge

Nina Deppisch, Peter Ruf, Nina Eissler, Frauke Neff, Raymund Buhmann, Horst Lindhofer, Ralph Mocikat. Preclinical evaluation of ganglioside GD2-directed trifunctional bispecific antibodies. *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Mainz, 11.-14. September 2013.

Nina Deppisch, Peter Ruf, Nina Eissler, Frauke Neff, Raymund Buhmann, Horst Lindhofer, Ralph Mocikat. Preclinical evaluation of ganglioside GD2-directed trifunctional bispecific antibodies – balance between T-cell activation and suppression is dependent on the application route. *44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Bonn, 17.-20. September 2014.

Nina Deppisch, Peter Ruf, Nina Eissler, Horst Lindhofer, Ralph Mocikat. The combination of trifunctional bispecific antibodies with a CTLA-4-blocking antibody impacts the induction of an immunologic memory in a preclinical mouse model. *13th CIMT Annual Meeting*, Mainz, 11.-13. Mai 2015.

6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Ralph Mocikat, der mir stets mit all seiner Erfahrung und seinem Wissen zur Seite stand und sehr viel Zeit in die Betreuung meiner Doktorarbeit investiert hat. Danke für deine konstruktiven Ratschläge und die zahlreichen aufmunternden Gespräche – ich habe viel von Dir gelernt. Auch möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bei Prof. Dr. Angelika Vollmar für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München bedanken. Weiterhin danke ich der Bayerischen Forschungstiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Vielen Dank an Dr. Horst Lindhofer und Dr. Peter Ruf für das interessante Projekt, die Bereitstellung der therapeutischen Antikörper sowie die vielen hilfreichen Gespräche. Eure Begeisterung für die Sache hat mich immer wieder aufs Neue motiviert. Für die intensive Einarbeitung und das anhaltende Interesse an meiner Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Nina Eißler bedanken. Du bist eine großartige Wissenschaftlerin. Dr. Raymund Buhmann danke ich für seinen Vorschlag, die trifunktionalen Antikörper subkutan zu applizieren, sowie den wissenschaftlichen Austausch zu diesem Thema. Dr. Frauke Neff und Dr. Michaela Aichler danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und ihre Expertise auf dem Gebiet der Immunhistochemie. Mein aufrichtiger Dank gilt außerdem den Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Hämatologikums für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen des IMI für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit mit Euch. Ein besonderes Dankeschön gebührt der AG Mocikat – Albert, Nadine, Tanja, Fatima, David und Josia – für das respektvolle und freundschaftliche Miteinander sowie hilfreiche Gespräche und eure tatkräftige Unterstützung – ein besseres Arbeitsumfeld kann man sich nicht wünschen.

Während aller Hochs und Tiefs der letzten drei Jahre konnte ich mir der Unterstützung durch meine Familie und meine lieben Freunde immer sicher sein. Vor allem aber war mein lieber Jonas für mich da, hat Freud und Leid geteilt und fest an mich geglaubt. Ich bin euch – und für euch – zutiefst dankbar.