

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**Funktionalität, Spezifität und Wirkmechanismus von
synthetic agonistic receptor T- Zellen in Kombination mit
tetravalenten, bispezifischen Antikörpern**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Moritz Luigi Schmidbauer

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. Andreas Humpe
PD Dr. Andreas Moosmann

Mitbetreuung durch:
Prof. Dr. Sebastian Kobold

Dekan:
Prof. Dr. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2019

Für Monika, Albert
und Marlene

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Tumorimmunologie	1
1.1.1 Wechselseitige Beeinflussung von Tumor und Immunsystem.....	1
1.1.2 Klinische Anwendung immuntherapeutischer Strategien.....	1
1.2 Antikörper.....	2
1.2.1 Antikörper als Teil des adaptiven Immunsystems	2
1.2.2 Monospezifische Antikörper.....	3
1.2.3 Bispezifische Antikörper	4
1.3 Adoptiver T-Zelltransfer	5
1.3.1 Grundlagen des adoptiven T-Zelltransfers.....	5
1.3.2 Wirkungsweise und Limitationen der CAR T-Zell-Therapie.....	5
1.4 Kombination bispezifischer Antikörper mit T-Zell-aktivierenden Fusionsproteinen zur Tumorimmuntherapie.....	6
1.5 Fragestellung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Geräte und Reagenzien	10
2.2 Tierversuche	16
2.2.1 <i>In-vivo</i> -Tumormodelle	17
2.3 Zelluläre Methoden	17
2.3.1 Zellkulturbedingungen.....	17
2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität.....	17
2.3.3 Kultivierung von Tumorzelllinien.....	17
2.3.4 Retrovirale Transduktion primärer muriner T-Lymphozyten	18
2.3.5 Zytotoxizitätsmessungen.....	19
2.4 Immunologische Methoden.....	20
2.4.1 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)	20
2.4.2 Durchflusszytometrie.....	20
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.5.1 Re-Transformation und Isolierung retroviral er Vektoren.....	21
2.5.2 Isolation zytoplasmatischer RNA	21
2.5.3 Reverse Transkription	21
2.5.4 Quantitative Real-time PCR	21
2.6 Statistische Analyse	21

3 Ergebnisse	23
3.1 Funktionalität und Spezifität der Kombinationstherapie <i>in vitro</i>	23
3.1.1 IFN- γ Sekretion nach Stimulation von SAR+ T-Zellen durch bispezifische Antikörper	23
3.1.2 Zytotoxizität nach Stimulation von SAR+ T-Zellen durch bispezifische Antikörper	24
3.2 Wirkmechanismus der Stimulation via bispezifischer Antikörper und SAR ...	26
3.2.1 Charakterisierung von EGFR-Interaktionspartnern als potentielle Liganden der SAR-Fusionsproteine.....	26
3.2.2 Vergleich von löslichen und immobilisierten SAR-Agonisten.....	27
3.2.3 Korrelation der relativen bsAk:SAR Bindung zu erreichter Zytotoxizität zur Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung.....	27
3.3 Charakterisierung der T-Zell-vermittelten Effekte.....	28
3.3.1 Lysekapazität SAR+ T-Zellen.....	29
3.3.2 Immunologischer Phänotyp und Proliferationskapazität der T-Zellen	30
3.3.3 Relevanz löslicher und membranständiger Effektoren bei T-Zell-vermittelter Tumорlyse	31
3.4 Kombinationstherapie im murinen B16-OVA-EpCAM und Panc-OVA-EpCAM-Modell <i>in vivo</i>	33
4 Diskussion	35
4.1 SAR als Basis für T-Zell-vermittelte Zytokinsekretion, Zytotoxizität und Differenzierung.....	35
4.1.1 EGFRvIII und Cripto als restriktiv exprimierte Ektodomänen und funktionelle Bestandteile von SAR.....	35
4.1.2 Die Komposition von Transmembran- und Endodomänen als Grundlage für das stimulatorische Potential der SAR.....	37
4.1.3 Design der extrazellulären Komponenten als Determinanten der T-Zellaktivität bei Stimulation via SAR.....	37
4.1.4 SAR vermittelt eine Differenzierung zu Gunsten eines T _{EM} -Phänotyps	38
4.2 Spezifität als Funktion der Valenz SAR-bindender Liganden.....	39
4.2.1 Aggregation, Konformationsänderung und Segregation als mögliche Wirkmechanismen für Signaltransduktion via SAR.....	39
4.3 Bispezifische Antikörper als molekulare Adapter.....	41
4.3.1 AdAPTERmoleküle führen zur verbesserten Steuerung von Spezifität und biologischer Aktivität der T-Zelltherapie.....	41
4.3.2 Selektive Markerantigene erlauben eine gezielte Rekrutierung von Effektorzellsubtypen.....	42
4.3.3 Serielle Lyse durch SAR+ T-Zellen.....	42

4.4 SAR-induzierte Zytotoxizität ist unabhängig von der Granzym-Perforin Achse	43
4.5 Wirksamkeitsnachweis der Kombinationstherapie <i>in vivo</i>	45
4.6 Ausblick	46
5 Zusammenfassung	47
6 Literaturverzeichnis	48
7 Verzeichnis der Abkürzungen	60
8 Publikationen	62
8.1 Vorträge	62
8.2 Veröffentlichte Arbeiten	62
9 Danksagung	63

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Tumorimmunologie

1.1.1 Wechselseitige Beeinflussung von Tumor und Immunsystem

Die Tumorimmunologie beschreibt immunologische Vorgänge im Zusammenhang mit der Entstehung und dem Progress von Tumoren. Mit der Fähigkeit zur Erkennung und Elimination von malignen Zellen nimmt das Immunsystem eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von neoplastischen Erkrankungen ein. Bei regelrechter immunologischer Funktion werden entartete Zellklone entsprechend erkannt und im Verlauf eliminiert (Hanahan et al., 2011). Diesen Prozess bezeichnet die Fachliteratur als immunologische Überwachung (*immunosurveillance*). Dies kann gleichzeitig, aber auch Initialstadium eines möglicherweise progressiven Verlaufs einer Neoplasie sein. In diesem Zusammenhang werden weitere Stadien der immunologischen Funktion unterschieden, und als Eliminierung, Equilibrium, und Entrinnen bezeichnet. Der gesamte Prozess der wechselseitigen Beeinflussung im Verlauf einer neoplastischen Erkrankung wird mit dem Begriff *immunoediting* zusammengefasst (Dunn et al., 2004).

Gelingt es im Rahmen der *immunosurveillance* nicht alle entarteten Zellen zu eliminieren, tritt nach dem Modell des *immunoediting* eine Phase des Gleichgewichts, beziehungsweise Equilibrium ein. Die immunologische Kontrolle verhindert zwar ein starkes Wachstum des Tumors, es gelingt aber nicht alle entarteten Zellklone zu eliminieren. Somit stellt diese Stufe in dem Modell neben der Phase der Eliminierung einen potentiell stabilen Endpunkt dar, der sich klinisch über viele Jahre inapparent zeigen kann. Durch die stetige Interaktion zwischen Tumor, tumor-assoziiertem Stroma und dem Immunsystem kann es zu einem Selektionsdruck auf den Tumor kommen, der die Qualität des Tumors im Sinne des zellulären Phänotyps verändert, während die Quantität der Tumorzellen in etwa konstant bleibt (Grivennikov et al., 2011; Vesely et al., 2011).

Verliert das Immunsystem die Fähigkeit den Tumor zu erkennen und zu eliminieren, bzw. kann es aufgrund von Immunsuppression diese Funktionen nicht mehr wahrnehmen, wird das Gleichgewicht zu Gunsten des Tumorwachstums verändert und es kommt zu einem konsekutiven Auswachsen, beziehungsweise Entrinnen, des Tumors (Mittal et al., 2014).

1.1.2 Klinische Anwendung immuntherapeutischer Strategien

Vor dem Hintergrund der prinzipiellen Wirksamkeit der immunologischen Überwachung zielen therapeutische Anstrengungen grundsätzlich darauf ab, eine wirksame anti-tumorale Immunität wiederherzustellen, beziehungsweise *de novo* zu generieren. Im

Wesentlichen können dabei passive sowie aktive Ansätze unterschieden werden (Schuster et al., 2006).

Passive Ansätze beschreiben die Rekonstitution der anti-tumoralen Immunität durch Gabe spezifischer Effektormoleküle. Da die therapeutische Wirksamkeit durch das Molekül vermittelt wird, ist diese durch die biologische Verfügbarkeit und dessen Halbwertszeit begrenzt. Bei den adressierten Antigenen handelt es sich dabei in der Regel um Tumor-assoziierte Antigene (TAA). Als klinisch weit verbreitetes Beispiel für passive Immuntherapien kann die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern genannt werden. Dieser Ansatz ist bereits seit 1997 Teil der klinischen Routine und stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Tumortherapie dar (Maloney et al., 1997).

Aktive Formen der Immuntherapie sollen eine endogene Reaktion hervorrufen und sind demnach auch auf andere - dem Patienten eigene - Faktoren angewiesen. Im Gegensatz zu passiven Therapieformen sind dabei oft nicht Tumorzellen, sondern vielmehr Immunzellen Ziel der therapeutischen Moleküle. Vielfach zeigten sich höhere therapeutische Wirksamkeiten im Vergleich zu konventionellen, tumor-zentrierten Ansätzen. Relevante Beispiele hierfür umfassen unter anderem Antikörper der Gruppe der Checkpoint-Inhibitoren, rekrutierende bispezifische Antikörper sowie zelluläre Therapien. Eine strikte Trennung von rein aktiven beziehungsweise passiven Ansätzen ist aufgrund der vielen Übergänge nicht sinnvoll (Schuster, 2006).

1.2 Antikörper

1.2.1 Antikörper als Teil des adaptiven Immunsystems

Antikörper werden als humorale Elemente des adaptiven Immunsystems klassifiziert. Als molekulare Grundlage dient dabei das Re-Arrangieren von DNA-Kassetten, wodurch eine große Diversität an naiven B-Zellen entsteht (Rajewsky, 1996). Für die Sekretion einer quantitativ relevanten Menge spezifischer Immunglobuline (Ig) bedarf es zudem einer sequenziellen Aktivierung der B-Zellen durch die Präsenz des komplementären Antigens sowie, bei so genannten Thymus-abhängigen Antigenen, einer Interaktion mit CD4+ T-Zellen (Jeurissen et al., 2004; Mond et al., 1995; Rajewsky, 1996).

Strukturchemisch bestehen endogene Antikörper aus Polypeptid-Untereinheiten, die nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht als leichte und schwere Ketten bezeichnet werden. Ein Ig-Monomer setzt sich dabei aus je zwei identischen leichten und zwei schweren Ketten zusammen (Harris et al., 1992).

Eine funktionelle Unterscheidung einzelner Domänen wird durch die Einteilung in ein Antigen bindendes Fragment (*fragment antigen binding, Fab*) sowie ein kristallisierbares Fragment (*fragment cristallizable, Fc*) getroffen (Padlan, 1994). Während die Fab-Region mit ihren *complementarity determining regions (CDR)* für die Antigen-Spezifität verantwortlich ist, bestimmt die Fc-Region über mögliche Effektorfunktionen des Antikörpers. Sowohl die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, als auch die komplementvermittelte Zytotoxizität *complement dependent cytotoxicity*, sowie die antikörpervermittelte Phagozytose *antibody dependent cellular phagocytosis* sind mögliche Effektormechanismen von Antikörpern (North et al., 2012; Weiner et al., 2010).

1.2.2 Monospezifische Antikörper

Die Entwicklung der Hybridom-Technologie 1975 durch Milstein und Köhler (Köhler et al., 1975) erlaubte erstmals die Synthese von monoklonalen Antikörpern definierter Spezifität durch Immortalisierung eines spezifischen Plasmazellklons. Damit war der biotechnologische Grundstein gelegt, gezielt Tumorzellen, sowie andere tumorfördernde Strukturen, wie tumor-assoziiertes Stroma oder Zytokine, zu adressieren. Alleine im Jahr 2017 wurden zehn Präparate durch die Behörden neu zugelassen (Kaplon et al., 2018).

Grundsätzlich kann die Wirkung des therapeutischen Antikörpers dabei direkt durch die Blockierung wichtiger Signalwege, beziehungsweise Neutralisierung von löslichen Faktoren, oder über die oben genannten Effektorfunktionen vermittelt werden. Oftmals wirken beide Prinzipien synergistisch (Chames, Van Regenmortel, et al., 2009). Als Beispiele für die Unterbrechung von Signalkaskaden können der anti-CD20 Antikörper Rituximab oder der anti-EGFR Antikörper Cetuximab genannt werden (Scott et al., 2012; Weiner, 2010). Ein Antikörper mit Spezifität gegen lösliche Faktoren ist beispielsweise der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Hurwitz et al., 2004).

Trotz der Erfolge und konsekutiver Implementierung in den klinischen Alltag zeigen monoklonale Antikörper eine Reihe von Limitationen. So spielen bei dem Design der Antigen-bindenden Domäne mögliche unerwünschte Wirkungen wie *on-target-off-tumor*-Effekte oder ein Verlust des Antigens eine Rolle. Bei der Interaktion mit dem Fc-Teil kann eine Beeinträchtigung der Affinität durch Fc-Rezeptor-Polymorphismen, beziehungsweise antikörperseitig durch Fc-Glykosilierung, die therapeutische Fähigkeit des Antikörpers negativ beeinflussen. Auch die Bindung an inhibitorische Fc_yRIIb Rezeptoren kann, sowohl durch kompetitive Hemmung stimulatorischer Rezeptoren, als auch durch Internalisierung des Antikörpers zu einer verminderten Effektivität führen (Chames & Baty, 2009; Lameris et al., 2014). Zuletzt ist auch die Penetration solider Tumoren

eingeschränkt. Dabei sind pharmakokinetische Eigenschaften wie Größe des Moleküls, Halbwertszeit oder Immunogenität in der Zusammenschau mit Gewebedruck und Vaskularisierung von entscheidender Bedeutung (Beckman et al., 2007; Scott, 2012).

Vielversprechende therapeutische Zielstrukturen sind inhibitorische Rezeptoren der T-Zellen, die nach Antigenerkennung im Wesentlichen über die Qualität und das Ausmaß der T-Zell Antwort bestimmen. Eine therapeutische Intervention mit Unterbrechung dieser Liganden-Rezeptoren Achse verspricht somit eine geringere tumor-induzierte Immunsuppression (Pardoll, 2012). Diese Hypothesen wurden in der klinischen Anwendung bestätigt. So zeigte beispielsweise der anti-CTLA4 Antikörper Ipilimumab als erstes Therapieregime ein verlängertes Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem Melanom (Hodi et al., 2010). Auch Antikörper mit Spezifität gegen die *Programmed-cell-death-protein 1 (PD-1) - Programmed-cell-death-protein 1 – ligand-1 (PD-L1)* Achse zeigten herausragende klinische Erfolge in verschiedenen Tumorentitäten (Borghaei et al., 2015; Motzer et al., 2015). Zusätzlich zeigte sich, dass Kombinationstherapien der einzelnen Checkpoint-Inhibitoren synergistisch wirken können (Hellmann et al., 2018; Motzer et al., 2018). Neben Checkpoint-Inhibitoren stehen noch weitere Möglichkeiten zu Verfügung, um T-Zellen gegen Tumoren zu richten, auf die im Folgenden ebenfalls eingegangen werden soll.

1.2.3 Bispezifische Antikörper

Als bispezifische Antikörper (bsAk) werden Antikörper bezeichnet, die über eine Fähigkeit zur simultanen Bindung zweier Antigene besitzen (Kontermann et al., 2015). Während eine Vielzahl an unterschiedlichen Formaten beschrieben wurde, soll hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur auf das für den klinischen Gebrauch zugelassene Format eingegangen werden.

Die Kombination zweier Antigen bindenden Domänen eines bsAk kann dazu genutzt werden die Selektivität an die Zielzelle zu erhöhen (Lameris, 2014). In klinischer Anwendung befinden sich derzeit lediglich Formate, die über den T-Zellmarker CD3 eine Rekrutierung der T-Zellen an die Tumorzellen erleichtern.

2014 wurde ein bispezifischer Antikörper gegen CD19 und CD3 zur Behandlung der refraktären akuten lymphatischen Leukämie in den USA zugelassen (Przepiorka et al., 2015). Blinatumomab besteht aus zwei Antigen-Erkennungsdomänen, die über einen Linker verbunden sind (Bargou et al., 2008). Der *Bispecific T cell Engager (BiTe)* besticht durch hohe Ansprechraten, wird aber in seiner Anwendung vor allem durch Symptome des *cytokine release syndrome (CRS)* limitiert (Goebeler et al., 2016; Heiss et al., 2010;

Nagorsen et al., 2011). Pathophysiologisch handelt es sich bei dem CRS um eine massenhafte Aktivierung diverser Immunzell-Subtypen mit konsekutiver Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Lee et al., 2014). Als weitere limitierende Faktoren dieser Immuntherapien sind zu nennen, dass häufig weitere Behandlungen wie eine allogene Stammzelltransplantation angeschlossen werden müssen, um Rezidive zu verhindern. Darüber hinaus sind diese Molekülformate aufgrund ihrer Größe auch in Bezug auf deren Halbwertszeit limitiert. Zudem untersteht deren Wirkung unverändert der normalen Immunregulation der T-Zellfunktion (Kontermann, 2015; Lameris, 2014). Es sind daher weitere Ansätze erforderlich um die Wirksamkeit von T-Zellen voll auszuschöpfen.

1.3 Adoptiver T-Zelltransfer

1.3.1 Grundlagen des adoptiven T-Zelltransfers

Adoptiver Zelltransfer beschreibt die Isolierung und Re-Infusion von Immunzellen zu Therapiezwecken. Dabei haben sich in der Tumorthерапie T-Zellen als besonders geeignet herausgestellt, da diese Subpopulation über ein hohes zytotoxisches Potential verfügt und sich durch eine hohe Selektivität auszeichnet. Um eine spezifische Erkennung der malignen Zellen zu ermöglichen können entweder bereits TAA spezifische T-Zellen, so genannte *tumor infiltrating lymphocytes* (TILs), oder primär nicht-tumor spezifische, polyklonale T-Zellen isoliert werden. Letzteres benötigt eine zusätzliche gentechnische Modifikation *in vitro*, um eine Tumorspezifität zu erzielen. Dies kann durch Einbringen von zusätzlichen T-Zell Rezeptoren (TZR) oder *chimeric antigen receptors* (CAR) erfolgen (Kalos et al., 2013; Rosenberg et al., 2015). Im folgenden Abschnitt soll näher auf CAR-T-Zellen als einzige bislang zugelassene zell-basierte Therapie eingegangen werden.

1.3.2 Wirkungsweise und Limitationen der CAR T-Zell Therapie

CARs sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne über ein integriertes *single-chain-fragment-variable* (scFv) das komplementäre Antigen binden. Die Aktivierung der CAR-T-Zellen erfolgt durch die intrazellulären Domänen der rekombinanten Rezeptoren, die neben CD3- ζ in den weiterentwickelten CAR-Generationen auch mindestens eine ko-stimulatorische Endodomäne besitzen. Dadurch ist es möglich neben Proteinen auch Proteoglycane, Ganglioside, glykosilierte Proteine und Saccharide zu erkennen. Zudem kann unter Umgehung der *major histocompatibility complex* (MHC)-Restriktion eine spezifische T-Zell Stimulation bewirkt werden (Dai et al., 2016).

Klinische Studien unter Einsatz von anti-CD19-spezifischen CAR-T-Zellen zeigten hohe Ansprechraten bei refraktären B-Zell-Neoplasien bei Kindern und Erwachsenen (Grupp et

al., 2015; Kochenderfer et al., 2015; Lee et al., 2015; Maude et al., 2018). Diese Ergebnisse waren unter anderem Anlass für die Zulassung von anti-CD19-CAR-T-Zellen für Patienten mit refraktärer ALL durch die amerikanische Zulassungsbehörde im Jahr 2017 (Norsworthy et al., 2018).

Trotz dieser Erfolge zeigt die klinische Anwendung auch einige Limitationen von CAR-T-Zellen auf. Analog zu Antikörpern ist die Wahl des Zielantigens zentral für dessen Wirkung. Für die meisten Tumorentitäten kommen hier nur Oberflächenantigene in Betracht. Diese werden zumeist auch in gesundem Gewebe exprimiert und sind somit nicht spezifisch für das Tumorgewebe. Entsprechend sind auch hier *on-target-off-tumor*-, sowie in geringerem Maß *off-target-off-tumor*-Toxizität, sowie die Tumorheterogenität relevante Probleme (Lim et al., 2017). Darüber hinaus behindern lokale und systemische immunsuppressive Mechanismen eine effektive anti-neoplastische Wirkung und machen eine lymphodepletierende Präkonditionierung vor Infusion der Zellen notwendig (Dudley et al., 2008). Außerdem schränken weitere Nebenwirkungen, wie etwa das CRS, die Anwendung ein. Nicht zuletzt stellen auch die gesetzlichen Auflagen und Therapiekosten große Hürden dar (Fesnak et al., 2016; Jackson et al., 2016; Kalos, 2013).

1.4 Kombination bispezifischer Antikörper mit T-Zell-aktivierenden Fusionsproteinen zur Tumorimmuntherapie

Vor dem Hintergrund der bestehenden Defizite der oben genannten zellulären Immuntherapien wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits die Anwendung von T-Zell rekrutierenden bsAk in Kombination mit adoptivem T-Zell Transfer getestet. Ziel war es, bsAk als Adaptermolekül zur Rekrutierung von T-Zellen über inerte Markerantigene einzusetzen. Die Tumorzellerkennung sollte dabei unverändert über TZR-MHC Interaktionen stattfinden, um *off-tumor*-Effekte zu vermeiden.

In präklinischen Modellen gelang es die Wirksamkeit dieser Strategie zu belegen (Kobold, Steffen, et al., 2015). Dennoch war es in den Vorarbeiten nicht möglich, die Tumoren der Versuchstiere vollständig zur Regression zu bringen. In diesem Zusammenhang wurde durch die Arbeitsgruppe postuliert, dass eine direkte Aktivierung durch die Antikörperbindung eine Steigerung des therapeutischen Effekts nach sich ziehen könnte. Zur Testung der Hypothese wurden durch einen weiteren Doktoranden, Mathias Kurzay, aktivierende Fusionsproteine generiert. Diese bestehen jeweils aus einer extrazellulären Domäne, die natürlicherweise nicht auf T-Zellen vorkommt. Für die Konstrukte wurden *epithelial-growth factor receptor transcript -variant III* (EGFRvIII), beziehungsweise *cryptic antigen 1* (Cripto) als Ektodomänen verwendet und mit je zwei intrazellulären Domänen zur T-Zellaktivierung (CD28 und CD3- ζ) verknüpft. Somit sollte die

Antigenerkennung und Rekrutierung der T-Zelle durch das Adaptermolekül (ein bispezifischer Antikörper, im Folgenden als bsAk bezeichnet) vollzogen werden, während über das Fusionsprotein nach Bindung des entsprechenden bsAk die T-Zelle MHC-unabhängig aktiviert wird. Dadurch sollte erreicht werden, dass durch die bsAk ein biotechnologischer Schalthebel implementiert wird, der beispielsweise bei Verlust des TAA, oder bei Auftreten unerwarteter Toxizität, auf Basis der biologischen Halbwertszeit einen Therapiestopp, beziehungsweise eine Änderung der Spezifität, erleichtert. Gleichzeitig wird eine Spezifität für Markerantigen-positive T-Zell Subpopulation erreicht, wodurch im Gegensatz zur Bindung an Pan-T-Zell Marker wie CD3 nur transduzierte T-Zellen rekrutiert werden. Zusammenfassend stellt dieses Konzept also einen vielversprechenden Ansatz zur Lösung zentraler Probleme der zell- und antikörperbasierten-Tumortherapie dar.

Die prinzipielle Funktionalität des Ansatzes konnte in einer Vorarbeit bereits gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit war es somit, die biotechnologische Plattform, deren Fusionsproteine im Folgenden als *synthetic agonistic receptors (SAR)* bezeichnet werden, näher zu charakterisieren.

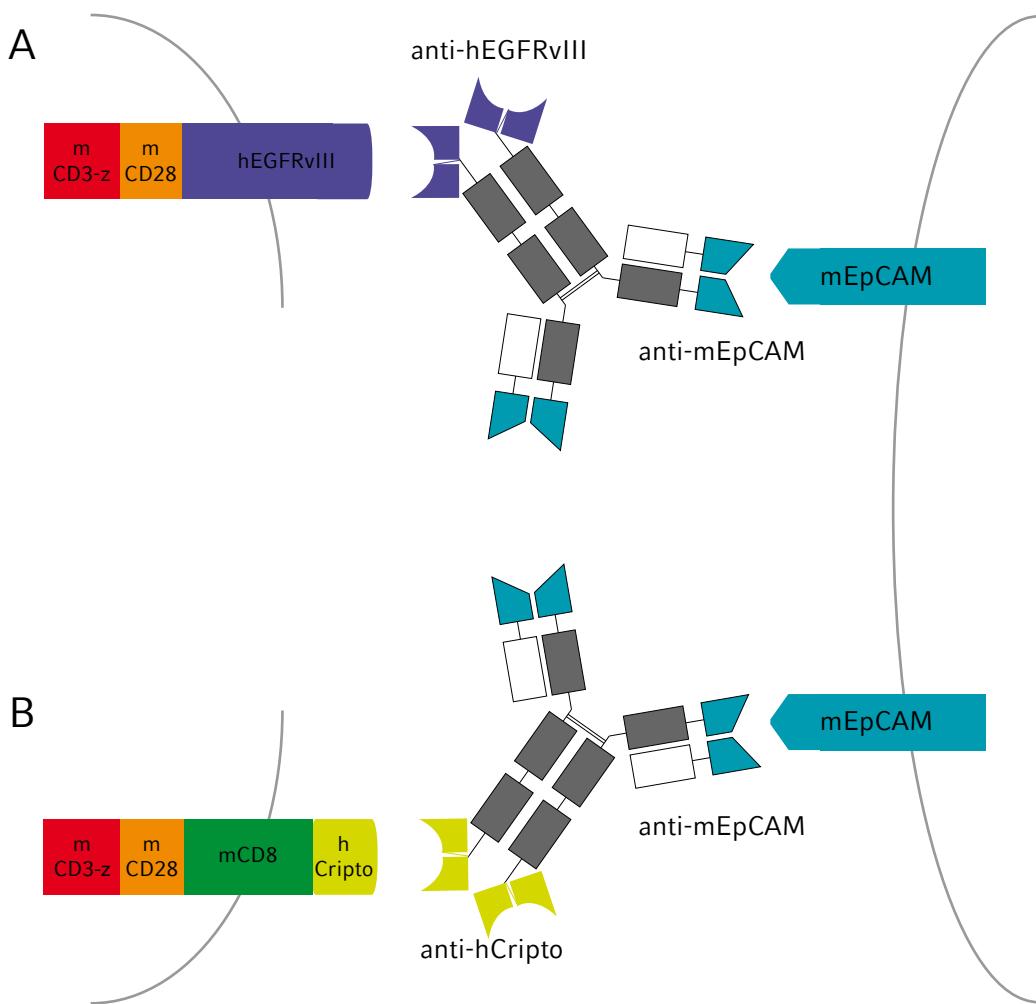


Abbildung 1: Funktionsprinzip der Kombinationstherapie aus *synthetic agonistic receptor (SAR)* – positiven T-Zellen und bsAk

Dargestellt sind die verwendeten IgG-ähnlichen, tetravalenten Antikörper im 2 + 2 Format. Sie basieren auf einem murinen anti-EpCAM-IgG2a-Gerüst und wurden mit jeweils zwei scFv verbunden.
Als funktionelle SAR wurden das Fusionsprotein E3 (EGFRvIII-CD28-CD3- ζ) (**A**) und C3 (Cripto-CD8-CD28-CD3- ζ) (**B**) verwendet.

1.5 Fragestellung

Zusammenfassend kann das Ziel der vorliegenden Dissertation in folgende Punkte unterteilt werden:

1. Untersuchung von SAR+ T-Zellen in Kombination mit bsAk (anti-EpCAM x anti-EGFRvIII/anti-EpCAM x anti-Cripto) *in vitro*:
 - a. Funktionalität und Spezifität der Kombinationstherapie *in vitro*
 - (1) Bestimmung der T-zellvermittelten Zytokinsekretion
 - (2) Bestimmung der T-zellvermittelten Zytotoxizität
 - (3) Bestimmung der Spezifität für das tumor-assoziierte Antigen EpCAM
 - b. Wirkprinzip der Kombinationstherapie
 - (1) Identifizierung notwendiger Faktoren zur Lyse via bsAk und SAR
 - (2) Charakterisierung von membranständigen und löslichen Effektoren einer SAR-induzierten Zytotoxizität
 - (3) Charakterisierung der Pharmakodynamik zwischen bsAk und transduzierten Fusionsproteinen
 - c. Charakterisierung der Proliferationskapazität und der phänotypischen Veränderungen nach Stimulation *in vitro*
2. Machbarkeitsstudie *in vivo* im Mausmodell unter Verwendung von B16-OVA-EpCAM und Panc-OVA-EpCAM Tumorzelllinien

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

Tabelle 1: Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ – Brutschrank (BD6220)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
FACSCanto II	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühl- und Gefrierschränke 4°C, -20°C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland) Liebherr (Bieberach an der Riß, Deutschland)
Herasafe Laminar Flow	Heraeus (Hanau, Deutschland)
iCELLigence Messeinheit mit Zellkulturplatte E Plate L8 PET	ACEA Biosciences (San Diego, USA)
iCELLigence Kontrolleinheit (iPad)	Apple (Cupertino, USA)
Konfokales Mikroskop TCS SP5 II	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mithras LB940 ELISA Reader	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer Hämocytometer Optik	Labor Frischknecht (Balgach, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Schüttler	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortex VF2	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vakuumpumpe 2522Z-02	Welch (Niles, USA)
Waage CPA 1003S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Waage SCALTEC SBC21	Scaltec (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 2: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Blasticidin	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Calciumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)	Lonza (Basel, Schweiz)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco Products (Grand Island, USA)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES 1M)	Lonza (Basel, Schweiz)
Isofluran	Abbott (Zug, Schweiz)
Isopropanol (70%, 100%)	Apotheke der LMU (München, Deutschland)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin 200mM	Lonza (Basel, Schweiz)
Manganchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid 0,9%	Apotheke LMU (München, Deutschland)
Natrium-Pyruvat	Lonza (Basel, Schweiz)
Penicillin/ Streptomycin	Lonza (Basel, Schweiz)
Puromycin	Invivogen (Toulouse, Frankreich)
Retronectin	TaKaRa (Shiga, Japan)
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	Lonza (Basel, Schweiz)
Rubidiumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure 2N	Apotheke der LMU (München, Deutschland)
Phosphate buffered saline (PBS)	Lonza (Basel, Schweiz)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin (10x)	Lonza (Basel, Schweiz)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 3: Kommerzielle Reagenziensets

Bezeichnung	Hersteller
Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Murines Interferon-γ (INF-γ)	
ELISA Murines Granzyme B	R&D (Minneapolis, USA)
RNeasyMicro Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Plasmidpräparationssystem PureYield™	Promega (Madison, USA)
Zytotoxizitätsassay CytoTox96®	Promega (Madison, USA)

Tabelle 4: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocking Puffer	2 % BSA in PBS
Erylyse Puffer	10 % BD Lyse in ddH ₂ O
ELISA Puffer 1	7,13 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ 1,0 L ddH ₂ O Titration zu pH = 9,5 mit 1M NaOH
ELISA Puffer 2	10 % FBS in PBS
ELISA Waschpuffer	0,05 % Tween20 in PBS
Allgemeiner Waschpuffer	25 mM HEPES in PBS
Transfektionspuffer	1,6 g NaCl 74 mg KCL 50 mg Na ₂ HPO ₄ 1 g HEPES 100 ml ddH ₂ O Titration mit NaOH bzw. HCl zu pH = 6,76

Tabelle 5: Medienansätze in der Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM Vollmedium	DMEM +10 % FBS +1 % L-Glutamin +1 % Penicillin/Streptomycin
Plat E Selektionsmedium	DMEM +10 % FBS +1 % L-Glutamin +1 % Penicillin/Streptomycin +10 µg/ml Blasticidin +1 mg/ml Puromycin
Plat E Transfektionsmedium	DMEM +10 % FBS

	+1 % L-Glutamin +1 % Penicillin/Streptomycin
T-Zell Medium	RPMI +10 % FBS +1 % L-Glutamin +1 % Penicillin/Streptomycin +1 % Natrium Pyruvat +0.1 % HEPES Puffer
Zytotoxizitätsmedium	RPMI ohne Phenolrot +1 % FBS +1 % L-Glutamin +1 % Penicillin/Streptomycin +1 % Natrium Pyruvat +0.1 % HEPES Puffer

Einweg-Plastikmaterialien für die Verwendung in der Zellkultur wurden von den Firmen BD Falcon (Franklin Lakes, USA), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning, USA), Greiner-Bio One (Kremsmünster, Deutschland), Millipore (Billerica, USA) und Sartorius (Göttingen, Deutschland) erworben.

Tabelle 6: Unkonjugierte Antikörper

Spezifität	Klon	Speziesreakтивität	Herkunft
Anti-CD3ε	145-2C11	Maus	eBioscience, (San Diego, USA)
Anti-CD28	37.51	Maus	eBioscience, (San Diego, USA)
Anti-Cripto	-	Mensch	Roche, (Penzberg, Deutschland)
Anti-EGFR (Cetuximab)	-	Mensch	Apotheke Großhadern (LMU), (München, Deutschland)
Anti-EGFR (Panitumumab)	-	Mensch	Apotheke Großhadern (LMU), (München Deutschland)
Anti-Cripto	Polyklonal	Mensch, Maus	Thermo scientific, (Waltham, USA)

Die verwendeten Konzentrationen der in Tabelle 6 genannten Antikörper werden jeweils in der Beschreibung der entsprechenden Versuche spezifiziert.

Tabelle 7: Konjugierte Antikörper

Spezi- fität	Klon	Isotyp	Wirt	Reak- tivität	Fluoro- chrom	Ver- dünnung	Herkunft
Anti- Vα2 TZR	B20.1	IgG2a	Ratte	Maus	FITC	1:2000	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Anti- EGFR	AY13	IgG1, κ	Maus	Mensch	APC	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CD8a	53-6.7	IgG2a, κ	Ratte	Maus	FITC	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CCR7	4B12	IgG2a, κ	Ratte	Maus	PerCP Cy 5.5	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CD62L	MEL-14	IgG2a, κ	Ratte	Maus	Pacific Blue	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CD69	H1.2F3	IgG	Hamster	Maus	Pe-Cy 7	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CD279	29F.1A12	IgG2a, κ	Ratte	Maus	Pe-Cy 7	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- CD223	C9B7W	IgG1, κ	Ratte	Maus	PerCP Cy 5.5	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- Ki67	16A8	IgG2a, κ	Ratte	Maus	PE	1:2000	Biolegend (San Diego, USA)
Anti- IgG	Poly-klonal	IgG	Ziege	Maus	CY2	1:100	Jackson Immuno- Research (Suffolk, UK)

Tabelle 8: Bispezifische Antikörper

Spezifität	Reaktivität	Herkunft
Anti-EpCAM x anti-Cripto	Human, Murin	Roche (Penzberg, Deutschland)
Anti-EpCAM x anti-EGFRvIII	Human, Murin	Roche (Penzberg, Deutschland)

Tabelle 9: Fusionsproteine gemäß Klonierung durch M. Kurzay

Bezeichnung	Ektodomäne	Transmembrandomäne	Endodomäne
E3	EGFRvIII (human, Uniprot Eintrag P00533 AA 1-29, 298-646)	CD28 (murin, Uniprot Eintrag P10747 AA 178-218)	CD28 (murin, Uniprot Eintrag P10747 AA 178-218)
			CD3- ζ (murin, Uniprot Eintrag P20963 AA 52-164)
C3	Cryptic antigen 1 (human, Uniprot Eintrag P13385 AA 31-150)	CD8a (murin, Uniprot Eintrag P01731 AA 153- 196)	CD28 (murin, Uniprot Eintrag P10747 AA 178-218)
			CD3- ζ (murin, Uniprot Eintrag P20963 AA 52- 164)
hEGFRvIII	EGFRvIII (human, Uniprot Eintrag P00533 AA 1-29, 298-646)	EGFRvIII (human, Uniprot Eintrag P00533 AA 1- 29, 298-646)	EGFRvIII (human, Uniprot Eintrag P00533 AA 1-29, 298-646)
hCripto-CD8	Cryptic antigen 1 (human, Uniprot Eintrag P13385 AA 31-150)	CD8a (murin, Uniprot Eintrag P01731 AA 153- 196)	-

Tabelle 10: Zelllinien

Bezeichnung	Zugrunde liegende Zelllinie	Gentechnische Modifikation	Verwendetes Medium
Panc-OVA	Murines, duktales Pankreas-Karzinom (Panc02)	pAC-Neo-OVA	DMEM Vollmedium
Panc-OVA-EpCAM	Murines, duktales Pankreas-Karzinom (Panc02)	pAC-Neo-OVA pMXs-EpCAM	DMEM Vollmedium
B16-OVA-EpCAM	Murines Melanom (B16-F10)	pAC-Neo-OVA pMXs-EpCAM	DMEM Vollmedium
Platinum E	Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293T)	pGag-pol-IRES-bs ^r pEnv-IRES-puro ^r	Plat E Selektionsmedium

Tabelle 11: Zusätze zur Selektion und Kultur muriner T-Zellen

Zusatz	Konzentration
Beta-Mercaptoethanol	50 µM
IL-2	10 U/ml
Anti-CD3ε	1 µg/ml
Anti-CD28	0,1 µg/ml

Tabelle 12: Verwendetet Antikörper zur Detektion der Transgene mittel Durchflusszytometrie

Transduziertes Fusionsprotein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
E3, EGFRvIII	Cetuximab	Anti-human IgG, FITC
C3, Cripto-CD8	Anti-Cripto	Anti-Hase IgG, FITC

Tabelle 13: Primersequenzen, Sonden und Effizienzen der rt-PCR Ansätze

Genprodukt	Sequenz	Sonde	Effizienz
Beta Aktin, murin	L: AAGGCCAACCGTGAAAAGAT R: GTGGTACGACCAGAGGCATAC	#56	1,92
FasL/CD95L, murin	L: GCTGTGAGAAGGAAACCCTTT R: TGGGGACATGGGTAATTCAT	#23	1,99
TRAIL, murin	L: GCTCCTGCAGGCTGTGTC R: CCAATTGGAGTAATTGTCCTG	#76	1,88
Granzym B, murin	L: CTGGCCTCCAGGACAAAG R: ATAAGAAGCCCCACATATC	#66	1,95

Tabelle 14: Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Creative Suite 6	Adobe Systems (San Jose, USA)
Endnote X7	Thomson Reuters (New York, USA)
FlowJo 8.7	Tree Star (Ashland, USA)
GraphPad 5.0b	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office 2011	Microsoft (Redmond, USA)

2.2 Tiersuche

Mäuse der Linie C57BL/6 wurden als Versuchstiere genutzt und von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Zum Zweck der Organentnahme, sowie für Therapieversuche, wurden die Tiere in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der Universität München gehalten. Die Versuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.1 *In vivo* Tumormodelle

Die Applikation der B16-OVA-EpCAM und Panc-OVA-EpCAM Tumorzellen erfolgte subkutan mit einer Zellmenge von 2×10^4 , beziehungsweise 2×10^6 Zellen in Suspension mit PBS Trägerlösung nach Randomisierung der Versuchstiere im Alter von sechs Wochen. Es wurde im Verlauf die mittlere Tumorfläche durch Messung des größten Durchmessers multipliziert mit der Länge der jeweiligen Orthogonalen berechnet. Der gesundheitliche Status der Versuchstiere wurde gemäß den Auflagen im Tierversuchsantrag kontrolliert und dokumentiert. Abbruchkriterien, die zur Entfernung eines Tieres aus der Versuchsgruppe geführt haben, wurden anhand des Bewertungsbogens des Tierversuchsantrags festgelegt. Konkret führte eine Tumoroberfläche von $> 225 \text{ mm}^2$ oder eine Ulzeration des Tumors zum sofortigen Versuchsstopp beim entsprechenden Individuum. Eine starke Gewichtsabnahme, auffälliges Verhalten, Blutbeimengungen des Kots oder auffällige Atemmuster wurden zu einem im Tierversuchsantrag definierten Score zusammengefasst und führten bei Überschreiten des zulässigen Werts ebenfalls zum Versuchsabbruch.

2.3 Zelluläre Methoden

2.3.1 *Zellkulturbedingungen*

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° Celsius , 95 % Luftfeuchtigkeit und bei einem CO_2 -Volumenanteil von 5 %. Die Experimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer laminaren Luftströmung durchgeführt.

2.3.2 *Bestimmung von Zellzahl und Viabilität*

Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypanblau-Exklusionstest bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentration der Zellen wurde eine verdünnte Probe unter einem Hämocytometer ausgezählt. Dabei gilt: vitale Zellen / ml = (Zellen / Sektor) x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.3.3 *Kultivierung von Tumorzelllinien*

Zelllinien wurden im entsprechenden Medium gehalten und bei Erreichen einer visuell beurteilten Konfluenz größer 90 % nach Waschen mit PBS mittels Trypsinlösung aus der Kulturflasche gelöst. Nach Zentrifugation bei 400 G für fünf Minuten (min) erfolgte die Resuspension in frischem Medium. Die Kulturen wurden nach jeweils acht Wochen verworfen und durch kryokonservierte Zellen ersetzt.

2.3.4 *Retrovirale Transduktion primärer muriner T-Lymphozyten*

Die Transduktion muriner T-Zellen entspricht einer modifizierten Version bereits publizierter Methoden (Leisegang et al., 2008).

2.3.4.1 Herstellung replikations-defizienter, ecotroper Retroviren

Die Generierung rekombinanter Retroviren umfasst nach diesem Protokoll neben dem retroviralen Vektor pMP71 die Verpackungszelllinie Platinum E als zweite Komponente. Die Zellen wurden vereinzelt und erreichten nach circa 20 Stunden Inkubation die gewünschte Konfluenz von etwa 70 – 80 %. Es folgten eine Transfektion mit einem für das entsprechende Transgen kodierenden Vektor durch Kalzium Präzipitation. Nach etwa sechs Stunden wurde der Überstand gewechselt. Virushaltiger Überstand wurde nach 42 Stunden entnommen. Es folgte eine erneute Inkubation in frischem Medium sowie die Entnahme nach weiteren 24 Stunden.

2.3.4.2 Isolation von Splenozyten und Selektion der T-Lymphozyten

Nach Entnahme der Milz aus einem Versuchstier erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Erylyse. Die anschließende Kultivierung der Splenozyten wurde mit oben benannten Zusätzen durchgeführt.

2.3.4.3 Transduktion der T-Zellen

Der zuvor generierte virushaltige Überstand (42 Stunden Kontaktzeit) wurde mittels Zentrifugation und unter Einsatz von Retronectin an eine Plastikoberfläche gebunden. Die verbleibende Flüssigkeit wurde am Ende vollständig entfernt und verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe der kultivierten T-Zellen in entsprechendem Medium. Während dieses Vorgangs wird die Proliferation der Zellen durch die Stimulanzien 10 U/ml IL-2, 50 µM beta-Mercaptoethanol sowie 4 x 10⁶ *T-Activator-anti-CD3 anti-CD28 beads* pro well unterstützt. Nach 24 Stunden wurde nochmals virushaltiger Überstand (24 Stunden Kontaktzeit) der Kultur beigefügt.

Die Effizienz der Transduktion wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe der oben bereits benannten Primär- und Sekundärantikörper bestimmt.

2.3.4.4 *In vitro* Expansion transduzierter T-Zellen

Die *in vitro* Kultur der T-Zellen erfolgte nach Abschluss der Transduktion in T-Zell Medium unter Zusatz von 50 µM beta-Mercaptoethanol sowie 50 ng/ml rekombinantem IL-15. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 48 Stunden. Für experimentelle Zwecke wurden stets Zellen verwendet, die für maximal neun Tage nach der Isolation aus dem Versuchstier kultiviert wurden.

2.3.5 Zytotoxizitätsmessungen

2.3.5.1 Nachweis von Zytotoxizität durch photometrische Bestimmung der Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Hierfür wurde das Kit der Firma Promega (Madison, USA) nach Maßgaben des Herstellers angewendet. Der einheitliche Versuchsaufbau bestand aus der Ko-Kultur von $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen zusammen mit einem variierenden Verhältnis an T-Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Dauer des Versuchs betrug 11,5 h. Neben den Ko-Kulturen wurden äquivalente Mengen an T-Zellen und Tumorzellen im selben Versuch mit vorbereitet, um die unspezifische LDH Freisetzung über die Dauer des Versuchs, sowie bei Tumorzellen die maximal mögliche Menge an LDH, feststellen zu können.

2.3.5.2 Nachweis von Zytotoxizität durch kontinuierliche Impedanzmessung (iCelligence)

Zur dynamischen Bestimmung von Zytotoxizität wurde das *iCelligence-RTCA* System verwendet. Das Instrument basiert auf kontinuierlicher Impedanzmessung. Zu diesem Zweck wird ein Stromfluss durch Goldelektroden am Boden der Messplatten generiert. Der als Summe aus biologischem Material und Bauteile des Instruments resultierende Widerstand wird zu gegebenen Zeitpunkten registriert und gespeichert. Dabei wird die Messgröße Zellindex (ZI) als $ZI(x) = (a-b) / b$ in Abhängigkeit von der Zeit ausgelesen, wobei a als Messwert der Versuchsbedingungen, und b als Hintergrundwert gilt.

2.3.5.3 Untersuchung der Dosis-Wirkungskurve durch Darstellung der SAR-Sättigung und dadurch induzierten Zytotoxizität

Zur Messung der Zytotoxizität im Zusammenhang mit Analyse der Dosis-Wirkungskurve wurde die Transduktionseffizienz zunächst auf 30 % eingestellt. Es wurden zunächst 5×10^4 Panc-OVA-EpCAM über 20 - 24 Stunden präinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Kokultur mit $2,5 \times 10^4$ E3 transduzierte T-Zellen, die über 30 min bereits mit bsAk in variablen Konzentrationen bei Zellkulturbedingungen stimuliert wurden. Der Endpunkt

dieses Versuchs lag bei 25 Stunden nach Zugabe der T-Zellen. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden folgende Berechnungen angestellt: Zytotoxizität [%] = [1 - (Ko-Kultur-Hintergrund)] / [Tumor-Hintergrund].

Der Nachweis der Formierung von Fusionsprotein:bsAk Komplexen erfolgte durch durchflusszytometrischer Detektion des Cy2-Flurochroms eines sekundären anti-Maus IgG Antikörpers. Dazu wurden $2,5 \times 10^4$ E3 T-Zellen nach Entnahme aus der Kultur gewaschen und mit 150 µl T-Zell Medium versetzt. Entsprechende Konzentrationen an bsAk wurden in 50 µl PBS hinzugefügt und unter Zellkulturbedingungen für 30 min inkubiert. Es erfolgte ein Waschschnitt und die anschließende Färbung durch 1,5 µg des IgG Sekundärantikörpers. Im direkten Anschluss wurde die *mean-fluorescence-intensity (MFI)* der Proben gemessen.

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe nicht-linearer Regression für Rezeptorbindungen mit einer Bindungsstelle und konstanter nicht-spezifischer Bindung (Fusionsprotein:bsAk Komplexe), beziehungsweise mittels nicht-linearer Regression für Dosis-Wirkungsbeziehungen mit variabler Steigung (Zytotoxizität) der Software *GraphPad* (La Jolla, USA).

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (*ELISA*)

Die genauen Arbeitsabläufe erfolgten gemäß den Vorgaben des jeweiligen Herstellers. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 450 nm und unter Verwendung des Geräts *Mithras Reader*. Die Auswertung wurde mit Hilfe von *Microsoft Excel* unter Verwendung einer Standardgeraden durchgeführt.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Bei dieser Arbeit wurde das Gerät *FACSCanto II* des Herstellers *BD Biosciences* (New Jersey, USA) verwendet. Zur Phänotypisierung wurden $1 - 2 \times 10^6$ Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mit einem Verdünnungsfaktor von 1 : 2000 des entsprechenden Antikörpers für 30 min bei 4°C gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Proben unmittelbar im Zytometer analysiert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 *Re-Transformation und Isolierung retroviraler Vektoren*

Die Isolation der intrazellulär vorliegenden Plasmid-DNA wurde mittels des aufgeführten Produkts der Firma *Promega* (Madison, USA) und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.5.2 *Isolation zytoplasmatischer RNA*

Nach dem Entfernen von Medienresten durch Waschen mit PBS erfolgte die Isolierung zytoplasmatischer RNA mit Hilfe des *RNeasyMicro Kit* des Herstellers *Qiagen* (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Die Arbeitsschritte erfolgten unter ständiger Kühlung sowie unter Verwendung RNase freier Arbeitsmaterialien.

2.5.3 *Reverse Transkription*

Zum Zweck der Amplifikation und weiterer Analysemöglichkeiten wurde die isolierte RNA mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase in complementary-DNA (cDNA) transkribiert. Dies wurde nach den Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) durchgeführt.

2.5.4 *Quantitative Real-time PCR*

In dieser Arbeit wurden der LightCycler 480 des Herstellers *Roche* (Penzberg, Deutschland) verwendet. Zur Analyse wurden 2,5 µl ddH₂O, 0,2 µl Primer *sense*, 0,2 µl Primer *antisense*, 5,0 µl Probes Master, 0,1 µl Sonde mit je 2 µl cDNA pro Kondition vermischt. Die relative Quantifizierung erfolgte mit Bezug auf das konstitutiv exprimierte Gen β-Aktin.

Das Primerdesign wurde nach den Vorgaben des *Roche Universal Probe Library Assay Design Centers* entwickelt. Die verwendeten Hydrolyse-Sonden wurden aus dem Universal Probe Library Set bezogen. Die angegebenen Effizienzen sind durch Erstellung von Verdünnungsreihen und der Analyse der Standardkurve nach -1 + 10 (-1 / Steigung) berechnet worden.

2.6 Statistische Analyse

Im Folgenden erfolgt die Darstellung der Werte als arithmetisches Mittel und die Streuung als Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean, SEM*). Als

Methoden zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student-t-Test für ungepaarte Stichproben, beziehungsweise die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für die Analyse der Tierversuche eingesetzt. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen und die Markierungen *, ** beziehungsweise *** verwendet. Zur Berechnung wurde die Software *GraphPad Prism* (Version 5.0) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionalität und Spezifität der Kombinationstherapie in vitro

3.1.1 INF- γ Sekretion nach Stimulation von SAR+ T-Zellen durch bispezifische Antikörper

Um die Funktionalität der Fusionsproteine zu testen, wurden SAR+ murine T-Zellen (E3 und C3) mit bsAk und den entsprechenden Zielzellen (Panc-OVA-EpCAM) inkubiert. Die Menge der T-Zellen wurde dabei titriert. Als Kontrollen wurden untransduzierte T-Zellen (WT) sowie TAA-negative Zielzellen (Panc-OVA) eingesetzt. Als messbares Korrelat der Stimulation der Zellen wurde die Konzentration von IFN- γ im zellfreien Überstand untersucht.

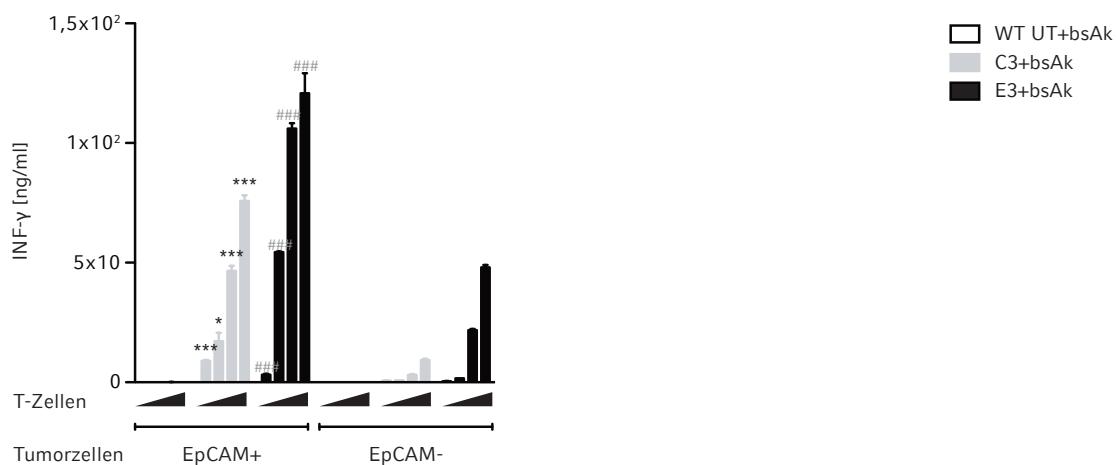


Abbildung 2: Sekretion von murinem INF- γ durch SAR+ T-Zellen

Es wurden jeweils 2×10^4 Tumorzellen mit steigenden Konzentrationen an T-Zellen und 5 µg/ml des jeweiligen bsAk eingesetzt. Als EpCAM - positive Zielzellen wurden Panc-OVA-EpCAM, in den EpCAM - negativen Konditionen wurden Panc-OVA verwendet. Die zellfreien Überstände wurden nach 12 Stunden mittels ELISA auf INF- γ hin quantifiziert. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

Das Signifikanzniveau zwischen den Stichproben C3 + bsAk + Panc-OVA-EpCAM und C3 + bsAk + Panc-OVA ist mit * gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau zwischen den Stichproben E3 + bsAk + Panc-OVA-EpCAM und E3 + bsAk + PancOVA ist mit # gekennzeichnet.

Abbildung 2 zeigt eine deutliche Induktion der INF- γ Sekretion in den Bedingungen E3 und C3 im Vergleich zur untransduzierten Kontrolle. Die INF- γ Produktion und damit die Aktivierung der T-Zellen korreliert darüber hinaus positiv mit der Menge der eingesetzten T-Zellen.

Auch in Kokultur mit Panc-OVA - Tumorzellen wurde eine titrierbare Sekretion des Zytokins beobachtet. Dabei war allerdings im Vergleich die Konzentration an INF- γ in Panc-OVA-EpCAM Kokulturen stets deutlich höher als in Konditionen mit Panc-OVA - Zellen.

3.1.2 Zytotoxizität nach Stimulation von SAR+ T-Zellen durch bispezifische Antikörper

Die zellvermittelte Zytotoxizität wurde durch den Vergleich von untransduzierten gegenüber SAR+ T-Zellen unter Titration der Effektorzellmenge analysiert (Abbildung 3, A). Darüber hinaus wurde die Lyse der Tumorzellen in Abhängigkeit der Präsenz des bsAk anti-mEpCAM x anti-hEGFRvIII durch Impedanz-basierte Echtzeitmessung dargestellt (Abbildung 3, B).

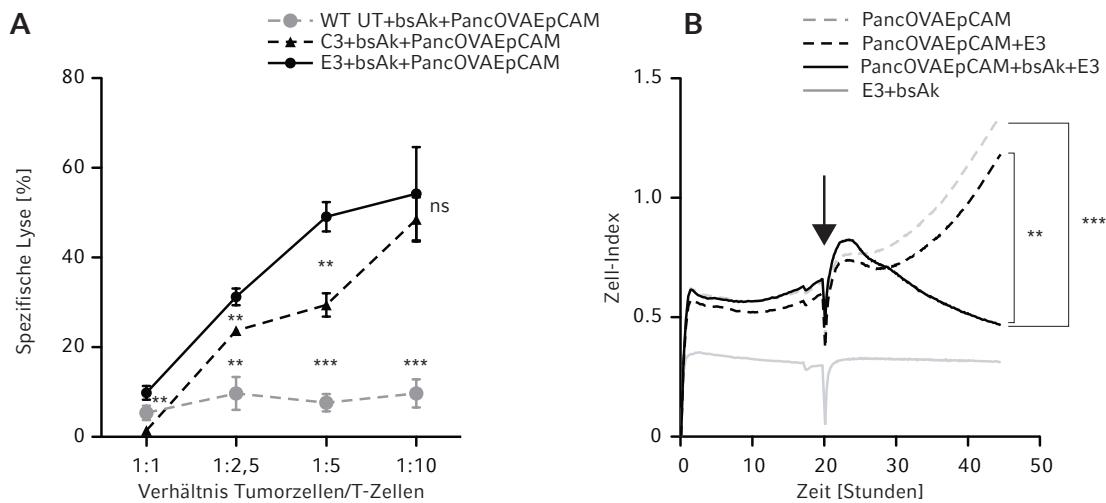


Abbildung 3: Zytotoxizität von SAR+ T-Zellen gegenüber EpCAM+ Tumorzellen

(A) LDH-basierte Ermittlung der spezifischen Lyse von Panc-OVA-EpCAM Zellen in Abhängigkeit der Effektorzellkonzentration unter Verwendung von 5 µg/ml bsAk.
(B) Impedanz-basierte Ermittlung der Lyse von Panc-OVA-EpCAM Zellen in Abhängigkeit der Präsenz des bsAk anti-mEpCAM x anti-hEGFRvIII. Es wurden 0,25µg/ml bsAk, 25 x 10⁴ SAR+ T-Zellen und 5 x 10⁴ Tumorzellen verwendet. Der Zeitpunkt der Zugabe von bsAk und T-Zellen ist durch einen Pfeil markiert. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten Menge an E3 bzw. C3-transduzierter T-Zellen und der Lyse der Panc-OVA-EpCAM Tumorzellen. SAR+ T-Zellen waren in allen Konditionen effektiver als untransduzierte T-Zellen. E3-transduzierte T-Zellen waren in den Verhältnissen 1 : 1, 1 : 2,5 und 1 : 5 C3-transduzierten T-Zellen überlegen.

Die dynamische Echtzeitmessung ergab zusätzlich, dass die anti-tumorale Aktivität nur in Anwesenheit des entsprechenden bsAk abläuft. Zudem zeigte sich, dass eine Lyse auch nach mehr als 20 Stunden nach Beginn der Kokultur noch nachweisbar war. Dabei war die Geschwindigkeit der Lyse annähernd konstant.

Auf Grundlage der Beobachtung dieser unspezifischen Aktivierung durch die verwendeten bsAk wurde die Spezifität der Lyse von Zielzellen bei einer Gesamtkonzentration von 50 ng/ml weiterverfolgt. Die Analyse der Zytotoxizität erfolgte aufgrund der höheren Messgenauigkeit im Folgenden mit einer Impedanz-basierten Echtzeitmessung.

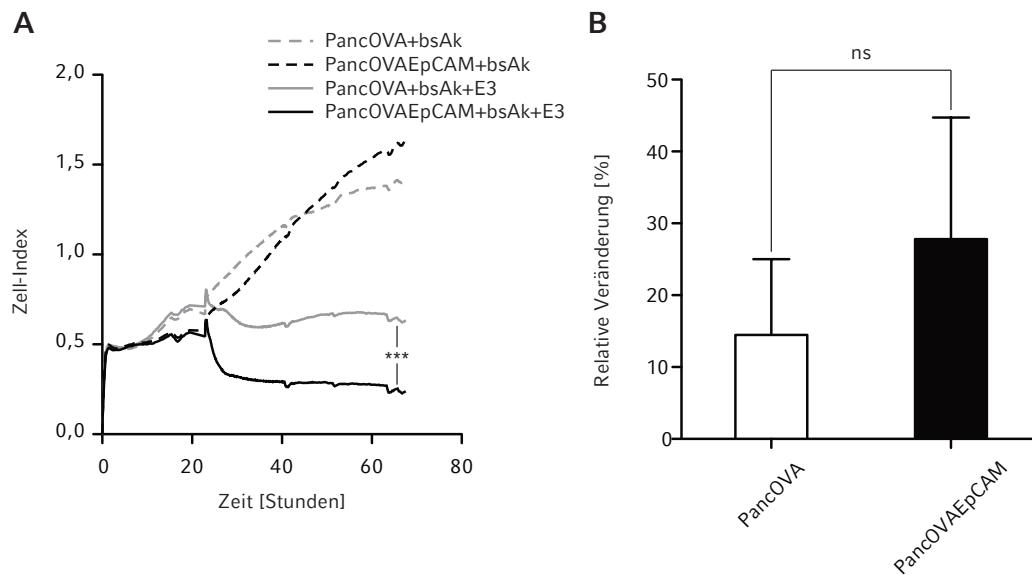


Abbildung 4: Spezifität der T-Zell vermittelten Zytotoxizität für EpCAM

24 Stunden vor Beginn der Kokultur wurden 4×10^4 Tumorzellen eingesetzt. Nach Zugabe von 2×10^5 E3-transduzierten T-Zellen sowie 50 ng/ml bsAk (anti-EpCAM x anti-EGFRvIII) wurde bis zu einer Gesamtversuchsdauer von 45 Stunden die Veränderung des Plattenwiderstands gemessen.

(A) Repräsentatives Einzelexperiment.

(B) Kumulative Darstellung der relativen Reduktion der $AUC_{Ko-Kultur}$ im Verhältnis zum regulären Tumorwachstum AUC_{Tumor} . Die entsprechenden AUC-Werte wurden vom Zeitpunkt der Kokultur (24 h) bis Ende des Experiments (45 h; Dauer der Kokultur 21 h) mittels GraphPad Software erhoben. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 2$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

Abbildung 4 belegt, dass die Kombinationstherapie aus bsAk und E3 T-Zellen bereits nach wenigen Stunden zu einem messbaren Absinken des Zellindex in den Kokulturen führte. Die Konditionen mit den entsprechenden Tumorzelllinien hingegen zeigten in Abwesenheit der T-Zellen eine typische Wachstumskurve. Der Endpunkt unterscheidet sich hinsichtlich des gemessenen Zellindex signifikant. Um für das unterschiedliche Wachstumsverhalten sowie die divergente Level zum Zeitpunkt der Zugabe der T-Zellen zu korrigieren wurde eine *area under the curve* (AUC) Analyse durchgeführt. Diesbezüglich zeigte sich, dass es in den vorliegenden Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied zwischen der T-zellvermittelten Lyse von Panc-OVA-EpCAM-, und Panc-OVA-Tumorzellen gab.

3.2 Wirkmechanismus der Stimulation via bispezifische Antikörper und SAR

3.2.1 Charakterisierung von EGFR-Interaktionspartnern als potentielle Liganden der SAR-Fusionsproteine

Um die Voraussetzungen zur Aktivierung von E3-transduzierten T-Zellen näher zu charakterisieren wurden bekannte EGFR-Liganden als mögliche Interaktionspartner für das Fusionsprotein E3 mit EGFRvIII-Ektodomäne untersucht.

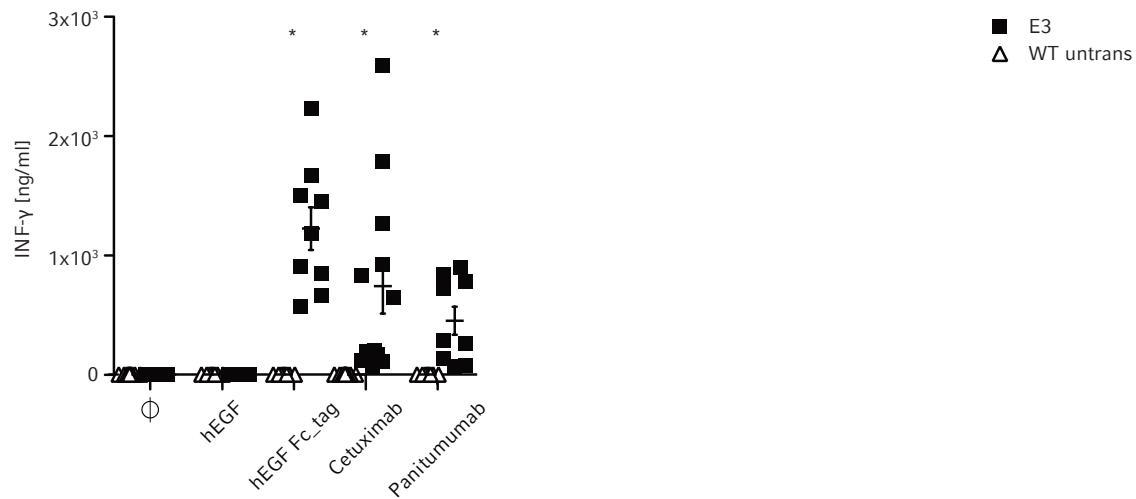


Abbildung 5: Vergleich der INF- γ Sekretion nach Stimulation mit EGFR-Interaktionspartnern

Es wurden je 50 ng der monospezifischen Antikörper Cetuximab und Panitumumab, beziehungsweise von Fc-gebundenem EGF, in 50 μ l PBS über 12 Stunden bei 4° C an die Oberfläche einer Zellkulturplatte gebunden. Der Überstand wurde am Ende der Inkubationszeit entfernt. Danach wurden 2×10^5 T-Zellen in 150 μ l Medium in den Platten kultiviert. Lösliches hEGF (50 ng) wurde in einem Volumen von 50 μ l in PBS-Trägerlösung der entsprechenden Kultur hinzugefügt. Den verbleibenden Ansätzen wurde reines PBS (50 μ l) beigemischt. Die quantitative Analyse der zellfreien Überstände erfolgte nach 48 Stunden Inkubation bei Zellkulturbedingungen mittels ELISA. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM). Das Signifikanzniveau gilt für den Vergleich zu den Konditionen hEGF und Ø.

Die Konditionen Cetuximab, Panitumumab sowie Fc-gebundenes EGF führten im Gegensatz zum Liganden EGF zu einer hohen INF- γ Ausschüttung durch E3-transduzierte T-Zellen. In den untransduzierten Kontrollen war, unabhängig vom Stimulus, keine relevante Zytokinsekretion nachzuweisen (Abbildung 5).

3.2.2 Vergleich von löslichen und immobilisierten SAR-Agonisten

Aus diesem Versuch ergibt sich, dass der wesentliche Unterschied zwischen stimulatorischen und dysfunktionalen Liganden in der Immobilisierung auf dem Plattenboden besteht. Um dies auch für die eingesetzten monospezifischen Antikörper näher zu charakterisieren, erfolgte ein direkter Vergleich von löslichen gegen immobilisierte Antikörper.

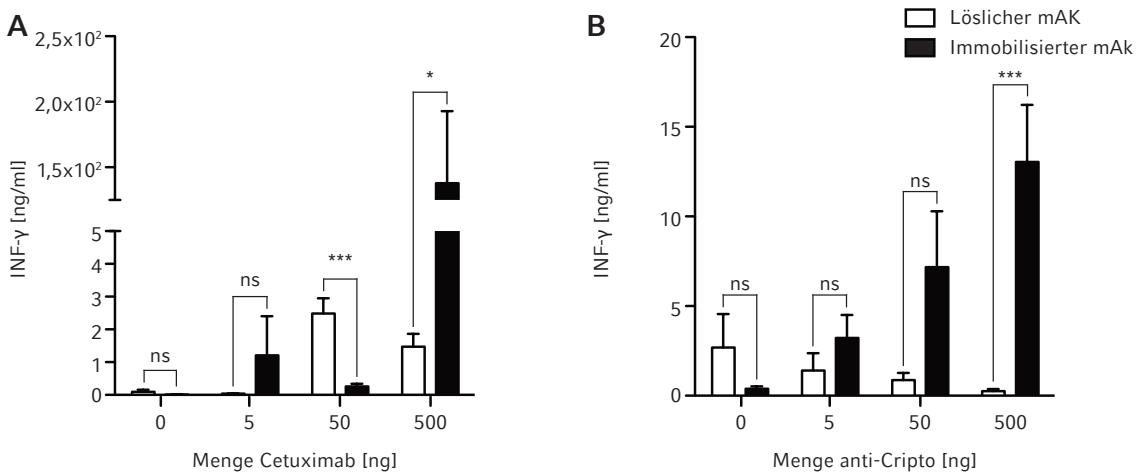


Abbildung 6: Vergleich der INF- γ Sekretion zwischen Stimulation mit gebundenen und löslichen anti-SAR Antikörpern

Zytokinsekretion von transduzierten T-Zellen nach Stimulation mit monospezifischen Antikörpern (mAk) in aufsteigender Konzentration für E3 + Cetuximab (**A**) beziehungsweise C3 + anti-Cripto (**B**). Durch Inkubation von mAk (max. 500 ng) in 50 μ l PBS über 12 Stunden bei 4° C wurden diese an die Oberfläche einer Zellkulturplatte gebunden. Der Überstand wurde nach Inkubation entfernt. Äquivalente Mengen an löslichen Antikörpern wurden in 50 μ l PBS-Trägerlösung den entsprechenden Konditionen beigemischt. Als Kontrolle erfolgte die Zugabe von 50 μ l PBS in bereits mit mAk beschichteten Konditionen, anschließend wurden 2×10^5 T-Zellen in 150 μ l Medium hinzugefügt. Die quantitative Analyse der zellfreien Überstände nach 48 Stunden Inkubation bei Zellkulturbedingungen erfolgte mittels ELISA. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

Die Aktivierung, gemessen an der INF- γ Sekretion, korrelierte sowohl bei E3-, als auch bei C3 transduzierten Konditionen positiv mit der Menge an immobilisiertem mAk. Bei beiden Konditionen fiel die INF- γ Sekretion bei maximaler mAk-Konzentration bei Immobilisierung stärker aus. Auch bei Stimulation mit löslichem Antikörper fand sich eine T-Zellaktivierung (Abbildung 6).

3.2.3 Korrelation der relativen bsAk:SAR Bindung zu erreichter Zytotoxizität zur Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung

Um die Dosisabhängigkeit und den Schwellenwert zur Aktivierung der T-Zellen durch SAR zu definieren, wurde stellvertretend erneut das E3-Fusionsprotein verwendet. Dabei wurde einerseits die Sättigung des Fusionsproteins durchflusszytometrisch, sowie

andererseits die induzierte Zytotoxizität mittels Impedanzmessung, bei ansteigenden Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers untersucht.

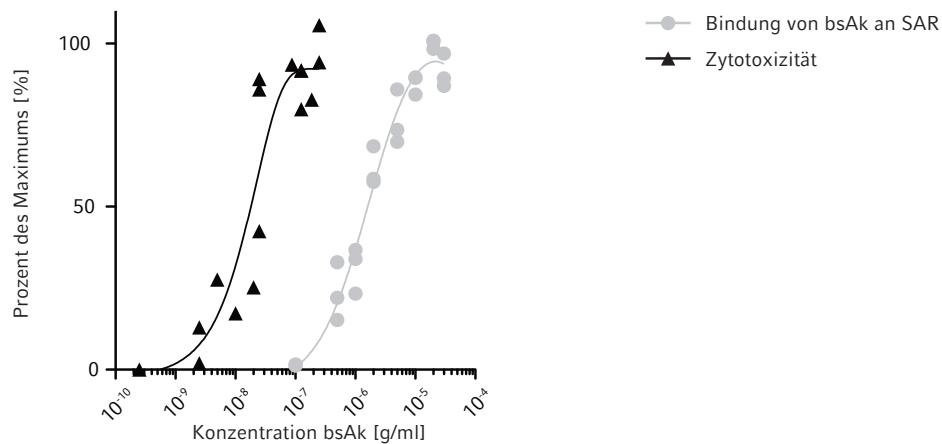


Abbildung 7: Vergleich der Sättigung von E3 und der T-Zell vermittelte Zytotoxizität in Abhängigkeit der Konzentration des bsAk anti-mEpCAM x anti-hEGFRvIII

Für beide Versuchsreihen wurde die Transduktionseffizienz auf 30 % titriert. Jeder Datenpunkt stellt das arithmetische Mittel aus biologischen Duplikaten dar. Die Werte sind auf den jeweiligen Minimal- und Maximalwert normalisiert. Die Abbildung repräsentiert eine kumulative Darstellung der Ergebnisse von n = 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Für beide Parameter stieg der Effekt mit zunehmender Antikörperdosis an (Abbildung 7). Dabei reichte für eine subtotale Lyse bereits eine geringfügige Sättigung der E3 Bindungsstellen aus.

3.3 Charakterisierung der T-Zell vermittelten Effekte

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche phänotypischen Auswirkungen diese Stimulation auf die Effektorzellen hat. Zudem wurde beleuchtet über welche Mediatoren die Lyse vermittelt wird, und inwieweit eine sequentielle Lyse durch T-Zellen in diesem therapeutischen Konzept gegeben ist.

3.3.1 Lysekapazität SAR+ T-Zellen

Vor dem Hintergrund des modularen Charakters des therapeutischen Ansatzes wurde auch untersucht, inwiefern eine sequentielle Lyse durch SAR+ T-Zellen möglich ist. Dazu wurde erneut ein Versuchsaufbau mit Echtzeitmessung der Zytotoxizität gewählt.

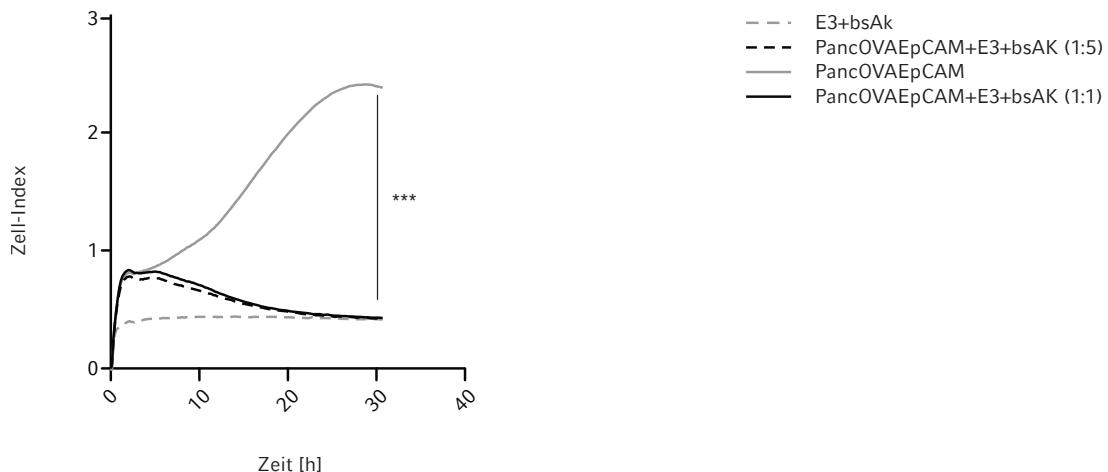


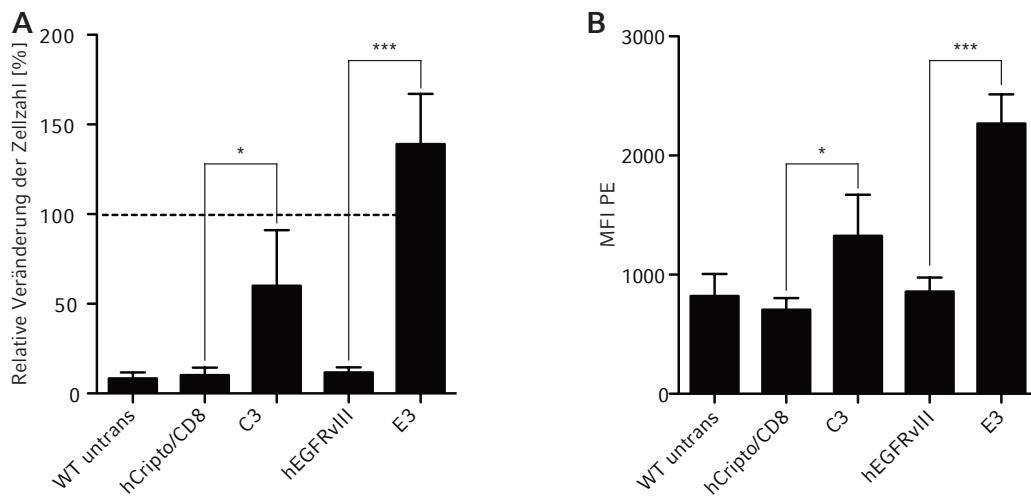
Abbildung 8: Lysekapazität unter Titration des Quotienten von Ziel- zu Effektorzellen

Es erfolgte der Einsatz von 4×10^4 Panc-OVA-EpCAM-Zellen mit 4×10^4 (1:1), beziehungsweise 2×10^5 (1:5) T-Zellen und $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ bsAk (anti-mEpCAM x anti-hEGFRvIII). Die Datenerhebung erfolgte mittels kontinuierlicher Impedanzmessung. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 2$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

In Abbildung 8 zeigen die Tumorzellen ohne Zusatz der Effektorzellen näherungsweise eine sigmoide Wachstumskurve. Die Kokultur zeigte in beiden der dargestellten Zellverhältnisse ein Absinken der Impedanz auf das Niveau der T-Zellkultur. Zusammenfassend kann also von einer totalen Lyse der Tumorzellen ausgegangen werden.

3.3.2 Immunologischer Phänotyp und Proliferationskapazität der T-Zellen

Um das Proliferationsverhalten der SAR+ T-Zellen und deren phänotypischen Veränderung gegenüber den Kontrollen zu untersuchen, wurden die T-Zellen 48 Stunden mit EpCAM+ Tumorzellen unter Präsenz des bsAk kokultiviert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.



Die Kokultur induzierte eine deutliche Proliferation der E3-transduzierten T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 9). Dieser Effekt zeigte sich sowohl in einer erhöhten Zellzahl, als auch durch eine verstärkte Expression des mitotischen Markers Ki67. C3-transduzierte T-Zellen zeigten ebenfalls eine im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Zellzahl. In diesem Fall wurde allerdings das initiale Ausgangsniveau nicht erreicht (Abbildung 9). Auch hier war der Marker Ki67 deutlich hochreguliert.

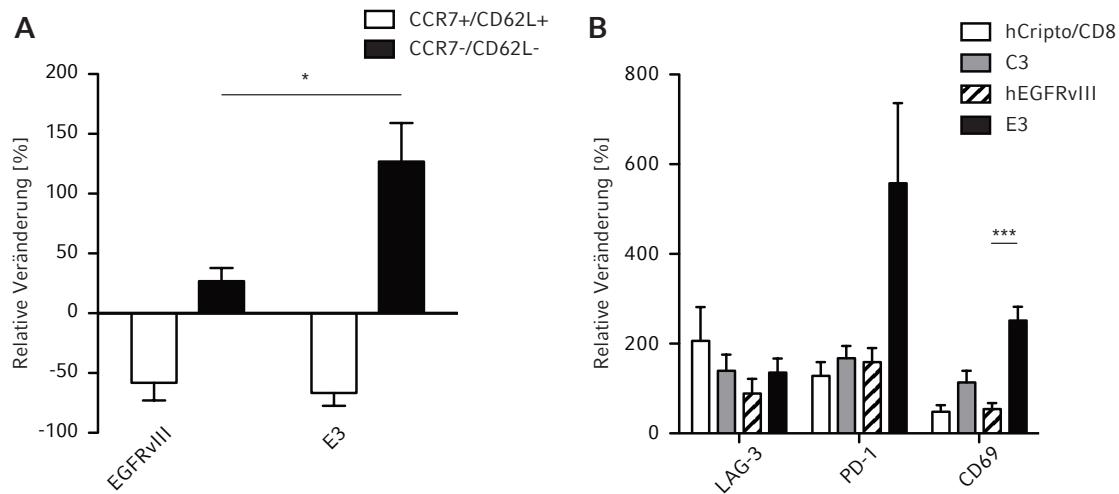


Abbildung 10: Phänotypische Veränderungen E3-transduzierter T-Zellen bei Kokultur mit Panc-OVA-EpCAM Tumorzellen über 48 Stunden

(A) Relative Änderung der CD8+-Transgen+ T-Zellpopulation nach 48 Stunden Kokultur im Hinblick auf Marker für immunologische Gedächtnisfunktionen. **(B)** Expression von LAG-3, PD-1 und CD69 nach 48 h, normiert auf den ersten Messpunkt. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

In Abbildung 10 zeigte sich eine Verschiebung der Zellpopulation zu einer CCR7 und CD62L negativen Zellpopulation. Dieser Effekt ist für E3-transduzierte T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (EGFRvIII) stärker ausgeprägt. Gleichzeitig regulierten E3-transduzierte T-Zellen die Aktivierungsmarker PD1 und CD69, nicht aber LAG-3, hoch. Für C3-transduzierte T-Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, was mit der schwächeren Aktivierbarkeit korreliert.

3.3.3 Relevanz löslicher und membranständiger Effektoren bei T-Zell vermittelte Tumorkytose

Darüber hinaus sollte näher beleuchtet werden, über welchen Mechanismus SAR+ T-Zellen Tumorzellen lysieren. Hierzu wurde die Veränderung der Transkription der Proteine *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), Granzym B (GzmB) sowie Fas-Ligand (FasL/CD95L), als mögliche zytotoxische Effektormoleküle, nach Stimulation mit bsAk in Kokultur mit EpCAM+ Tumorzellen untersucht.

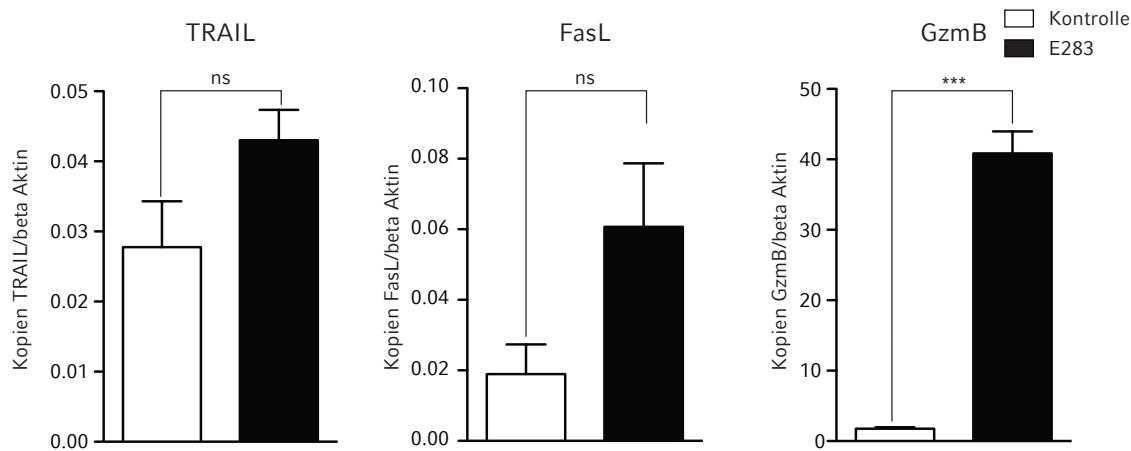


Abbildung 11: Transkriptionelle Regulation der Proteine TRAIL, FasL (CD95L) und GzmB nach Stimulation mit bsAk

Kokultur von 10^6 T-Zellen mit 5×10^4 Zellen der Linie Panc-OVA-EpCAM und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bsAk für 24 h. Anschließend wurde RNA isoliert und mittels *real time* PCR nach beschriebenem Protokoll quantifiziert. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM).

Abbildung 11 zeigt eine 20-fache Erhöhung der GzmB Expression durch E3-transduzierte T-Zellen nach Kokultur mit Tumorzellen in Anwesenheit von bispezifischen Antikörpern. TRAIL und FasL hingegen verändert sich in der Stimulationszeit nicht signifikant.

Um die biologische Relevanz dieser Beobachtungen zu testen wurde das zytotoxische Potenzial von E3-transduzierten C57BL/6 Wildtyp- und Perforin-Knockout (Prf $-/-$)-T-Zellen verglichen.

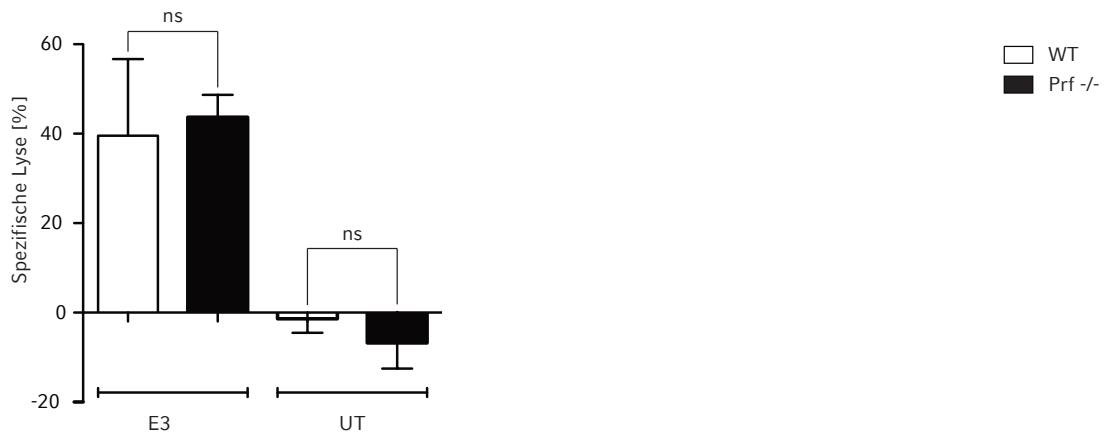


Abbildung 12: Zytotoxisches Potential von E3-transduzierten Prf $-/-$ T-Zellen im Vergleich zu WT T-Zellen

Es erfolgte eine Kokultur von 10^5 T-Zellen mit 2×10^4 Tumorzellen über 12 h. Zur Stimulation wurden 500 ng/ml anti-mEpCAM x anti-hEGFRvIII bsAk eingesetzt. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängigen Experimenten. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM). Beide Konditionen zeigten eine ähnliche Lyseeffizienz in Kokulturreversuchen bei Transduktion mit E3-Fusionsproteinen und in Anwesenheit von bsAK und Tumorzellen (Abbildung 12).

Unter Verwendung von Perforin - Knockout Versuchstieren ($\text{Prf}^{-/-}$) zeigte sich weiterhin eine Zytotoxizität der E3 transduzierten T-Zellen (Abbildung 12), wobei die Effektstärke mit derjenigen der E3-transduzierten T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Untransduzierte T-Zellen zeigten in beiden Konditionen keinerlei Zytotoxizität gegenüber den verwendeten Tumorzellen.

3.4 Kombinationstherapie im murinen B16-OVA-EpCAM und Panc-OVA-EpCAM-Modell *in vivo*

Um erstmalig die potenzielle Wirksamkeit von SAR-T-Zellen *in vivo* zu testen, wurde zunächst das Modell einer simultanen Ko-Injektion aller Komponenten gewählt.

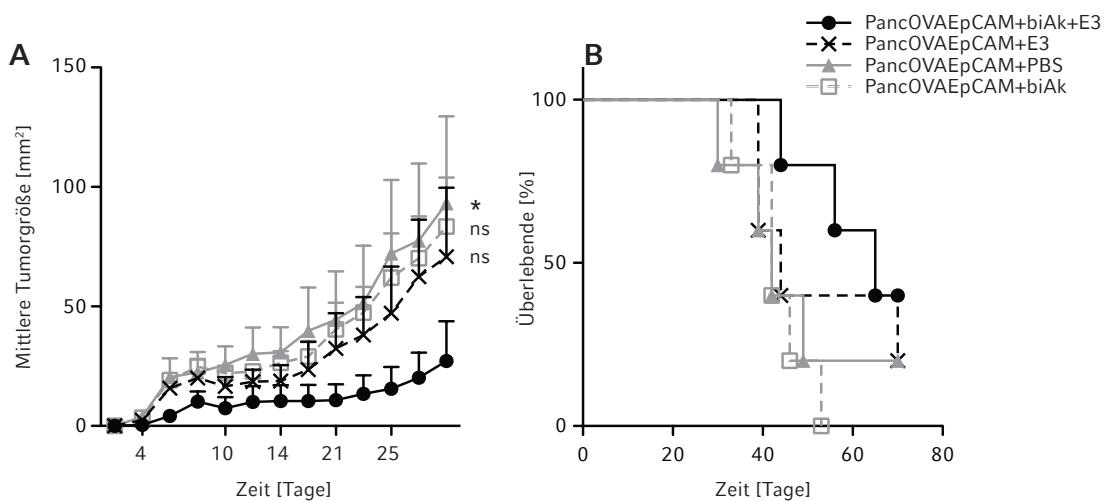


Abbildung 13: Tumorwachstum und Überleben von C57BL/6 Mäusen im Panc-OVA-EpCAM Modell

A: Tumeroberfläche der Panc-OVA-EpCAM Tumoren im zeitlichen Verlauf.

B: Gesamtüberleben bei Panc-OVA-EpCAM Tumoren im zeitlichen Verlauf.

Die subkutane Injektion von 2×10^6 Panc-OVA-EpCAM, 2×10^6 E3 T-Zellen und $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ bsAk erfolgte in $200 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen. Darstellung der Mittelwerte (+/- SEM) von je $n = 5$ Versuchstieren pro randomisierter Therapiegruppe.

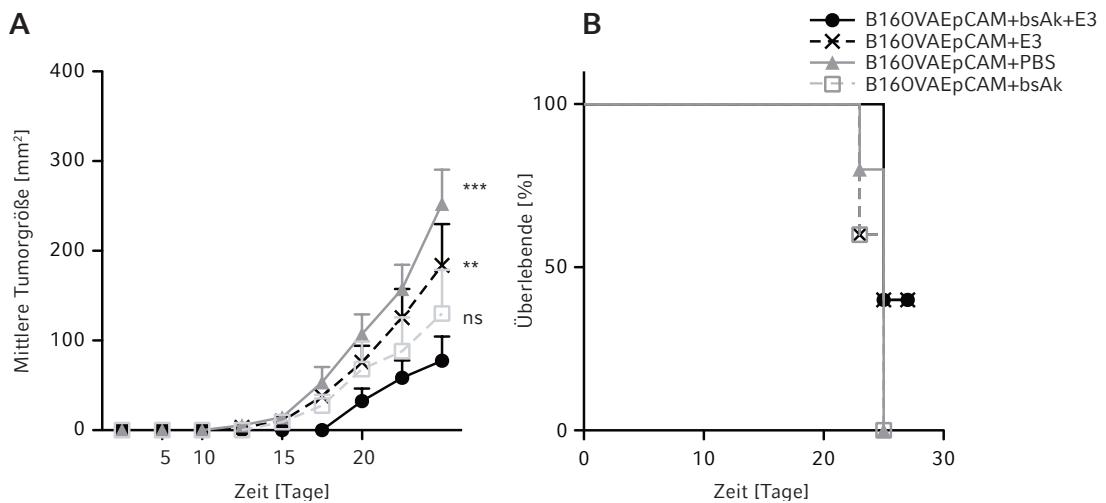


Abbildung 14: Tumorwachstum und Überleben von C57Bl/6 Mäusen B16-OVA-EpCAM Modell

A: Tumeroberfläche der B16-OVA-EpCAM Tumoren im zeitlichen Verlauf.

B: Gesamtüberleben bei B16-OVA-EpCAM Tumoren im zeitlichen Verlauf.

Die subkutane Injektion von 2×10^4 B16-OVA-EpCAM, 2×10^5 E3 T-Zellen und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biAk erfolgte in 100 μl Gesamtvolumen. Darstellung der Mittelwerte (+/-SEM) von je n=5 Versuchstieren pro randomisierter Therapiegruppe.

Die Koapplikation verzögerte das Tumorwachstum von B16-OVA-EpCAM Tumorzellen gegenüber den Vergleichsgruppen (Abbildung 14). Im Fall des Panc-OVA-EpCAM-Modells zeigte sich ein Trend hierzu (Abbildung 13). In keinem der Modelle konnte eine signifikante Verlängerung des Überlebens der Tiere gezeigt werden. Allerdings zeigte sich in beiden Versuchen ein Anteil von 40% an Versuchstieren, die im Rahmen der Behandlung durch die Kombinationstherapie über den kurzen Beobachtungszeitraum überlebten.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit konnte SAR+ T-Zellen *in vitro* nach bereits erfolgtem prinzipiellem Wirksamkeitsnachweis weiter charakterisieren. Essentielle Faktoren für die Funktionalität des Therapieansatzes waren die Expression der SAR-Transgene inklusive der intrazellulären Signaldomänen CD3 und CD28, sowie die Bindung eines spezifischen Liganden an die entsprechende Ektodomäne des SAR. Dabei zeigte sich auch, dass es bei hohen Konzentrationen von bsAk zu einer Aktivierung in Abwesenheit des TAA kommt. Gleichzeitig führte eine Immobilisierung der Liganden zu einer Steigerung der Stimulation der SAR+ T-Zellen. Des Weiteren zeigte sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der eingesetzten Konzentration an bsAk sowie der Menge an beteiligten SAR+T-Zellen. Für eine effektive, subtotale Lyse wurde jedoch nur ein niedriges Sättigungsniveau der SAR auf der T-Zelloberfläche benötigt. Die Interaktion via bsAk und SAR vermittelte eine Proliferation sowie eine Dedifferenzierung in Richtung einer T_{EM} – Subpopulation der entsprechenden T-Zellen. In Versuchen zum Mechanismus der zellvermittelten Tumorlyse konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch SAR und bsAk allem die Transkription von GzmB bewirkt, die Zytotoxizität allerdings nicht von der Wirkung von Prf abhängig ist. *In vivo* wurde zudem dargelegt, dass die Kombinationstherapie in zwei EpCAM-positiven Tumormodellen zu einer Verzögerung des Tumorwachstums führte.

4.2 SAR als Basis für T-Zell vermittelte Zytokinsekretion, Zytotoxizität und Differenzierung

4.2.1 EGFRvIII und Cripto als restriktiv exprimierte Ektodomänen und funktionelle Bestandteile von SAR

Das übergeordnete Ziel der gentechnischen Modifikation von T-Zellen zur Tumorimmuntherapie ist die Induktion einer anti-tumoralen, zellulären Immunität (Sadelain et al., 2017). Als Vorbild dient dabei die physiologische Antigenerkennung durch die immunologische Synapse, welche sich durch Zusammenwirken von TZR, Adhäsionsmolekülen und ko-stimulatorischen Rezeptoren auszeichnet (Dustin, 2014).

Die hier verwendeten extrazellulären Domänen der endogenen Membranproteine Cripto beziehungsweise EGFRvIII sind im adulten Organismus auf gewisse Tumorentitäten beschränkt. Dadurch wird die Exklusivität des T-Zell-Markerantigens gewahrt und ermöglicht somit eine selektive Bindung der entsprechenden rekrutierenden Antikörper (O'Rourke et al., 2017; Persico et al., 2001).

Cripto wird in Interaktion mit Nodal, einem Zytokin aus der TGF-beta Superfamilie, sowohl Funktionen als Ko-Ligand, wie auch als Ko-Rezeptor, zugeschrieben (Yan et al., 2002). Dabei wird in der Literatur auch berichtet, dass der Ko-Ligand Nodal in malignen Melanomzellen vermehrt exprimiert wird (Topczewska et al., 2006). Bei möglicher Translation der Fusionsproteine sollte Nodal somit als potentieller endogener Ligand für C3-transduzierte T-Zellen bei Patienten mit malignen Erkrankungen, und somit als mögliche Ursache für *off-target* Toxizität in Betracht gezogen werden.

EGFRvIII entsteht durch eine *in-frame*-Deletion der Exons 2-7 des natürlicherweise vorkommenden EGFR unter Erhalt der als Bindungsdomäne beschriebenen Region L2 (Domäne 3) (Woltjer et al., 1992). Unter Verwendung von EGFRvIII transfizierten, aber EGFR-negativen Zelllinien, wurden widersprüchliche Resultate zum Bindungsverhalten von EGFRvIII zu EGF publiziert (Batra et al., 1995; Moscatello et al., 1996). Im Gegensatz zu EGFR konnte bei EGFRvIII transfizierten Zellen auch keine Re-Distribution, beziehungsweise Dimerisierung der Rezeptoren, auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Su Huang et al., 1997). Anhand dieser Daten wird aktuell in der Literatur als Konsensus akzeptiert, dass EGFRvIII keine natürlichen Liganden binden kann (Gan et al., 2013; Gong et al., 2014a; Wikstrand et al., 1998).

Auch in den hier dargestellten Versuchen konnte keine Aktivierung von SAR+ T-Zellen mit EGFRvIII-Ektodomäne durch EGF nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich, dass Fc-EGF, als modifizierte Variante des natürlichen Liganden, sowie die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab eine Aktivierung der T-Zellen induzierten. Diese Beobachtungen werden durch publizierte Analysen der Epitope von Cetuximab und Panitumumab unterstützt. Beide Antikörper binden auf jeweils überlappende Epitope auf L2 (Domäne 3), eine Domäne, die sowohl bei EGFR wie auch dem mutierten EGFRvIII zu finden ist. Zusätzlich liegt auch die Bindungsstelle von EGF in räumlicher Nähe (Gong et al., 2014b; Voigt et al., 2012). Somit ist auch eine Aktivierung von EGFRvIII über Fc-EGF hinsichtlich der Proteinstruktur nicht grundsätzlich widersprüchlich.

Zusammenfassend besteht also kein Anhalt dafür, dass durch den endogen zirkulierende Liganden EGF eine unspezifische Wirkung von E3 T-Zellen *in vivo* zu erwarten ist. Zur Klärung der Frage, inwieweit eine Aktivierung von C3 Domänen durch in speziellen Patientenkolorten zirkulierendes Nodal zu erwarten ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Weitere mögliche Wirkmechanismen der Liganden - Rezeptor Interaktion sollen im Folgenden unter Kapitel 4.3.1 ausgeführt werden. EGFRvIII, als eine durch Exondeletion entstandene Variante des natürlicherweise vorkommenden EGFR, ist *in vivo* potentiell immunogen. Somit könnten die entsprechenden E3 – SAR in ihrer Wirkung durch vorzeitige Elimination in ihrer Wirkung eingeschränkt sein. Im Fall von Cripto als

embryonales Antigen ist theoretisch von einer Toleranz aufgrund der Exposition während der pränatalen Entwicklung auszugehen.

4.2.2 Die Komposition von Transmembran- und Endodomänen als Grundlage für das stimulatorische Potential der SAR

Als Surrogat für die TZR-CD3 Komponente der immunologischen Synapse werden zur gentechnischen Modifikation von T-Zellen intrazelluläre Peptide mit ITAM-Motiven verwendet, wobei sich die CD3- ζ Domäne mehrheitlich durchgesetzt hat (Irving et al., 1991; Sadelain et al., 2009). Zahlreiche Studien erwiesen allerdings, dass die Integration von zusätzlichen, ko-stimulatorischen Domänen in der zweiten Generation von CAR vor allem im Hinblick auf IL-2 Sekretion, Überwindung von T-Zell-Anergie und Proliferationskapazität, den CAR der ersten Generation überlegen waren (Dotti et al., 2014; A. Hombach et al., 2001; Maher et al., 2002). Dabei scheint die gleichzeitige Nutzung mehrerer ko-stimulatorischer Domänen einen synergistischen Effekt zu erbringen (J. Wang et al., 2007; Wilkie et al., 2008). Ebenso wird die Ko-Expression von Zytokinen neben dem stimulierendem Fusionsrezeptor durch die modifizierende Wirkung auf das Tumormilieus als vorteilhaft eingestuft (Markus Chmielewski et al., 2012).

Entsprechend zeigten die um die CD28 und CD3- ζ gekürzten Fusionsproteine in dieser Arbeit keinerlei spezifische Aktivität. Die funktionalen Rezeptoren mit den stimulatorischen Endodomänen hingegen führten zu einer Aktivierung der T-Zellen. Gemäß den Angaben der Literatur könnte durch die Erweiterung um weitere ko-stimulatorische Domänen wie OX-40 oder 4-1BB eine Optimierung der T-Zell Funktionen erreicht werden. Ebenso lassen sich SAR über Modifizierung des retrovirusalen Vektors, analog zu CAR, mit weiteren Transgenen kombinieren, um über synergistische Effekte eine Steigerung der Wirksamkeit zu entwickeln.

4.2.3 Design der extrazellulären Komponenten als Determinanten der T-Zellaktivität bei Stimulation via SAR

E3-Fusionsproteine zeigten gegenüber dem C3- Konstrukt hinsichtlich Lyse, Proliferationskapazität, INF- γ Sekretion und Expression der Aktivierungsmarker CD69 sowie PD-1 eine Überlegenheit. Dieser Umstand ist vermutlich ein Produkt aus mehreren Faktoren. Zum einen konnten für das C3-Transgen geringere Level der Expression nach Transduktion erreicht werden. Zweitens ist bekannt, dass auch die Lage des Epitops am Fusionsrezeptor sowie dessen Abstand zu Plasmamembran Einflussfaktoren für die Signaltransduktion sind. So wird in der Literatur beschrieben, dass eine proximale Lokalisation des Epitops im Verhältnis zur Plasmamembran positiv mit dem Ausmaß der

Aktivierung der T-Zelle korreliert (Haso et al., 2013; A. A. Hombach et al., 2007).

Bezüglich E3 ist von einer Bindung in Domäne III (L2) auszugehen, die sich zwischen Aminosäure 333-460 erstreckt (Woltjer, 1992). Die Ektodomäne von E3 besteht insgesamt aus 1134 Aminosäuren. Im Gegensatz dazu zählt die Ektodomäne von C3 lediglich 492 Aminosäuren, wobei das Markerantigen Cripto sich lediglich über 360 Aminosäuren erstreckt und von einem CD8a-*hinge* (132 Aminosäuren) gefolgt wird. Somit ist auch bei Unkenntnis der exakten Bindungsstelle des bsAk an die C3-Ektodomäne davon auszugehen, dass die Bindungsstelle von Cripto über eine ähnliche Lagebeziehung zur Plasmamembran wie die Domäne III von EGFRvIII verfügt. Zusammenfassend ist also der Einfluss des Abstands zwischen dem jeweiligen Epitop und der Plasmamembran im direkten Vergleich beider SAR als gering einzuschätzen.

Als weiterer Unterschied ist die CD8a-*hinge* Region von C3 zu nennen, die bei E3 keinen Einsatz fand. Insgesamt ist der Effekt solcher Domänen anhand der Literatur bei divergenten Ergebnissen nicht pauschal zu formulieren und somit individuell für das jeweilige Fusionsprotein zu testen (Dotti, 2014; Hudecek et al., 2015). Demnach ist zur Optimierung ein direkter Vergleich unterschiedlicher SAR-Designs anzustreben. Dabei könnte die Transmembranregion neben unterschiedlichen *hinge*-Regionen auch durch CD28 übernommen werden. Lediglich eine Transmembrandomäne durch Cripto ist nicht möglich, da es sich um ein GPI-verankertes Oberflächenprotein handelt (Persico, 2001). Um eine Signaltransduktion nach intrazellulär zu gewährleiten, muss also auf Domänen anderer Transmembranproteine zurückgegriffen werden.

4.2.4 SAR vermittelt eine Differenzierung zu Gunsten eines T_{EM} -Phänotyps

Die Qualität der anti-tumoralen Effekte von T-Zellen im Rahmen eines adoptiven Transfers wird von der T-Zelldifferenzierung bestimmt (Sadelain, 2017). Dieser Phänotyp wird dabei stellvertretend an der Expression von CCR7 und CD62L gemessen (Masopust et al., 2014). Die Expression dieser Proteine nach Antigenkontakt markiert die zur Auto-Regeneration befähigten Subpopulation (T *memory stem cells* (T_{SCM}), beziehungsweise T *central memory cells* (T_{CM}))). Entsprechend markiert der Verlust dieser Marker die Abnahme der Proliferationskapazität bei steigender Fähigkeit zur Lyse. Dieser Subtyp wird als T *effector memory* (T_{EM}) bezeichnet (Busch et al., 2016; Dotti, 2014; Sadelain, 2017).

Erwartungsgemäß zeigte sich in den hier dargestellten Versuchen ein Verlust von CCR7 und CD62L bei E3 Zellen nach Interaktion mit bsAk unter der Anwesenheit von EpCAM+ Tumorzellen. Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass es im Rahmen der T-Zell Aktivierung durch SAR zur notwendigen Differenzierung zu Gunsten von zytotoxisch aktiven T_{EM} kommt. Gleichzeitig waren aber auch nach 48 Stunden SAR+/CCR7+/CD62L+

Zellen zu detektieren. Damit wurde nachgewiesen, dass auch nach Antigenkontakt eine Kohorte mit T_{CM} Phänotyp existiert. Dadurch ist eine Steigerung der therapeutischen Effektivität denkbar, da diese Kohorte durch ihre hohe Proliferationskapazität zu einer bedarfsweisen Expansion der tumorspezifischen T-Zellen führen könnte. Für weiterreichende Aussagen sind zusätzliche Untersuchungen wünschenswert.

Ob sich die beobachtete Proliferation der Zellen tatsächlich vorwiegend aus Zellen des T_{CM} Phänotyps speist kann allerdings durch die methodischen Limitationen dieses Ansatzes nicht abschließend beurteilt werden. Ebenso kann der beobachtete Verlust der Marker des Gedächtniszelltyps unter Kontrollbedingungen (EGFRvIII-Konstrukt) möglicherweise mit der zum Versuchszeitpunkt vorgenommenen Stimulation mit IL-15 und den damit verbundenen anti-apoptotischen und proliferativen Effekten zusammenhängen (Zhang et al., 1998).

4.3 Spezifität als Funktion der Valenz SAR-bindender Liganden

4.3.1 Aggregation, Konformationsänderung und Segregation als mögliche Wirkmechanismen für Signaltransduktion via SAR

Der exakte Mechanismus, welcher zur Initiierung intrazellulärer Signalkaskaden führt, ist weder für endogene TZR-CD3 Komplexe, noch für synthetische Derivate wie CAR, eindeutig geklärt. In beiden Fällen gilt es aber als gesichert, dass die Phosphorylierung der intrazellulären ITAM der CD3 Untereinheiten durch die Tyrosin Kinase Lck der Src-Familie einen essentiellen Schritt darstellt (Irving, 1991; Van der Merwe et al., 2011). Die Modulation der Phosphorylierung der ITAM wird in der Literatur durch drei sich teilweise ergänzenden Mechanismen für TZR beschrieben.

Zum einen wurde der Aggregation von TZR mit konsekutiver Rekrutierung von Lck eine große Bedeutung zugemessen (Yokosuka et al., 2005). Dies stützt sich unter anderem auf Experimente, die eine Aktivierung von T-Zellen unter Stimulation mit oligomeren pMHC-Komplexen und löslichen anti-CD3 Antikörpern nachweisen, die mit monomeren Agonisten nicht reproduzierbar waren (Cochran et al., 2000; Minguet et al., 2007; Valitutti et al., 1997). Versuche, die eine T-Zell Antwort nur unter Anwesenheit von FcyR+ Zellen, und nicht in reinen T-Zell Kulturen, nachweisen konnten, entkräften allerdings die Hypothese, dass der monoklonale anti-CD3ε Antikörper OKT3 (Muromomab) über reine CD3-TZR Quervernetzung zu einer Aktivierung führt. Dies spricht vielmehr für die Notwendigkeit eines Zell-Zell Kontakts gegenüber einer reinen Aggregation von CD3-TZR Komplexen auf der Oberfläche einer T-Zelle (Reusch et al., 2015). Des Weiteren zeigten Versuche eine Aktivierung von T-Zellen durch einen einzigen, solitären pMHC-Komplex pro Zielzelle und stellen damit auch die Notwendigkeit der CD3-TZR Quervernetzung als

Voraussetzung in Frage (Irvine et al., 2002). Zusammengefasst ist also eine Aggregation unter den verschiedenen CD3-TZR Komplexen einer Zelle ausreichend, aber nicht notwendig, um eine Aktivierung zu initiieren (Van Der Merwe, 2011).

Ähnlich zu endogenen TZR ist bei beiden hier vorgestellten SAR-Konstrukten anhand ihrer Transmembrandomänen von einer Möglichkeit zur Dimerisierung nach Bindung an polyvalente Liganden auszugehen. Konkret ist für CD8 α (C3) eine Dimerisierung im Rahmen von CAR beschrieben (Rodgers et al., 2016). Auch EGFRvIII-Molekülen (E3) wird eine, Liganden-unabhängige, Dimerisierung zugesprochen (Gan, 2013). Auch eine Interaktion zwischen synthetischen CAR und endogenen TZR wird postuliert (Bridgeman et al., 2014).

Ein weiteres Modell propagiert, dass es durch die Bindung von Liganden zu einer Konformationsänderung kommt die ursächlich für die Aktivierung ist (Choudhuri et al., 2009; Kim et al., 2010; Li et al., 2010; Xu et al., 2008).

Zudem wird ein Mechanismus diskutiert, der von einem Fließgleichgewicht der Phosphorylierung der ITAM in Ruhe ausgeht. Dieses wird auf der einen Seite durch konstitutiv aktive Kinasen (Lck), sowie dazu antagonistisch von CD45 und CD148, als Phosphatasen, beeinflusst (Van Der Merwe, 2011). Entsprechend führt die räumliche Abtrennung der großen, membranständigen Phosphatasen durch engen Zellkontakt bei Antigenerkennung zur Veränderung des Gleichgewichts zugunsten der Phosphorylierung mittels Lck. Diese Hypothese stützt sich unter anderem auf die Beobachtungen, dass CD45 und CD148 in immunologischen Synapsen nicht zu detektieren sind (Varma et al., 2006). Außerdem verhindert eine Verkürzung der extrazellulären Domäne der Phosphatasen, beziehungsweise eine Verlängerung von pMHC, eine T-Zell-Aktivierung (Choudhuri, 2009; Irles et al., 2003).

Dieses Wirkprinzip wurde auch für CAR-Konstrukte vorgeschlagen. Dies stützt sich unter anderem darauf, dass eine verbesserte T-Zell-Aktivierung bei Erkennung membrannaher gegenüber membranferner Epitope nachgewiesen wurde (Haso, 2013). In diesem Fall verbleibt ein kleiner Interzellulärspalt und dient somit im Sinne der Segregation von der Phosphatasen (Hudecek, 2015).

Zusammenfassend führen bivalente Moleküle zur Quervernetzung der SAR. Damit sind, auch in Abwesenheit eines immobilisierenden TAA, hinreichende Voraussetzungen für eine Aktivierung der T-Zelle gegeben. Die unspezifische Aktivierung von SAR+ T-Zellen durch bivalente Liganden wie mAk, oder bsAK im 2+2 Format, können somit Ausdruck einer solchen Quervernetzung sein. Die dadurch generierte Aktivierung ist somit

unabhängig von der Präsenz eines TAA, kann aber durch die Zugabe des Antigens massiv gesteigert werden. Eine Aktivierung von E3 mit EGFRvIII Ektodomäne durch Fc-tag legt nahe, dass eine Bindung entgegen anderweitiger Beschreibungen in der Literatur grundsätzlich möglich ist. Weiterhin wurde allerdings keine Dimerisierung der EGFRvIII Rezeptoren beobachtet, sodass eine Quervernetzung als ursächlicher Mechanismus unwahrscheinlich erscheint. Da nur in Anwesenheit eines Fc-Teils eine Aktivierung beobachtet werden konnte ist ferner anzunehmen, dass eine Immobilisierung primär nicht-quervernetzender Liganden notwendig ist. Diese Beobachtungen stehen wiederum im Einklang mit den oben vorgestellten Hypothesen zur Segregation und Konformationsänderung im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen.

4.4 Bispezifische Antikörper als molekulare Adapter

4.4.1 *Adaptermoleküle führen zur verbesserten Steuerung von Spezifität und biologischer Aktivität der T-Zelltherapie*

Weitere Formate rekrutierender Moleküle mit großen Ähnlichkeiten zu dem hier vorgestellten Format sind derzeit in der Entwicklung. Auch diese sind in der Lage T-Zellen über ein Markerantigen zu rekrutieren und aktivieren. Als Beispiele werden in der Literatur unter anderem FITC-TAA Adapter (Ma et al., 2016), Biotin-TAA Adapter (Lohmueller et al., 2018), CD16-CAR (Caratelli et al., 2017) und UniCARs (Cartellieri et al., 2016) vorgestellt. Insbesondere bei Verwendung von synthetischen (FITC), beziehungsweise artfremden Markern (Streptavidin), ist allerdings eine vorzeitige Eliminierung aufgrund der Immunogenität der Moleküle zu erwarten. Im Fall von CD16-CAR, die den Fc-Teil von mAk binden können, besteht die Schwierigkeit, dass eine Vielzahl von bereits in der Onkologie zugelassenen Antikörpern in ihrem IgG-Subtyp nicht auf ADCC ausgerichtet sind. Somit sind einige der klinisch verfügbaren Antikörper nicht als Kombinationspartner geeignet. Bei UniCAR ist es durch die präzise Auswahl einer über Menschen und Mäuse konservierten Aminosäuresequenz als Markerantigen gelungen, dass die unerwünschte auto-immunologische Reaktion auf die Komponenten der Zelltherapie minimiert wurde (Cartellieri, 2016).

Gemeinsam ist all diesen Ansätzen, inklusive den hier vorgestellten SAR, dass durch Implementierung löslicher Adaptermoleküle eine dynamische Anpassung der T-Zellaktivität erreicht werden konnte. Dabei bestimmt die Präsenz des Adaptermoleküls als molekularer Schalter mittels der Fusionsrezeptoren über die Aktivität der T-Zellen. Folglich kann durch die Titration dieser Adaptermoleküle die in vivo Aktivität der Zelltherapie gesteuert werden. Die biologische Aktivität richtet sich dabei nach der biologischen Halbwertszeit der Adaptermoleküle und ist somit gut kalkulierbar. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Sicherheitsmechanismen, die eine Eliminierung der T-Zellen

zur Folge haben und somit irreversibel sind (Zhou et al., 2015). Des Weiteren ist die Spezifität in Form des entsprechenden Adaptermoleküls leicht austauschbar und im Gegensatz zu T-Zellen als potentielles *off the shelf* Produkt verfügbar. Ebenso ist denkbar, dass durch Verwendung von multi-spezifischen Formaten eine Verbesserung der Spezifität erreicht werden kann.

Die hier nachgewiesenen Wirkmechanismen sind *in vivo* weiter zu prüfen. Insbesondere sind vor dem Hintergrund der Steuerbarkeit die biologische Halbwertszeit der bsAk sowie mögliche Mechanismen zur vorzeitigen Elimination der Adaptermoleküle, wie zum Beispiel neutralisierende Antigene oder Antikörper zu testen. Zudem gilt es in einem weiteren Schritt zu prüfen, ob ein Wechsel der Adaptermoleküle ohne Erneuerung der SAR+ T-Zellpopulation gelingt.

4.4.2 Selektive Markerantigene erlauben eine gezielte Rekrutierung von Effektorzellsubtypen

Als weiterer Vorteil der hier vorgestellten Kombinationstherapie gilt, dass die Effektorzelle durch das Markerantigen selektiert werden kann. Dies steht im Gegensatz zu anderen Ansätzen mit bispezifischen Antikörperformaten wie beispielsweise *bispecific T cell engager (BiTE)*, die als T-Zell rekrutierende Domäne den Pan-T-Zell-Marker CD3 verwenden (Bargou, 2008; Goebeler, 2016; Mack et al., 1995). Untersuchungen von Patienten mit therapierefraktärer ALL unter Blinatumomab (anti-CD19 x anti-CD3, BiTE) Therapie zeigten, dass die Anzahl an immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), die ebenfalls durch den bispezifischen Antikörper rekrutiert und aktiviert werden, als negativer prädiktiver Faktor gilt (Duell et al., 2017). Im Gegensatz dazu kann durch eine entsprechende Konditionierung *in vitro* bei SAR+ T-Zellen eine Selektion des Phänotyps erfolgen und somit die Effektivität der rekrutierten T-Zellen optimiert werden.

4.4.3 Serielle Lyse durch SAR+ T-Zellen

Unter Einsatz bispezifischer Formate mit anti-CD3 als T-Zell rekrutierende Domäne konnte erstmals für rekrutierende bsAk demonstriert werden, dass die sequenzielle Lyse mehrerer Zielzellen durch eine einzelne T-Zelle wesentlich zur Effektivität dieses Ansatzes beiträgt (Bargou, 2008; Hoffmann et al., 2005; Reusch, 2015). Dies basiert auf der Überlegung, dass die maximale Lysekapazität eine Funktion der produktiven Interaktionen zwischen Antigen und TZR, beziehungsweise synthetischen Antigen-Rezeptoren ist (Van Der Merwe, 2011).

Entsprechend ist eine insgesamt hohe Bindungsaaffinität der einzelnen Komponenten untereinander hinderlich, da der Wechsel der Interaktionspartner erschwert ist. Dabei ist insbesondere eine hohe Affinität für das T-Zell Markerantigen relativ zur Affinität gegenüber dem TAA ungünstig. Denn bei Ausprägung der Affinität zugunsten der TAA ist von einer Opsonierung der Tumorzellen, anstatt von einer Aggregation der T-Zellen inklusive membranständigem Antikörper, auszugehen (Hoffmann, 2005). Ungeachtet dessen wurde in der Literatur sowohl für klassische CAR, wie auch für tetravalente bsAk mit hochaffinen anti-CD3 Domänen, eine serielle Lyse beschrieben (Liadi et al., 2015; Reusch, 2015).

Die Affinität von Liganden und Rezeptoren werden durch die Bindungskonstanten beschrieben, wobei ein niedriger Wert eine hohe Affinität zum Ausdruck bringt. Für die hier verwendeten Klone, welche als Vorlage für den bsAk dienten, sind folgende Werte publiziert: K_d (anti-EGFRvIII; MR1.1): $1,5 \times 10^{-9}$; K_d (anti-EpCAM; G8.8): $6,1 \times 10^{-8}$ (Farr et al., 1991; Kuan et al., 2000). Dadurch ist eine präferentielle Bindung an SAR+ T-Zellen und somit potentiell ungünstiges Affinitätsverhalten anzunehmen. Folglich könnte eine Modifizierung der Affinität des Adaptermoleküls zu einer höheren Lysekapazität beitragen.

Auch die Valenz für die T-Zell-rekrutierende Domäne wird als relevanter Faktor beschrieben. Dabei wird eine Multivalenz für aktivierende T-Zell-Proteine, wie CD3 oder CAR, als negativ für die Fähigkeit zur seriellen Lyse betrachtet, da durch Quervernetzung eine unspezifische Aktivierung zu erwarten ist (Hoffmann, 2005).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zeigen auch unter einem 1 : 1 Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen eine totale Lyse. Es ist dabei zusätzlich zu berücksichtigen, dass aufgrund der unvollständigen Transduktion ein reales Verhältnis von maximal 1 : 0,5 (Tumorzelle/SAR+ T-Zelle) anzunehmen ist. Vor diesem Hintergrund erscheint auch für die hier diskutierte Kombinationstherapie eine serielle Lyse als wahrscheinlich. Limitierend ist zu erwähnen, dass keine Kontrolle für eine mögliche Proliferation getroffen wurde, so dass der beobachtete Effekt auch Folge einer Expansion durch SAR+ T-Zellen sein könnte. Ebenso könnte eine unspezifische Lyse durch Quervernetzung der SAR nach oben beschriebenen Mechanismen eine Rolle spielen.

4.5 SAR-induzierte Zytotoxizität ist unabhängig von der Granzym-Perforin Achse

Hinsichtlich des eigentlichen Mechanismus der Lyse maligner Zellen durch zytotoxische T-Zellen (CTL) werden im Wesentlichen zwei Prinzipien beschrieben. Die Expression von membranständigen Liganden der TNF-Superfamilie und deren Bindung an der Zielzelle

induziert zum einen Signalkaskaden, die über die Aktivierung von Cystein-Proteasen (Caspasen) zur Apoptose der Zielzelle führen. Diesbezüglich konnte vor allem für die Liganden TRAIL und FasL (CD95L) eine Rolle in der CTL-vermittelten Tumorlyse nachgewiesen werden (Brincks et al., 2008; Trapani et al., 2002; S. Wang et al., 2003).

Zum zweiten führen durch Exozytose aus zytoplasmatischen Vesikeln freigesetzte Proteine ebenfalls zum Untergang der Zielzelle. Inhalte dieser Vesikel sind unter anderem das membran-spaltende Perforin und Serin Proteasen, die der Familie der Granzyme zugerechnet werden (Cullen et al., 2010; Trapani, 2002). Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Experimenten mit Knockout-Mausmodellen wird generell dem Signalweg durch Liganden-Rezeptor Interaktion eine größere Rolle in der Homöostase der lymphatischen Reihe zugeschrieben (Takahashi et al., 1994), während die Granzym/Perforin Achse als entscheidend für die Elimination maligner Zellen gilt (Smyth et al., 2000; van den Broek et al., 1996).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen aus der Literatur bestätigen die hier dargestellten Untersuchungen zur Veränderung der Transkription nach Stimulation von SAR+ T-Zellen die Dominanz der Granzym/Perforin-Achse gegenüber den membrangebundenen Liganden. Im Gegensatz dazu zeigten SAR+ T-Zellen aus Prf^{-/-} Knockout-Versuchstieren jedoch keine Einschränkung ihres zytotoxischen Potentials *in vitro*.

Die Expression von Granzym-Isoformen in Abwesenheit von Perforin ist für diverse Gewebe beschrieben (Hoves et al., 2010). Gleichzeitig gibt es auch Hinweise auf Perforin-unabhängige Mechanismen von Granzym. Vereinzelt werden zytotoxische Effekte unabhängig von der membran-spaltenden Eigenschaft der Perforine benannt, die allerdings aufgrund ihres *in vitro* Designs mit supraphysiologischen Konzentrationen angezweifelt werden dürfen (Gross et al., 2003). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Beschreibungen extrazellulärer Effekte von Granzymen, die entsprechend auch ohne die Formierung der Membranpore durch Perforin auskommen und *per se* nicht Apoptose induzieren, sondern immunmodulatorischer Natur sind (Bhela et al., 2015; Hiebert et al., 2013; Prakash et al., 2014).

Somit ist trotz dem Nachweis einer fehlenden Relevanz von Perforin für die Zytotoxizität nicht abschließend geklärt, welche biologische Konsequenz aus der Hochregulation von Granzymen resultiert. Es erscheint zusammenfassend als unwahrscheinlich, dass Granzym unabhängig von Perforin eine relevante Rolle in der zellvermittelten Zytotoxizität spielt. Inwieweit mögliche immunmodulatorische Funktionen in diesem Modell eine Rolle spielen ist anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend zu beurteilen.

4.6 Wirksamkeitsnachweis der Kombinationstherapie *in vivo*

Der lokal, passive Kotransfer von T-Zellen, bsAk und Tumorzellen erbrachte einen prinzipiellen Wirkungsnachweis in zwei verschiedenen Zelllinien. Dennoch gelang es nicht, eine konsistente und vollständige Remission der Tumorlast nach Applikation der Kombinationstherapie zu erreichen. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist dennoch auf einige methodische Limitationen hinzuweisen.

Insbesondere bei soliden Tumoren ist die Migration und Persistenz der T-Zellen im Tumorgewebe entscheidend für den klinischen Effekt (Fesnak, 2016; Slaney et al., 2014). Die Migration ist natürlicherweise durch die Koapplikation der Zellen in den dargestellten Versuchen nicht ausreichend beurteilbar. Grundsätzlich verfügen T-Zellen physiologischerweise über die Möglichkeit gezielt zu migrieren und sogar immunologisch privilegierte Kompartimente des menschlichen Körpers zu infiltrieren (Miao et al., 2014). Die besonderen anatomischen und physiologischen Verhältnisse eines soliden Tumors wie beispielsweise der Gewebedruck, das metabolische und immunologische Milieu und die veränderte Gefäßstruktur erschweren insgesamt eine gezielte Migration (Slaney, 2014). Vor diesem Hintergrund ist eine systemische Applikation, beispielsweise durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion, in Zukunft anzustreben, um das Potential für eine klinische Translation abschätzen zu können. Auch die spezielle Pharmakokinetik der Kombinationstherapie, für die beide Komponenten im Tumormilieu wirken müssen, kann durch einen solchen Kotransfer nicht adäquat beurteilt werden.

Dennoch weist der Therapieerfolg darauf hin, dass die modifizierten T-Zellen in einem immunkompetenten Versuchstier offensichtlich keiner vorzeitigen Elimination aufgrund hoher Immunogenität unterliegen. Ebenso unterstreicht diese Wirksamkeitsprüfung, dass die Kultur, Expansion und Re-Infusion mit diesen konkreten Konstrukten technisch durchführbar ist, ohne eine systemische oder lokale Toxizität zu beobachten. Eine endgültige Beurteilung ist aber sicherlich nur zulässig, wenn eine systemische Applikation erfolgt und auch TTA+, nicht-neoplastische Gewebe dem bsAk sowie den T-Zellen verstärkt ausgesetzt sind.

Interessanterweise wurde vergleichbaren Ansätzen mit lokalem T-Zell Transfer in der Literatur sogar vereinzelt eine Überlegenheit gegenüber dem systemischen Transfer zugeschrieben (Adusumilli et al., 2014; Parente-Pereira et al., 2011; Singh et al., 2013). Selbst im Therapieeffekt von Metastasen außerhalb des eigentlichen Kompartiments zeigte sich der lokale Ansatz überlegen. Dies wurde mit der frühen Antigenexposition und der entsprechend besseren Persistenz der T-Zellen begründet (Adusumilli, 2014).

4.7 Ausblick

Im Hinblick auf die unspezifische Aktivierung von T-Zellen durch die bivalenten anti-SAR Domänen erscheint eine Re-Strukturierung zugunsten eines Formats mit einer monovalenten anti-SAR Bindungsstelle zur Reduzierung von *off-target* Effekten erstrebenswert. Da eine bivalente Bindungsstelle auch als potentiell hinderlich für eine serielle Lyse beschrieben wurde, könnte dies zusätzlich auch die Lysekapazität verbessern. Dies ist Gegenstand weiterer Untersuchungen in der Arbeitsgruppe.

Auch die Bindungsstelle für EpCAM könnte mit einer geringeren Affinität zu einer verbesserten Spezifität und Lysekapazität beitragen. Dies stützt sich auf Beobachtungen im Rahmen von Versuchen mit klassischen CAR, wo eine relativ geringe Affinität zu einer besseren Differenzierung des Expressionsmusters des TAA führte. Die maximale Effektstärke blieb davon unberührt (M. Chmielewski et al., 2004). Insbesondere im Fall von EpCAM, welches über ein breites Expressionsmuster verfügt und sich im Wesentlichen durch die verstärkte Expression bei Tumoren kennzeichnet, wäre also eine niedrige Affinität der anti-EpCAM Domänen vorteilhaft (Munz et al., 2009). Synergistisch könnte durch Kombination mit anderen anti-TAA Bindungsstelle die Spezifität erhöht werden (Chames, 2009; Lameris, 2014).

Hinsichtlich der zellulären Komponente, inklusive der SAR, gilt es vor dem Hintergrund der eingeschränkten Effektivität in den Pilotversuchen die *in vivo* Aktivität zu steigern. Wesentlich sind dabei, vor allem bei soliden Tumoren, Strategien zur Reduzierung des lokalen, immunsuppressiven Milieus (Sadelain, 2017). Neben der bereits angewandten systemischen Prä-Konditionierung kommen dabei unter anderem auch immunmodulatorische *small molecules* wie IDO-Inhibitoren, Lenalidomid und Antikörper der Gruppe der Checkpoint-Inhibitoren in Betracht (John et al., 2013; Munn, 2012; Ramsay et al., 2012). Auch zusätzliche gentechnische Modifikationen wie dominant-negative Rezeptoren oder stimulatorische PD1-Rezeptoren könnten zur Verbesserung der Effektivität eingesetzt werden (Cherkassky et al., 2016; Kobold, Grassmann, et al., 2015). Möglich sind auch zusätzliche Sequenzen auf dem verwendeten Vektor, die eine Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen nach sich ziehen würden (Hoyos et al., 2010).

Sowohl die unspezifische Aktivierung der T-Zellen via Quervernetzung der SAR, als auch die ubiquitäre Expression von EpCAM bei zugleich hoher Affinität, lassen die Wahrscheinlichkeit für ein CRS oder andere schwerwiegende Komplikationen bei einer potentiellen klinischen Anwendung inakzeptabel hoch erscheinen. Es sind daher noch weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit und Sicherheit des Ansatzes erforderlich, die derzeit in der Arbeitsgruppe weiter beforscht werden.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz T-Zell-rekrutierender, bispezifischer Antikörper zeigt in verschiedenen Ansätzen großes Potential zur Verbesserung der zellbasierten Therapie onkologischer Erkrankungen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kombination von bispezifischen Antikörpern zusammen mit T-Zellen und deren transduzierten Fusionsproteinen bietet dabei zahlreiche Vorteile. Die Komponenten sollen in Summe eine MHC-unabhängige, selektive Rekrutierung mit gleichzeitiger Aktivierung der T-Zellen gewährleisten und im Sinn eines modularen Konstrukts flexibel austauschbar sein. Konkretes Ziel dieser Arbeit war, die weitere Charakterisierung des dargestellten Ansatzes am Beispiel von zwei unterschiedlichen Modellsystemen zu zeigen. Hinsichtlich der Fusionsrezeptoren wurden dabei extrazelluläre Markerantigene (EGFRvIII und Cripto) mit intrazellulären Stimulationsdomänen kombiniert. Als bispezifische Antikörper wurden tetravalente Formate mit Spezifität gegen anti-EpCAM-anti-EGFRvIII, beziehungsweise anti-EpCAM-anti-Cripto, eingesetzt.

Die Funktionalität dieses Ansatzes wurde *in vitro* durch verschiedene Endpunkte dargestellt. Durch Stimulation der funktional transduzierten T-Zellen mittels bispezifischer Antikörper zeigte sich eine gesteigerte Zytokin-Sekretion, eine spezifische Lyse der Tumorzellen sowie eine Differenzierung hin zu einem zytotoxisch aktiven Zellphänotyp. Der Vergleich unterschiedlicher Liganden der Fusionproteine erlaubte Aussagen zu notwendigen Anforderungen zur Stimulation der transduzierten T-Zellen und zeigte die bivalenten Paratope der bispezifischen Antikörper als mögliche Ursache für eine unspezifische Aktivität in Abwesenheit des TAA an. Eine Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen stellte dar, dass bereits eine niedrige Sättigung der exprimierten Rezeptoren der T-Zellen eine subtotale Lyse auslöst. Weitere Versuche demonstrierten zudem, dass die Granzym-Perforin-Achse für die durch SAR+ T-Zellen vermittelten Lyse entbehrlich ist. *In vivo* wurde in zwei syngenen, subkutanen Maustumormodellen mit den Zelllinien B16-OVA-EpCAM und Panc-OVA-EpCAM keine relevante lokale oder systemische Toxizität der Kombinationstherapie beobachtet, während Tumorwachstum und Überleben nicht signifikant verbessert werden konnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten somit neue Erkenntnisse zu Wirksamkeit und Wirkmechanismen der Kombinationstherapie von Rezeptor-transduzierten T-Zellen mit bispezifischen Antikörpern. Diese Befunde können in der Folge einen wichtigen Ausgangspunkt für weitere Forschungsbemühungen darstellen. Insbesondere wurde im Hinblick auf eine mögliche Weiterentwicklung der Kombinationstherapie deutlich, dass eine Modifikation der Struktur der bispezifischen Antikörper zu einer Verbesserung der Spezifität, sowie potentiell auch zu einer Erhöhung der Lysekapazität führen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Adusumilli, P. S., Cherkassky, L., Villena-Vargas, J., Colovos, C., Servais, E., Plotkin, J., Jones, D. R., & Sadelain, M. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Science Translational Medicine* 2014; 6:261ra151.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., & Kufer, P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; 321:974–977.

Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., & Bigner2, D. D. Epidermal Growth Factor Ligand - independent , unregulated , cell - transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth & Differentiation* 1995; 6:1251–1259.

Beckman, R. A., Weiner, L. M., & Davis, H. M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 2007; 109:170–179.

Bhela, S., KempSELL, C., Manohar, M., Dominguez-Villar, M., Griffin, R., Bhatt, P., Kivisakk-Webb, P., Fuhlbrigge, R., Kupper, T., Weiner, H., & Baecher-Allan, C. Nonapoptotic and extracellular activity of granzyme B mediates resistance to regulatory T cell (Treg) suppression by HLA-DR⁻ CD25^{hi} CD127^{lo} Tregs in Multiple Sclerosis and in response to IL-6. *The Journal of Immunology* 2015; 194:2180–2189.

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufel, M., Arrieta, O., Burgio, M. A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D. E., Gettinger, S. N., Rudin, C. M., Rizvi, N., Crinò, L., Blumenschein, G. R., Antonia, S. J., Dorange, C., Harbison, C. T., Graf Finckenstein, F., & Brahmer, J. R. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2015; 373:1627–1639.

Bridgeman, J. S., Ladell, K., Sheard, V. E., Miners, K., Hawkins, R. E., Price, D. A., & Gilham, D. E. CD3zeta-based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 2014; 175:258–267.

Brincks, E. L., Katewa, A., Kucaba, T. A., Griffith, T. S., & Legge, K. L. CD8 T cells utilize TRAIL to control Influenza virus infection. *The Journal of Immunology* 2008; 181:4918–4925.

Busch, D. H., Fräßle, S. P., Sommermeyer, D., Buchholz, V. R., & Riddell, S. R. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in Immunology* 2016; 28:28–34.

Caratelli, S., Sconocchia, T., Arriga, R., Coppola, A., Lanzilli, G., Lauro, D., Venditti, A., Del Principe, M. I., Buccisano, F., Maurillo, L., Ferrone, S., & Sconocchia, G. FCy chimeric receptor-engineered T cells: methodology, advantages, limitations, and clinical relevance.

Frontiers in Immunology 2017; 8:457.

Cartellieri, M., Feldmann, A., Koristka, S., Arndt, C., Loff, S., Ehninger, A., von Bonin, M., Bejestani, E. P., Ehninger, G., & Bachmann, M. P. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts.

Blood Cancer Journal 2016; 6:e458.

Chames, P., & Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy: The light at the end of the tunnel?

MAbs 2009; 1:539–547.

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future.

British Journal of Pharmacology 2009; 157:220–233.

Cherkassky, L., Morello, A., Villena-Vargas, J., Feng, Y., Dimitrov, D. S., Jones, D. R., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition.

Journal of Clinical Investigation 2016; 126:3130–3144.

Chmielewski, M., & Abken, H. CAR T cells transform to trucks: Chimeric antigen receptor-redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer.

Cancer Immunology, Immunotherapy 2012; 61:1269–1277.

Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P., & Abken, H. T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity.

The Journal of Immunology 2004; 173:7647–7653.

Choudhuri, K., Parker, M., Milicic, A., Cole, D. K., Shaw, M. K., Sewell, A. K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Gould, K. G., & van der Merwe, A. P. Peptide-major histocompatibility complex dimensions control proximal kinase-phosphatase balance during T cell activation.

Journal of Biological Chemistry 2009; 284:26096–26105.

Cochran, J. R., Cameron, T. O., & Stern, L. J. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers.

Immunity 2000; 12:241–250.

Cullen, S. P., Brunet, M., & Martin, S. J. Granzymes in cancer and immunity.

Cell Death and Differentiation 2010; 17:616–623.

Dai, H., Wang, Y., Lu, X., & Han, W. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy.

Journal of the National Cancer Institute 2016; 108:1–15.

Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B., & Brenner, M. K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells.
Immunological Reviews 2014; 257:107–126.

Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P. F., Huang, J., Citrin, D. E., Leitman, S. F., Wunderlich, J., Restifo, N. P., Thomasian, A., Downey, S. G., Smith, F. O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D. E., & Rosenberg, S. A. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: Evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens.
Journal of Clinical Oncology 2008; 26:5233–5239.

Duell, J., Dittrich, M., Bedke, T., Mueller, T., Eisele, F., Rosenwald, A., Rasche, L., Hartmann, E., Dandekar, T., Einsele, H., & Topp, M. S. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL.
Leukemia 2017; 31:2181–2190.

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immuno-surveillance and immunoediting.
Immunity 2004; 21:137–148.

Dustin, M. L. The immunological synapse.
Cancer Immunology Research 2014; 2:1023–1033.

Farr, A., Nelson, A., Truex, J., & Hosier, S. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: A cell surface glycoprotein expressed by subcapsular and medullary epithelium.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1991; 39:645–653.

Fesnak, A. D., June, C. H., & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy.
Nature Reviews Cancer 2016; 16:566–581.

Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered.
FEBS Journal 2013; 280:5350–5370.

Goebeler, M. E., Knop, S., Viardot, A., Kufer, P., Topp, M. S., Einsele, H., Noppeney, R., Hess, G., Kallert, S., Mackensen, A., Rupertus, K., Kanz, L., Libicher, M., Nagorsen, D., Zugmaier, G., Klinger, M., Wolf, A., Dorsch, B., Quednau, B. D., Schmidt, M., Scheele, J., Baeuerle, P. A., Leo, E., & Bargou, R. C. Bispecific T-cell engager (BiTE) antibody construct blinatumomab for the treatment of Patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma: Final results from a phase I study.
Journal of Clinical Oncology 2016; 34:1104–1111.

Gong, H., Kovar, J. L., Cheung, L., Rosenthal, E. L., & Olive, D. M. A comparative study of affibody, panitumumab, and EGF for near-infrared fluorescence imaging of EGFR- and EGFRvIII-expressing tumors.
Cancer Biology and Therapy 2014; 15:185–193.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer.
Cell 2011; 140:883–899.

Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispe, N., & Multhoff, G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of Granzyme B.

Journal of Biological Chemistry 2003; 278:41173–41181.

Grupp, S. A., Maude, S. L., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Callahan, C., Lacey, S. F., Levine, B. L., Melenhorst, J. J., Motley, L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Wood, P. A., Porter, D., & June, C. H. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019).

Blood 2015; 126:681–681.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation.
Cell 2011; 144:646–674.

Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., Day, J., Greenwood, A., & McPherson, A. The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma.
Nature 1992; 360:369–372.

Haso, W., Lee, D. W., Shah, N. N., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Pastan, I. H., Dimitrov, D. S., Morgan, R. A., FitzGerald, D. J., Barrett, D. M., Wayne, A. S., MacKall, C. L., & Orentas, R. J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.

Blood 2013; 121:1165–1171.

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., Burges, A., Bokemeyer, C., Lindhofer, H., Lahr, A., & Parsons, S. L. 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 2010; 127:2209–2221.

Hellmann, M. D., Ciuleanu, T.-E., Pluzanski, A., Lee, J. S., Otterson, G. A., Audigier-Valette, C., Minenza, E., Linardou, H., Burgers, S., Salman, P., Borghaei, H., Ramalingam, S. S., Brahmer, J., Reck, M., O’Byrne, K. J., Geese, W. J., Green, G., Chang, H., Szustakowski, J., Bhagavatheeswaran, P., Healey, D., Fu, Y., Nathan, F., & Paz-Ares, L. Nivolumab plus Ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden.

New England Journal of Medicine 2018; 378:2093–2104.

Hiebert, P. R., Wu, D., & Granville, D. J. Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein e knockout mice.
Cell Death and Differentiation 2013; 20:1404–1414.

Hodi, F. S., O’Day, S. J., McDermott, 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. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma.

New England Journal of Medicine 2010; 363:711–723.

Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N., & Baeuerle, P. A. serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *International Journal of Cancer* 2005; 115:98–104.

Hombach, A. A., Schildgen, V., Heuser, C., Finnern, R., Gilham, D. E., & Abken, H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T Cells.

The Journal of Immunology 2007; 178:4650–4657.

Hombach, A., Wieczarkiewicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., & Abken, H. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 signaling receptor molecule.

The Journal of Immunology 2001; 167:6123–6131.

Hoves, S., Trapani, J. A., & Voskoboinik, I. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways.

Journal of Leukocyte Biology 2010; 87:237–243.

Hoyos, V., Savoldo, B., Quintarelli, C., Mahendravada, A., Zhang, M., Vera, J., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Brenner, M. K., & Dotti, G. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety.

Leukemia 2010; 24:1160–1170.

Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P. L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., Jensen, M. C., & Riddell, S. R. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity.

Cancer Immunology Research 2015; 3:125–135.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., & Kabbinavar, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.

New England Journal of Medicine 2004; 350:2335–2342.

Irles, C., Symons, A., Michel, F., Bakker, T. R., van der Merwe, P. A., & Acuto, O. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling.

Nature Immunology 2003; 4:189–197.

Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krosgaard, M., & Davis, M. M. Direct observation of ligand recognition by T cells.

Nature 2002; 419:845–849.

Irving, B. A., & Weiss, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways.

Cell 1991; 64:891–901.

Jackson, H. J., Rafiq, S., & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward.

Nature Reviews Clinical Oncology 2016; 23:49–53.

Jeurissen, A., Ceuppens, J. L., & Bossuyt, X. T lymphocyte dependence of the antibody response to "T lymphocyte independent type 2" antigens.
Immunology 2004; 111:1–7.

John, L. B., Devaud, C., Duong, C. P. M., Yong, C. S., Beavis, P. A., Haynes, N. M., Chow, M. T., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., & Darcy, P. K. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells.
Clinical Cancer Research 2013; 19:5636–5646.

Kalos, M., & June, C. H. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology.
Immunity 2013; 39:49–60.

Kaplon, H., & Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2018.
MAbs 2018; 10:183–203.

Kim, S. T., Touma, M., Takeuchi, K., Sun, Z.-Y. J., Dave, V. P., Kappes, D. J., Wagner, G., & Reinherz, E. L. Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of T cell receptors.
The Journal of Immunology 2010; 185:2951–2959.

Kobold, S., Grassmann, S., Chaloupka, M., Lampert, C., Wenk, S., Kraus, F., Rapp, M., Düwell, P., Zeng, Y., Schmolinger, J. C., Schnurr, M., Endres, S., & Rothenfußer, S. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy.

Journal of the National Cancer Institute 2015; 107:dvj146-dvj146.

Kobold, S., Steffen, J., Chaloupka, M., Grassmann, S., Henkel, J., Castoldi, R., Zeng, Y., Chmielewski, M., Schmolinger, J. C., Schnurr, M., Rothenfußer, S., Schendel, D. J., Abken, H., Sustmann, C., Niederfellner, G., Klein, C., Bourquin, C., & Endres, S. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer.

Journal of the National Cancer Institute 2015; 107:364.

Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Somerville, R. P. T., Carpenter, R. O., Maryalice, S. S., Yang, J. C., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., Raffeld, M., Feldman, S., Lu, L., Li, Y. F., Ngo, L. T., Goy, A., Feldman, T., Spaner, D. E., Wang, M. L., Chen, C. C., Kranick, S. M., Nath, A., Nathan, D. A. N., Morton, K. E., Toomey, M. A., & Rosenberg, S. A. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.

Journal of Clinical Oncology 2015; 33:540–549.

Köhler, G., & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 1975, 256:495–497.

Kontermann, R. E., & Brinkmann, U. Bispecific antibodies.
Drug Discovery Today 2015; 20:838–847.

Kuan, C. T., Wikstrand, C. J., Archer, G., Beers, R., Pastan, I., Zalutsky, M. R., & Bigner, D. D. Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRVIII-specific scFv.
International Journal of Cancer 2000; 88:962–969.

Lameris, R., de Bruin, R. C. G., Schneiders, F. L., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Verheul, H. M. W., de Gruijl, T. D., & van der Vliet, H. J. Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy.

Critical Reviews in Oncology/Hematology 2014; 92:153–165.

Lee, D. W., Gardner, R., Porter, D. L., Louis, C. U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S. A., & Mackall, C. L. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome.

Blood 2014; 124:188–195.

Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., Fry, T. J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N. N., Steinberg, S. M., Stroncek, D., Tschernea, N., Yuan, C., Zhang, H., Zhang, L., Rosenberg, S. A., Wayne, A. S., & Mackall, C. L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial.

The Lancet 2015; 385:517–528.

Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S. A., Reuß, S., Stauss, H., & Uckert, W. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette.

Journal of Molecular Medicine 2008; 86:573–583.

Li, Y. C., Chen, B. M., Wu, P. C., Cheng, T. L., Kao, L. S., Tao, M. H., Lieber, A., & Roffler, S. R. Cutting Edge: Mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling.

The Journal of Immunology 2010; 184:5959–5963.

Liadi, I., Singh, H., Romain, G., Rey-Villamizar, N., Merouane, A., Adolacion, J. R. T., Kebriaei, P., Huls, H., Qiu, P., Roysam, B., Cooper, L. J. N., & Varadarajan, N. Individual motile CD4+ T cells can participate in efficient multikilling through conjugation to multiple tumor cells.

Cancer Immunology Research 2015; 3:473–482.

Lim, W. A., & June, C. H. The principles of engineering immune cells to treat cancer.

Cell 2017; 168:724–740.

Lohmueller, J. J., Ham, J. D., Kvorjak, M., & Finn, O. J. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting.

Oncoimmunology 2018; 7:e1368604.

Ma, J. S. Y., Kim, J. Y., Kazane, S. A., Choi, S., Yun, H. Y., Kim, M. S., Rodgers, D. T., Pugh, H. M., Singer, O., Sun, S. B., Fonslow, B. R., Kochenderfer, J. N., Wright, T. M., Schultz, P. G., Young, T. S., Kim, C. H., & Cao, Y. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences 2016; 113:E450–E458.

Mack, M., Riethmuller, G., & Kufer, P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity.

Proceedings of the National Academy of Sciences 1995; 92:7021–7025.

Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I., & Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor.

Nature Biotechnology 2002; 20:70–75.

Maloney, D. G., Pez, A. J. G.-L., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T.-M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., And, & Levy, R. IDEC-C2B2 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade Non-Hodgkin's lymphoma.
Blood 1997; 90:2188–2195.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue.
Journal of Immunology 2014; 192:845–849.

Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., Baruchel, A., Boissel, N., Mechinaud, F., Balduzzi, A., Krueger, J., June, C. H., Levine, B. L., Wood, P., Taran, T., Leung, M., Mueller, K. T., Zhang, Y., Sen, K., Lebwohl, D., Pulsipher, M. A., & Grupp, S. A. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia.
New England Journal of Medicine 2018; 378:439–448.

Miao, H., Choi, B. D., Suryadevara, C. M., Sanchez-Perez, L., Yang, S., De Leon, G., Sayour, E. J., McLendon, R., Herndon, J. E., Healy, P., Archer, G. E., Bigner, D. D., Johnson, L. A., & Sampson, J. H. EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an invasive xenograft model of glioblastoma.
PLoS ONE 2014; 9:e94281.

Minguet, S., Swamy, M., Alarcón, B., Luescher, I. F., & Schamel, W. W. A. Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3.
Immunity 2007; 26:43–54.

Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape.
Current Opinion in Immunology 2014; 27:16–25.

Mond, J. J., Lees, A., & Snapper, C. M. T cell-independent antigens type 2.
Annual Review of Immunology 1995; 13:655–692.

Moscatello, D. K., Montgomery, R. B., Sundareshan, P., McDanel, H., Wong, M. Y., & Wong, A. J. Transformation and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor.
Oncogene 1996; 13:85–96.

Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Tykodi, S. S., Sosman, J. A., Procopio, G., Plimack, E. R., Castellano, D., Choueiri, T. K., Gurney, H., Donskov, F., Bono, P., Wagstaff, J., Gauler, T. C., Ueda, T., Tomita, Y., Schutz, F. A., Kollmannsberger, C., Larkin, J., Ravaud, A., Simon, J. S., Xu, L.-A., Waxman, I. M., & Sharma, P. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma.
New England Journal of Medicine 2015; 373:1803–1813.

Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M.-O., Bracarda, S., Barrios, C. H., Tomita, Y., Castellano, D., Rini, B. I., Chen, A. C., Mekan, S., McHenry, M. B., Wind-Rotolo, M., Doan, J., Sharma, P., Hammers, H. J., & Escudier, B. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma.

New England Journal of Medicine 2018; 378:1277–1290.

Munn, D. H. Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity.
Frontiers in Bioscience 2012; E4:734–745.

Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling.
Cancer Research 2009; 69:5627–5629.

Nagorsen, D., & Baeuerle, P. A. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab.
Experimental Cell Research 2011; 317:1255–1260.

Norsworthy, K. J., Ko, C., Lee, J. E., Liu, J., John, C. S., Przepiorka, D., Farrell, A. T., & Pazdur, R. FDA Approval Summary: Mylotarg for treatment of patients with relapsed or refractory CD33-positive acute myeloid leukemia.
The Oncologist 2018; 23:2017–0604.

North, B., Lehmann, A., & Jr, R. L. D. A new clustering of antibody CDR loop conformations.
Journal of Molecular Biology 2012; 406:228–256.

O'Rourke, D. M., Nasrallah, M. P., Desai, A., Melenhorst, J. J., Mansfield, K., Morrisette, J. J. D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S. F., Navenot, J.-M., Zheng, Z., Levine, B. L., Okada, H., June, C. H., Brogdon, J. L., & Maus, M. V. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma.
Science Translational Medicine 2017; 9:eaaa0984.

Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule.
Molecular Immunology 1994; 31:169–217.

Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.
Nature Reviews Cancer 2012; 12:252–264.

Parente-Pereira, A. C., Burnet, J., Ellison, D., Foster, J., Davies, D. M., Van Der Stegen, S., Burbridge, S., Chiapero-Stanke, L., Wilkie, S., Mather, S., & Maher, J. Trafficking of CAR-Engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice.
Journal of Clinical Immunology 2011; 31:710–718.

Persico, M. G., Liguori, G. L., Parisi, S., D'Andrea, D., Salomon, D. S., & Minchiotti, G. Cripto in tumors and embryo development.
Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer 2001, 1552:87–93.

Prakash, M. D., Munoz, M. A., Jain, R., Tong, P. L., Koskinen, A., Regner, M., Kleifeld, O., Ho, B., Olson, M., Turner, S. J., Mrass, P., Weninger, W., & Bird, P. I. Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling. *Immunity* 2014; 41:960–972.

Przepiorka, D., Ko, C. W., Deisseroth, A., Yancey, C. L., Candau-Chacon, R., Chiu, H. J., Gehrke, B. J., Gomez-Broughton, C., Kane, R. C., Kirshner, S., Mehrotra, N., Ricks, T. K., Schmiel, D., Song, P., Zhao, P., Zhou, Q., Farrell, A. T., & Pazdur, R. FDA approval: Blinatumomab. *Clinical Cancer Research* 2015; 21:4035–4039.

Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381:751–8.

Ramsay, A. G., Clear, A. J., Fatah, R., & Gribben, J. G. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: Establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* 2012; 120:1412–1421.

Reusch, U., Duell, J., Ellwanger, K., Herbrecht, C., Knackmuss, S. H. J., Fucek, I., Eser, M., McAleese, F., Molkenthin, V., Le Gall, F., Topp, M., Little, M., & Zhukovsky, E. A. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19+ tumor cells. *MAbs*. 2015; 7:584–604.

Rodgers, D. T., Mazagova, M., Hampton, E. N., Cao, Y., Ramadoss, N. S., Hardy, I. R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., Ma, J., Nunez, V., Shen, J., Woods, A. K., Wright, T. M., Schultz, P. G., Kim, C. H., & Young, T. S. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113:E459–E468.

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348:62–68.

Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Current Opinion in Immunology* 2009; 21:215–223.

Sadelain, M., Rivière, I., & Riddell, S. Therapeutic T cell engineering. *Nature* 2017; 545:423–431.

Schuster, M., Nechansky, A., Loibner, H., & Kircheis, R. Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal* 2006; 1:138–147.

Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12:278–287.

Singh, H., Figliola, M. J., Dawson, M. J., Olivares, S., Zhang, L., Yang, G., Maiti, S., Manuri, P., Senyukov, V., Jena, B., Kebriaei, P., Champlin, R. E., Huls, H., & Cooper, L. J. N. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PloS One* 2013; 8:e64138.

Slaney, C. Y., Kershaw, M. H., & Darcy, P. K. Trafficking of T cells into tumors.
Cancer Research 2014; 74:7168–7174.

Smyth, M. J., Thia, K. Y. T., Street, S. E. A., Macgregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. Perforin-mediated cytotoxicity Is critical for surveillance of spontaneous lymphoma.

The Journal of Experimental Medicine 2000; 192:755–760.

Su Huang, H. J., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., & Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling.
Journal of Biological Chemistry 1997; 272:2927–2935.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T., & Nagata, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand.

Cell 1994; 76:969–976.

Topczewska, J. M., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Sam, A., Hess, A. R., Wheaton, W. W., Nickoloff, B. J., Topczewski, J., & Hendrix, M. J. C. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: Role in melanoma aggressiveness.
Nature Medicine 2006; 12:925–932.

Trapani, J. A., & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.

Nature Reviews Immunology 2002; 2:735–47.

Valitutti, S., Müller, S., Salio, M., & Lanzavecchia, A. Degradation of T cell receptor (TCR)–CD3- ζ complexes after antigenic stimulation.

The Journal of Experimental Medicine 1997; 185:1859–1864.

van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice.

The Journal of Experimental Medicine 1996; 184:1781–90.

Van Der Merwe, P. A., & Dushek, O. Mechanisms for T cell receptor triggering.

Nature Reviews Immunology 2011; 11:47–55.

Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., & Dustin, M. L. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster.

Immunity 2006; 25:117–127.

Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer.

Annual Review of Immunology 2011; 29:235–271.

Voigt, M., Braig, F., Göthel, M., Schulte, A., Lamszus, K., Bokemeyer, C., & Binder, M. Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab.

Neoplasia 2012; 14:1023–31.

Wang, J., Jensen, M., Lin, Y., Sui, X., Chen, E., Lindgren, C. G., Till, B., Raubitschek, A., Forman, S. J., Qian, X., James, S., Greenberg, P., Riddell, S., & Press, O. W. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human Gene Therapy* 2007; 18:712–725.

Wang, S., & El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22:8628–8633.

Weiner, L. M., Surana, R., & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10:317–327.

Wikstrand, C., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., & Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *Journal of Neurovirology* 1998; 4:148–158.

Wilkie, S., Picco, G., Foster, J., Davies, D. M., Julien, S., Cooper, L., Arif, S., Mather, S. J., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J. M., & Maher, J. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *The Journal of Immunology* 2008; 180:4901–4909.

Woltjer, R. L., Lukas, T. J., & Staros, J. V. Direct identification of residues of the epidermal growth factor receptor in close proximity to the amino terminus of bound epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89:7801–7805.

Xu, C., Gagnon, E., Call, M. E., Schnell, J. R., Schwieters, C. D., Carman, C. V., Chou, J. J., & Wucherpfennig, K. W. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3 ϵ cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* 2008; 135:702–713.

Yan, Y.-T., Liu, J.-J., Luo, Y., E, C., Haltiwanger, R. S., Abate-Shen, C., & Shen, M. M. Dual roles of cripto as a ligand and coreceptor in the nodal signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22:4439–4449.

Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M. L., & Saito, T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature Immunology* 2005; 6:1253–1262, 6(12).

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., & Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8:591–599.

Zhou, X., Dotti, G., Krance, R. A., Martinez, C. A., Naik, S., Kamble, R. T., Durett, A. G., Dakhova, O., Savoldo, B., Stasi, A. Di, Spencer, D. M., Lin, Y. F., Liu, H., Grilley, B. J., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloreplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2015; 125:4103–4113.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

ADA	<i>Anti-drug antibodies</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AUC	<i>Area under the curve</i>
APC	Allophycocyanin
BiTe	<i>Bispecific T-cell engager</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
bsAk	Bispezifischer Antikörper
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDR	<i>Complementary determining region</i>
CRS	<i>Cytokine release syndrome</i>
Cy2	Cyanin 2
CTL	Zytotoxische T-Zellen
ddH ₂ O	<i>Double deionized water</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epithelial growth factor receptor, transcript variant III</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FasL	Fas-Ligand
Fc	<i>Fragment cristallizable</i>
FcyR	Fcy Rezeptor
Fc-EGF	<i>Fc-tagged EGF</i>
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
Gzm	Granzym
LDH	Laktatdehydrogenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mAk	monospezifischer Antikörper
min	Minuten

MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell-death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell-death protein 1 – ligand-1</i>
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PerCPCy5.5	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein-Cyanin 5.5
Prf	Perforin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAR	<i>Synthetic agonistic receptor</i>
scvF	<i>Single chain variable fragment</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TZR	T-Zell-Rezeptor
T _{CM}	<i>T central memory cells</i>
T _{EM}	<i>T effector memory cells</i>
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
T _{regs}	<i>T regulatory cells</i>
T _{SCM}	<i>T memory stem cells</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

8 Publikationen

8.1 Vorträge

Schmidbauer ML.

Combination of tetravalent, bispecific antibodies and adoptive T cell therapy for tumor immunotherapy. *1st Annual Retreat, i-Target*. Abtei Frauenwörth am Chiemsee (2015)

8.2 Veröffentlichte Arbeiten

Karches, C. H., Benmebarek, M.-R., **Schmidbauer, M. L.**, Kurzay, M., Klaus, R., Geiger, M., Rataj, F., Cadilha, B. L., Lesch, S., Heise, C., Murr, R., vom Berg, J., Jastroch, M., Lamp, D., Ding, J., Duewell, P., Niederfellner, G., Sustmann, C., Endres, S., Klein, C., & Kobold, S. Bispecific Antibodies Enable Synthetic Agonistic Receptor-Transduced T Cells for Tumor Immunotherapy.

Clinical Cancer Research. 2019. 5890–5901

JIF 8,9

Schmidbauer, M.L., Jones, S.A., Lim, K., Miles, R.G. Purulent pericarditis - a rare cause for pericardial effusions in a patient with chronic kidney disease.

Internal Medicine Journal 2018; 48:1004-1005.

JIF 1,9

Nicolai, L., **Schmidbauer M.L.**, Gradel, M., Ferch ,S., Antón, S., Hoppe, B., Pander, T., von der Borch, P., Pinilla, S., Fischer, M., Dimitriadis, K. Facebook groups as a powerful and dynamic tool in medical education: mixed-method study.

Journal of Medical Internet Research 2017; 19:e408.

JIF 5,2

9 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stefan Endres, der durch großes Engagement und Begeisterung für die Ausbildung junger Mediziner und Wissenschaftler als Abteilungsleiter ein hervorragendes Arbeitsumfeld in der Abteilung für Klinische Pharmakologie geschaffen hat.

Bei Herrn PD. Dr. Sebastian Kobold möchte ich mich herzlich für die herausragende wissenschaftliche Begleitung und Förderung während der Promotionsphase, sowie für die Auswahl des Themas bedanken. Seine Leidenschaft für die Tumorimmunologie und die Wissenschaft als Ganzes waren stets inspirierend.

Ebenso möchte ich den Kooperationspartnern der Firma Roche, insbesondere Dr. Gerhard Niederfellner, Dr. Christian Klein und Dr. Claudio Sustmann, für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Besonderer Dank gilt allen Doktoranden und Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie. Ich bin sehr glücklich heute viele davon als gute Freunde an meiner Seite zu haben.

Ohne den ständigen Rückhalt und Förderung durch meine Familie wäre ein Gelingen der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Insbesondere meinen Eltern danke ich dafür. Herzlichsten Dank auch an Lavinia, für ihr Verständnis, ihren großen Rückhalt und als wichtige Quelle meiner Tatkraft.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Moritz L. Schmidbauer, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Funktionalität, Spezifität und Wirkmechanismus von *synthetic agonistic receptor T*-Zellen in Kombination mit tетravalenten, bispezifischen Antikörpern“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 17. Oktober 2019

(Moritz Luigi Schmidbauer)