

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

***Synthetic agonistic receptor* T-Zellen in Kombination mit den bispezifischen  
Antikörpern anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und anti-EGFRvIII x anti-MCSP zur  
Behandlung maligner Melanomzellen *in vitro***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Julius Johannes Keyl  
aus Regensburg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Lucie Heinzerling  
Prof. Dr. med. Matthias Volkenandt

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
Dr. Felicitas Stein

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2021

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das maligne Melanom .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Therapie .....	1
1.1.2.1	<i>Allgemein</i> .....	1
1.1.2.2	<i>MAP-Kinase-Inhibitoren</i> .....	1
1.1.2.3	<i>Immun-Checkpoint-Inhibitoren</i> .....	2
1.2	Adoptiver T-Zell-Transfer .....	2
1.2.1	Überblick.....	2
1.2.2	Barrieren solider Tumoren .....	4
1.2.3	Toxizitäten .....	5
1.3	Vorarbeiten .....	6
1.4	Versuchsaufbau.....	6
1.5	Auswahl der Zielantigene.....	7
1.5.1	TYRP1 .....	7
1.5.2	MCSP .....	8
1.6	Aufbau der bispezifischen Antikörper .....	8
1.7	Zielsetzung .....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	10
2.1.1	Geräte.....	10
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	11
2.1.3	Puffer.....	12
2.1.4	Zellkultur .....	12
2.1.4.1	<i>Reagenzien</i> .....	12
2.1.4.2	<i>Zellmedien</i> .....	13
2.1.4.3	<i>Zelllinien</i> .....	13
2.1.4.4	<i>Antikörper</i> .....	14
2.1.4.5	<i>Zytokine</i> .....	14
2.1.4.6	<i>Primer</i> .....	14
2.2	Zellbiologische Methoden .....	14
2.2.1	Zellkultur .....	14
2.2.1.1	<i>Allgemeines Vorgehen</i> .....	14
2.2.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> .....	15
2.2.1.3	<i>Zellzahlbestimmung</i> .....	15
2.2.2	Generierung einer TYRP1-überexprimierenden Tumorzelllinie .....	15
2.2.3	Isolierung und Transduktion muriner T-Zellen .....	16

2.2.4	Isolierung und Transduktion humaner T-Zellen .....	17
2.3	Funktionelle Assays .....	18
2.3.1	Stimulationsassays .....	18
2.3.2	ELISA .....	18
2.3.3	Zytotoxizitätsassays .....	19
2.3.4	Durchflusszytometrie .....	19
2.3.5	Proliferationsassays .....	19
2.4	Statistische Auswertung .....	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
3.1	Anti-EGFRvIII x anti-TYRP1-bispezifische Antikörper .....	20
3.1.1	Generierung einer TYRP1-überexprimierenden Melanomzelllinie .....	20
3.1.2	Murine E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP .....	20
3.1.2.1	<i>Spezifische Aktivierung der E3-T-Zellen durch YUMM1.1TYRP</i> .....	20
3.1.2.2	<i>Spezifische Zytotoxizität gegen YUMM1.1TYRP</i> .....	22
3.1.2.3	<i>Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP auf die T-Zellproliferation</i> .....	24
3.1.2.4	<i>Phänotypisierung der T-Zellen</i> .....	24
3.1.3	Murine E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10 .....	26
3.1.3.1	<i>Spezifische T-Zell-Aktivierung durch B16F10</i> .....	26
3.1.3.2	<i>Spezifische Zytotoxizität gegen B16F10</i> .....	27
3.1.3.3	<i>Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10 auf die T-Zellproliferation</i> .....	29
3.1.3.4	<i>Phänotypisierung der T-Zellen</i> .....	29
3.2	Anti-EGFRvIII x anti-MCSP-bispezifische Antikörper .....	31
3.2.1	MCSP-Expression der humanen Melanomzelllinien A375 und MV3 .....	31
3.2.2	Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-MCSP auf die Aktivierung humaner E3-T-Zellen .....	31
3.2.2.1	<i>MCSP-abhängige T-Zell-Aktivierung</i> .....	31
3.2.2.2	<i>Spezifische T-Zell-Aktivierung durch A375-Melanomzellen</i> .....	32
3.2.2.3	<i>Spezifische T-Zell-Aktivierung durch MV3-Melanomzellen</i> .....	33
3.2.3	Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-MCSP auf die Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen .....	34
3.2.3.1	<i>Spezifische Zytotoxizität gegen A375-Melanomzellen</i> .....	34
3.2.3.2	<i>Spezifische Zytotoxizität gegen MV3-Melanomzellen</i> .....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
4.1	Zusammenfassung .....	37
4.2	Bedeutung einer modulierbaren Anti-Tumor-Aktivität .....	37
4.3	Risiko und Nutzen der T-Zell-Proliferation .....	38

4.4	Relevanz des Immunphänotyps am Beispiel von PD-1 und CD69 .....	38
4.5	Aufbau des E3-Fusionsrezeptors und mögliche Veränderungen.....	39
4.6	Potenzial der ausgewählten Zielantigene .....	40
4.7	Charakteristika der bispezifischen Antikörper und alternativer Formate .....	41
4.8	Immuntherapien zur Behandlung des malignen Melanoms .....	42
4.9	Modulierbare SAR-T-Zellen im Vergleich zu konventionellen CAR-T-Zellen	44
4.9.1	Steuerung einer ausgewogenen T-Zell-Aktivität.....	44
4.9.2	Umgang mit tumoraler Heterogenität und Resistenzmechanismen .....	45
4.10	Vergleich von SAR-T-Zellen mit weiteren modulierbaren T-Zell-Therapien .	46
4.11	Ausblick .....	47
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>64</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das maligne Melanom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom liegt in Deutschland sowohl bei Frauen als auch bei Männern an fünfter Stelle aller Krebsneuerkrankungen (Robert Koch-Institut 2018). Zusätzlich steigt die Inzidenz in fast allen Ländern weltweit seit vielen Jahrzehnten stetig und wird voraussichtlich auch in Zukunft unter anderem durch eine alternde Gesellschaft und veränderte Lebensweisen weiter ansteigen (Erdmann, Lortet-Tieulent et al. 2013). So hat sich allein in Deutschland seit 1980 die Inzidenz des malignen Melanoms unter anderem aufgrund verbesserter Screeningverfahren mehr als verdreifacht (Robert Koch-Institut 2018). Weltweit wurden im Jahr 2012 232.000 und im Jahr 2018 bereits über 287.000 neue Fälle registriert, was einer Zunahme von mehr als 20 % entspricht (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015, Bray, Ferlay et al. 2018). Trotz sehr guter 5-Jahres-Überlebensraten von über 90 % bei einem lokalisierten Befund, lag diese Rate bei Patienten in einem metastasierten Stadium lange Zeit lediglich bei 17 % (American Cancer Society 2016). In den letzten Jahren entstanden unter anderem durch Fortschritte in der Immuntherapie und zielgerichteter Therapien neue Behandlungsmöglichkeiten, welche die Standardtherapie aus operativer Tumorentfernung und Chemotherapie erweiterten und teilweise ersetzen. Erste Daten zeigten nun durch Immuntherapien deutlich gesteigerte 5-Jahres-Überlebensraten von 52 %. Eine komplette Remission bleibt jedoch trotz dieses Fortschritts beim metastasierten Melanom weiterhin eher selten (Callahan, Kluger et al. 2018, Larkin, Chiarion-Sileni et al. 2019).

#### 1.1.2 Therapie

##### 1.1.2.1 Allgemein

Patienten mit malignem Melanom versterben im Verlauf der Erkrankung typischerweise nicht am Primärtumor. Die Mortalität des malignen Melanoms liegt vielmehr in der hohen Tendenz zur Metastasierung begründet, wobei bei den meisten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Fernmetastasen nachweisbar sind. Der Metastasierungsgrad, der unter anderem durch die Infiltrationstiefe, Ulzeration und Lage des Primärtumors beeinflusst wird, hat somit im Verlauf der Erkrankung entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Patienten. Prognostisch ungünstig sind im Krankheitsverlauf insbesondere viszerale Metastasen, die vor allem in Lunge, Gehirn, Leber und Knochen zu finden sind (Balch, Soong et al. 2001, Tas 2012). Als Therapie rät die aktuelle S3-Leitlinie von 2019 bei einem lokal begrenzten Melanom zu einer operativen R0-Resektion, die mit sehr guten Heilungsaussichten verbunden ist. Liegen jedoch Fernmetastasen vor, so wird abhängig vom Mutationsstatus in erster Linie eine systemische Therapie mit MAP-Kinase-Inhibitoren oder Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2019).

##### 1.1.2.2 MAP-Kinase-Inhibitoren

*Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) sind Teil des MAP-Kinase-Wegs, der unter anderem einen großen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose menschlicher Zellen hat. Aktivierende Mutationen im Verlauf dieses Signalwegs nehmen aufgrund der vielfältigen regulatorischen Funktionen deshalb häufig eine Schlüsselrolle in der Onkogenese ein und sind das Ziel verschiedener inhibitorischer Therapiemodelle (Friday, Adjei 2008). Ob ein Patient sich für eine Therapie mit MAP-Kinase-Inhibitoren eignet, ist somit in erster Linie vom Mutationsstatus des jeweiligen Melanoms abhängig. Ungefähr 40 % aller malignen Melanome weisen eine Mutation des BRAF-Onkogens auf, das als Teil des MAP-Kinase-Wegs die Transkription und

Proliferation von Melanozyten entscheidend reguliert (Hartmann, Schirmacher et al. 2019). Patienten mit einer solchen Mutation profitieren von einer Inhibition der BRAF-Kinase, was zur Entwicklung des BRAF-Inhibitors Vemurafenib führte. In Kombination mit Cobimetinib, einem anderen Inhibitor der gleichen Signalkaskade, konnte eine drastisch verlängerte mediane Überlebenszeit bei Patienten mit BRAF-positiven Tumoren erreicht werden. Es zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 31 % und eine komplette Remission konnte bei immerhin 21 % aller Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien beobachtet werden (Ascierto, Dreno et al. 2021).

### 1.1.2.3 Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren

Eine weitere Therapieoption bieten Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren, die nach derzeitigem Stand bezüglich der Therapieempfehlung als gleichwertig zu MAP-Kinase-Inhibitoren erachtet werden und auch bei fehlender BRAF-Mutation infrage kommen. Im Unterschied zu MAP-Kinase-Inhibitoren, die direkt in die Signalübertragung des Tumors eingreifen, beruhen Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren auf der Interaktion mit körpereigenen T-Zellen. Immun-*Checkpoints* wie *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) oder *programmed cell death protein 1* (PD-1) sind Rezeptoren auf der Oberfläche dieser T-Zellen. Nach Bindung ihrer Liganden CD80 oder CD86 beziehungsweise *programmed death-ligand 1* (PD-L1) können sie die T-Zell-Aktivität regulieren und somit überschießende Immunreaktionen vermeiden. Die derzeit eingesetzten Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper, die an einen Immun-*Checkpoint* (z.B. PD-1) oder dessen Liganden (z.B. PD-L1) binden und dadurch eine Immunantwort verstärken oder überhaupt ermöglichen (Iwai, Ishida et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade dieser Immun-*Checkpoints* die T-Zellantwort gegen Tumoren insbesondere bei immunogenen Tumoren wie dem malignen Melanom steigern kann (van Elsas, Hurwitz et al. 1999, Van Allen, Miao et al. 2015). Die Immunogenität des malignen Melanoms basiert dabei unter anderem auf der im Vergleich zu anderen Tumorentitäten hohen Expressionsrate von Neoantigenen. Diese können von T-Zellen erkannt werden und erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer, durch Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren vermittelten, effizienten Immunantwort (Schumacher, Schreiber 2015). Der CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab erhöhte so erstmals in klinischen Studien sowohl die mediane Überlebenszeit als auch das Therapieansprechen von Melanompatienten (Hodi, O'Day et al. 2010). Neuere Daten zeigten bei einer Monotherapie mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab eine 5-Jahres-Überlebensrate von 44 % gegenüber 26 % bei einer Monotherapie mit Ipilimumab. Eine kombinierte Therapie mit beiden Substanzen führte bei diesen Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom sogar zu einer Überlebensrate von 52 %. Nivolumab scheint dabei auch bei Patienten mit PD-L1-negativem Melanom die Überlebensrate zu erhöhen. Trotz dieser beachtlichen Erfolge lag die Rate einer kompletten Remission beim metastasierten Melanom bei diesen Therapien zuletzt noch bei maximal 22 % (Larkin, Chiarion-Sileni et al. 2019).

## 1.2 Adoptiver T-Zell-Transfer

### 1.2.1 Überblick

Um den Therapieerfolg in fortgeschrittenen Tumorstadien weiter zu verbessern, wird auch an dem direkten therapeutischen Einsatz von Immunzellen gearbeitet. Der adoptive Zelltransfer bezeichnet dabei die therapeutische Gabe insbesondere autologer Immunzellen, die zuvor auf verschiedene Weisen aufbereitet, selektiert und zum Teil auch genetisch modifiziert wurden. Obwohl verschiedene Zelltypen positive Ergebnisse zeigten, liegt ein besonders vielversprechender Ansatz im adoptiven Zelltransfer von T-Zellen. So ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass T-Zellen, die sich gegen ein Tumorantigen richten, effektiv zur Tumorlyse beitragen können (Kawakami,

Eliyahu et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen der Melanom-DNA zur Expression von tumorspezifischen Antigenen führen und diese teilweise auch von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten erkannt werden können (van der Bruggen, Traversari et al. 1991, Robbins, El-Gamil et al. 1996). Da das maligne Melanom im Vergleich zu anderen Tumorentitäten sehr viele somatische Mutationen besitzt, können T-Zellen, die gegen mutierte Antigene gerichtet sind, somit eine effektive Therapieoption darstellen (Walia, Mu et al. 2012).

Adoptive T-Zell-Therapien werden in tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und gentechnisch veränderte T-Zellen aus peripherem Blut unterteilt. Zur Gewinnung von TIL wird dem Patienten Tumorgewebe entnommen, die darin enthaltenen Lymphozyten isoliert und tumorreaktive Zellen selektiert. Diese Subpopulationen werden spezifisch expandiert und dem Patienten nach der Gewinnung einer ausreichenden Zellzahl reinfundiert. Beim malignen Melanom wurde der Einsatz von TIL klinisch ausführlich untersucht und konnte bei bis zu 22 % der Patienten im metastasierten Tumorstadium zu einer kompletten Remission führen (Dudley, Gross et al. 2010, Rosenberg, Yang et al. 2011). Eine Analyse der TIL, die bei Patienten zu einer Remission geführt hatten, zeigte, dass sich im Zellgemisch dominante Subpopulationen gebildet hatten, die sich zudem häufig gegen ähnliche Tumorantigene richteten. Dies legte nahe, dass eventuell nur einige wenige, selektiv expandierende T-Zellklone für den Therapieerfolg verantwortlich waren und deren Persistenz mit dem Ausmaß der Tumorregression korrelierte (Robbins, Dudley et al. 2004, Zhou, Dudley et al. 2004). In der Therapievorbereitung stellte sich jedoch die Gewinnung von ausreichend Tumormaterial und die Expansion der TIL bei vielen Patienten als schwierig dar. Selbst wenn diese Schritte erfolgreich verliefen, war die Persistenz der Zellen nach Reinfusion in den Patienten häufig zu kurz für eine effektive Therapie (Dudley, Wunderlich et al. 2001, Dudley, Wunderlich et al. 2002). So konnten in einer Studie bei 67 % der 402 Patienten mit metastasiertem Melanom spezifisch aktivierbare TIL gewonnen werden, die letztlich nur bei 27 % aller Patienten eingesetzt werden konnten (Goff, Smith et al. 2010). Die Idee lag nahe, gentechnisch veränderte Zellen zu entwickeln, die unabhängig von der Immunogenität des jeweiligen Tumors stabil expandiert werden können und deren modulierbarer Phänotyp zu einem längeren Überleben der Zellen *in vivo* führt (Gattinoni, Klebanoff et al. 2005).

Eine Art dieser genveränderten T-Zellen sind *T-cell-receptor* (TCR)-modifizierte T-Zellen. Zur Generierung dieser TCR-T-Zellen werden den Patienten native T-Zellen aus dem Blut entnommen und retroviral transduziert, sodass sie einen definierten T-Zell-Rezeptor exprimieren. T-Zell-Rezeptoren binden intrazelluläre und extrazelluläre Peptide, die zunächst aufbereitet und dann gebunden an *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen von allen kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Diese MHC-Restriktion führt dazu, dass ein bestimmter TCR nur bei Patienten mit passendem MHC-Typ eingesetzt werden kann (Phan, Rosenberg 2013). Bei Melanompatienten zeigten TCR-T-Zellen vielversprechende Effekte mit einer Ansprechrate von bis zu 30 %. Dies war jedoch verbunden mit ausgeprägten *on-target-off-tumor*-Toxizitäten, da die verwendeten Zielantigene auch auf gesundem Gewebe exprimiert waren (Morgan, Dudley et al. 2006, Johnson, Morgan et al. 2009). Zudem scheint erstaunlicherweise gerade die hohe Affinität der modifizierten TCR-T-Zellen und eine dadurch nur kurzzeitige Bindung an kreuzreaktive Peptide Toxizitäten zu begünstigen (Morris, Stauss 2016).

Eine weitere Art genveränderter T-Zellen sind *chimeric-antigen-receptor*-T-Zellen (CAR-T-Zellen). Hierfür werden dem Patienten T-Zellen aus dem Blut entnommen und genetisch verändert, sodass sie extrazellulär typischerweise das *single chain variable fragment* (scFv) eines Antikörpers exprimieren, das sich spezifisch gegen ein Zielantigen richtet. Intrazellulär ist an das scFv als Signalpeptid die CD3 $\zeta$ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors gekoppelt, welche nach Antigenbindung die Aktivierung der T-

Zelle vermittelt (Irving, Weiss 1991). Um die T-Zellantwort zu verstärken und das langfristige Überleben der T-Zellen zu verbessern, sind an diese Untereinheit noch eine oder mehrere kostimulatorische Domänen wie CD28 oder 4-1BB gebunden (Kowolik, Topp et al. 2006, Milone, Fish et al. 2009). CAR-T-Zellen ermöglichen in der Folge eine unmittelbare T-Zellantwort, unabhängig von einer MHC-vermittelten Antigenpräsentation (Gross, Waks et al. 1989). Dies birgt jedoch den Nachteil, dass nur an der Zelloberfläche exprimierte Antigene gebunden werden können und im Unterschied zu TCR-T-Zellen die Bindung an intrazelluläre Antigene durch bisher klinisch eingesetzte CAR-T-Zellen nicht möglich ist (Phan, Rosenberg 2013). Derzeit wird deshalb auch an der Entwicklung von CAR-T-Zellen gearbeitet, die MHC-abhängig intrazelluläre Peptide binden können (Maus, Plotkin et al. 2016). In der Therapie hämatologischer Tumoren wie dem B-Zell-Lymphom konnte mit CAR-T-Zellen eine komplette Remissionsrate von 54 % erzielt werden (Neelapu, Locke et al. 2017). Bei soliden Tumoren wurden solche überzeugenden Ergebnisse jedoch bisher nicht erreicht (Beatty, Haas et al. 2014, Feng, Guo et al. 2016).

### 1.2.2 Barrieren solider Tumoren

Im Vergleich zu hämatologischen Tumoren müssen zelluläre Therapien im Kampf gegen solide Tumoren wie dem malignen Melanom eine Vielzahl zusätzlicher Hindernisse überwinden. Nach der intravenösen Applikation adoptiver T-Zellen behindern Tumorzellen durch die Beeinflussung einer Vielzahl von Faktoren sowohl die Adhäsion von Lymphozyten an die Gefäßwand als auch deren Extravasation aus den Gefäßen (Slaney, Kershaw et al. 2014). Eine weitere wichtige Rolle bei der Tumordinfiltration durch T-Zellen spielen Chemokine, die unter anderem auch von Tumorzellen gebildet werden und die Migration von Immunzellen ins Tumormikromilieu vermitteln (Nagarsheth, Wicha et al. 2017). Auch beim malignen Melanom besteht ein Zusammenhang zwischen einer Chemokinsekretion und der T-Zell-Infiltration, wobei Melanommetastasen mit niedriger Chemokinsekretion eine geringere Migration zeigten (Harlin, Meng et al. 2009). In verschiedenen Studien wurden CAR-T-Zellen untersucht, die zusätzlich einen Chemokinrezeptor exprimieren, wodurch eine verstärkte intratumorale Migration und eine bessere Anti-Tumor-Aktivität ermöglicht wird (Di Stasi, De Angelis et al. 2009, Rapp, Grassmann et al. 2016). Die Relevanz einer erfolgreichen Tumordinfiltration wurde durch Studien mit direkter intratumoraler Injektion der CAR-T-Zellen verdeutlicht, die bei verschiedenen Tumorentitäten ein gutes Ansprechen zeigten (Brown, Alizadeh et al. 2016, Tchou, Zhao et al. 2017). Diese Therapieform ist jedoch auf lokale Befunde begrenzt und bei multipler Metastasierung kaum anwendbar (Rafiq, Hackett et al. 2019).

Selbst nach erfolgreicher Tumordinfiltration verhindert die immunsuppressive Umgebung des Tumormikromilieus durch umgebende Immunzellen wie regulatorische T-Zellen und *myeloid-derived suppressor-cells* (MDSC) die Aktivierung tumor-infiltrierender T-Zellen (Jordan, Amaria et al. 2013, Suzuki, Onishi et al. 2013). Zusätzlich werden auch durch Tumorzellen lösliche Faktoren wie *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) oder Interleukin-10 ausgeschüttet, die die Immunzellen in ihrer Funktion beeinträchtigen (Brandacher, Perathoner et al. 2006, Lippitz 2013). Eine weitere Form der Immunsuppression erfolgt durch die Ausbildung von Immun-*Checkpoints* auf Tumorzellen. Durch die Entwicklung von klinisch bereits erfolgreich eingesetzten Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren sind das Oberflächenprotein *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA 4) und insbesondere auch das *programmed cell death protein 1* (PD-1) mit dessen Liganden *programmed cell death protein ligand 1* (PD-L1) in den Fokus der Öffentlichkeit geraten. Durch Interaktion von PD-L1 mit PD-1 folgt eine Hemmung der Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen und eine Unterdrückung der CD28-Kostimulation (Freeman, Long et al. 2000). Die alleinige Expression von PD-L1 auf Tumorzellen führt so bereits zu einer verringerten T-Zell-

Zytotoxizität, einer generell verminderten Anti-Tumor-Immunität und schließlich sogar zur Immunevasion des malignen Melanoms und anderer Tumorarten (Juneja, McGuire et al. 2017, Noguchi, Ward et al. 2017). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein tumorinfiltrierender T-Zellen beim malignen Melanom generell mit einer verstärkten Expression von PD-L1 verbunden war. Dies unterstreicht die klinische Bedeutung in Zusammenhang mit T-Zell-Therapien (Taube, Anders et al. 2012).

Eine weitere wichtige Hürde der T-Zell-Therapie bildet die Wahl der Zielantigene auf der Tumorzelle. Die Entdeckung von CD19 als Ziel von Immuntherapien hat einen großen Anteil am erfolgreichen Einsatz zielgerichteter Therapien bei hämatologischen Tumorerkrankungen. CD19 wird homogen auf fast allen B-Zell-Linien und ansonsten auf keinen weiteren gesunden Zellen des menschlichen Organismus exprimiert (LeBien, Tedder 2008). Bei soliden Tumoren konnte bisher kein vergleichbares Antigen gefunden werden. Durch variierende Synthese- und Expressionsprofile, verbunden mit starker inter- und intratumoraler Heterogenität, sind die bisher zur Auswahl stehenden Antigene entweder nicht homogen auf den Tumorzellen exprimiert oder auch auf gesunden Körperzellen nachzuweisen. Dies birgt die Gefahr von *on-target-off-tumor*-Effekten, da die T-Zellen nicht mehr zwischen gesundem und malignem Gewebe differenzieren können. In der Folge kann dies zu erheblichen Toxizitäten, multiplen Organversagen und zum Tode führen (Morgan, Yang et al. 2010, Lamers, Sleijfer et al. 2013). Theoretisch ist ebenso eine Kreuzreaktivität mit *off-target-off-tumor*-Antigenen vorstellbar. Auch bei Antigenen, die klinisch aktuell eingesetzt werden, wie *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) und *epidermal growth factor receptor* (EGFR), zeigt die Expressionsrate eine beträchtliche intratumorale Heterogenität (Eskilsson, Rosland et al. 2018, Hosonaga, Arima et al. 2018). Bei Therapien, die auf lediglich ein Tumorantigen abzielen, kann dies durch den entstehenden Selektionsdruck in einer Herunterregulation oder Mutation des Antigens resultieren. Auf diese Weise entstand sogar bei Patienten mit einer hochpositiven CD19-B-Zell-Leukämie ein antigen-negatives Tumorrezidiv (Maude, Frey et al. 2014, Lee, Kochenderfer et al. 2015). In diesem Fall können zellbasierte Therapien die Tumorzellen nicht mehr als solche erkennen und bleiben ineffizient. Eine kombinierte Therapie gegen multiple Antigene könnte in diesem Zusammenhang eine Lösung bieten (Hegde, Corder et al. 2013, Ruella, Barrett et al. 2016).

### 1.2.3 Toxizitäten

Die besonderen Nebenwirkungen T-Zell-basierter Therapien beruhen darauf, dass sie eine lebende Therapieform darstellen. Im Gegensatz zu chemischen Therapeutika unterliegen sie somit auch keiner vorhersehbaren Ausscheidung. Während Antikörper wie Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren nach Stunden bis Tagen renal aus dem Körper entfernt werden, können T-Zellen insbesondere nach Antigenkontakt weiterhin proliferieren und kontinuierlich Zytokine ausschütten. Diese für die erfolgreiche Therapie förderliche Eigenschaft, hat bei vielen Patienten ein *cytokine release syndrome* (CRS) in unterschiedlicher Ausprägung zur Folge. Hierbei führt die starke Aktivierung der T-Zellen zu hohen Konzentrationen von Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-6 im Blut der Patienten (Teachey, Lacey et al. 2016). Diese proinflammatorischen Zytokine verursachen Symptome variablen Ausmaßes, die sich zu Beginn durch Fieber, Tachykardie und Hypotonie äußern und in der Folge zu schweren Organschäden führen können (Grupp, Kalos et al. 2013, Brudno, Kochenderfer 2016). Da die T-Zellen nach erfolgter Injektion in den Patienten kaum mehr aus dem Körper entfernt werden können, bestand die einzige Behandlungsmöglichkeit bei vielen Patienten lange Zeit lediglich in der symptomatischen Therapie des CRS. Bei schweren Fällen konnte zur ausreichenden Symptomkontrolle nur eine systemische Immunsuppression mit Steroiden durchgeführt

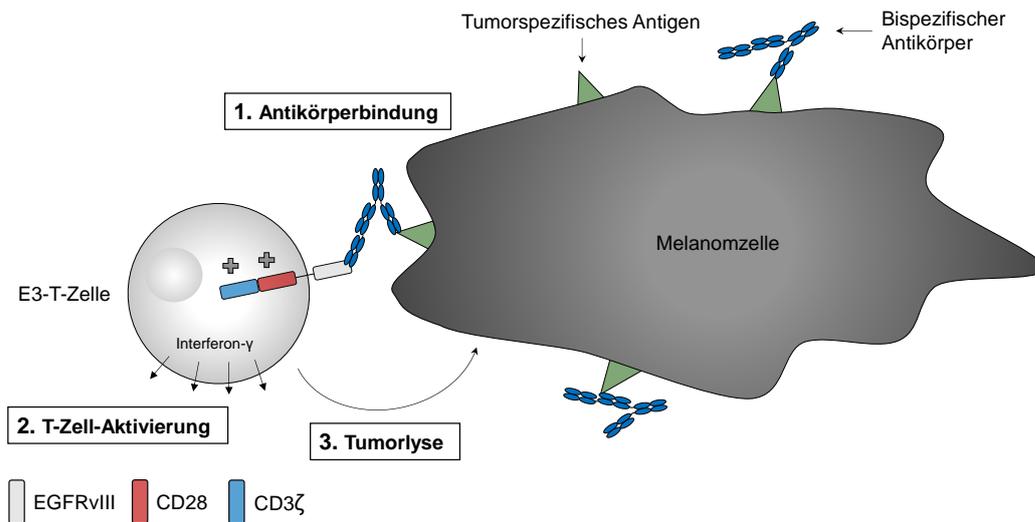
werden, die jedoch die gewünschte Anti-Tumor-Effektivität negativ beeinflusste (Davila, Riviere et al. 2014).

### 1.3 Vorarbeiten

Bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde untersucht, wie die Effektivität CAR-T-Zell-basierter Therapien mit der Steuerbarkeit antikörperbasierter Therapien zur Behandlung von Tumoren kombiniert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass bispezifische Antikörper (BiAk) eine verstärkte T-Zellinfiltration und Anti-Tumor-Aktivität von Marker-transduzierten T-Zellen vermitteln. Als Marker dienten *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) beziehungsweise EGFR. Die BiAk erleichterten dabei die Bindung der T-Zelle an Tumorzellen, wobei die eigentliche T-Zell-Aktivierung über einen weiteren TCR oder CAR eingeleitet wurde (Kobold, Steffen et al. 2015). Dies führte zur Entwicklung von *synthetic agonistic receptor* (SAR) T-Zellen, einer neuen Klasse genmodifizierter Zellen, die mit einem künstlichen Fusionsrezeptor transduziert und über die Vermittlung von bispezifischen Antikörpern (BiAk) aktiviert werden können. SAR-T-Zellen zeichnen aus, dass sie im Unterschied zu CAR-T-Zellen kein scFv exprimieren. Die extrazelluläre Domäne wird dagegen durch ein Antigen gebildet, das als Bindestelle für den BiAk dient. Intrazellulär sind zudem, ähnlich zu einem CAR, verschiedene aktivierende Signaldomänen gebunden. E3-T-Zellen sind dabei eine Unterart von SAR-T-Zellen, die mit einem E3-Fusionsrezeptor transduziert wurden. Die Expressierung des E3-Fusionsrezeptors ermöglichte eine spezifische Anti-Tumor-Aktivität gegen EpCAM- beziehungsweise Mesothelin-überexprimierende Tumorzelllinien (Karches, Benmebarek et al. 2019). Dadurch wird es möglich, eine bestimmte Anzahl dieser E3-T-Zellen durch die Kombination mit BiAk spezifisch gegen ein oder mehrere Tumorantigene zu richten und diese sowohl im Ausmaß der Tumorlyse als auch der Auswahl der Zielantigene im Verlauf der Therapie zu modulieren.

### 1.4 Versuchsaufbau

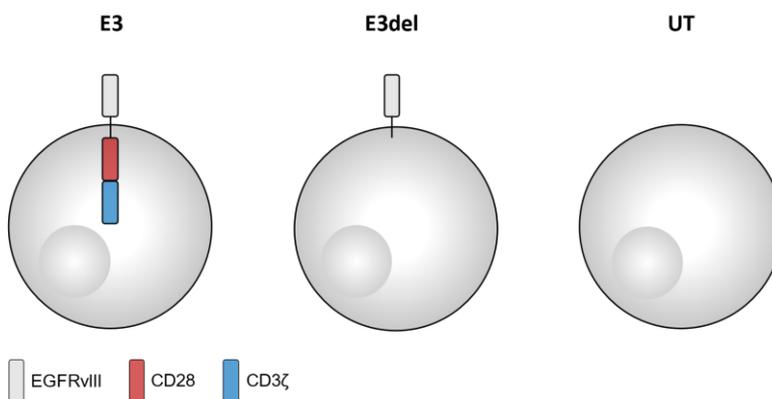
Auf Grundlage dieser Ergebnisse soll nun in einem nächsten Schritt die Effektivität von SAR-T-Zellen in Kombination mit BiAk im malignen Melanom untersucht werden. In dieser Arbeit sollen dafür murine und humane T-Zellen mit dem Fusionsrezeptor E3 ausgestattet werden, dessen extrazelluläre Domäne durch das humane Antigen *epidermal growth factor receptor variant III* (EGFRvIII) gebildet wird. EGFRvIII ist eine tumorspezifische Variante des EGFR, welcher auf gesundem Gewebe nicht exprimiert wird (Heimberger, Crotty et al. 2003). Im Gegensatz zu CAR-T-Zellen exprimieren diese E3-T-Zellen somit kein scFv und sind ohne BiAk als Adapter funktionslos. Intrazellulär sind eine CD3 $\zeta$ -Kette sowie eine CD28-Untereinheit zur T-Zell-Aktivierung beziehungsweise Kostimulation gebunden. Um diese E3-T-Zellen variabel gegen verschieden Zielantigene richten zu können, werden sie mit BiAk im IgG-Format kombiniert. Diese binden mit einem Arm an die extrazelluläre EGFRvIII-Domäne des Fusionsrezeptors der E3-T-Zellen und mit dem anderen an ein tumorspezifisches Peptid. Der BiAk stellt somit den engen Kontakt zwischen transduzierten T-Zellen und Tumorzellen her und vermittelt die Ausbildung einer immunologischen Synapse. Über den E3-Fusionsrezeptor setzt dies eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die zunächst zur T-Zell-Aktivierung und schließlich zur Tumorlyse führt.



**Abbildung 1: Ablauf der Tumorlyse durch E3-T-Zellen unter Vermittlung von bispezifischen Antikörpern**

Dargestellt ist eine vereinfachte Funktionsweise des Therapiekonzepts. **(1)** Bindung des bispezifischen Antikörpers anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 bzw. anti-EGFRvIII x anti-MCSP an TYRP1 auf murinen bzw. MCSP auf humanen Melanomzellen. **(2)** Dies führt über CD28 und CD3ζ zur Aktivierung der E3-T-Zelle und zur Ausschüttung von IFN-γ. **(3)** Es folgt die Tumorlyse durch die E3-T-Zelle unter Ausbildung einer immunologischen Synapse.

Um zu verifizieren, dass jeglicher Anti-Tumor-Effekt allein durch den E3-Fusionsrezeptor auf die T-Zellen vermittelt wird, werden zudem die zwei weiteren T-Zell-Populationen E3del-T-Zellen (E3del) und untransduzierte T-Zellen (UT) als Negativkontrollen verwendet. Die E3del-Population wird mit einer verkürzten Variante des E3-Fusionsrezeptors transduziert. Dieser fehlen die intrazellulären Domänen, weshalb eine extrazelluläre Bindung an EGFRvIII zu keiner Signalübertragung in der T-Zelle führt. Den untransduzierten T-Zellen fehlt der Fusionsrezeptor gänzlich, weshalb keine Bindung mit dem BiAk und in der Folge keine Interaktion mit dem Zielantigen der Tumorzelle stattfinden kann.



**Abbildung 2: Darstellung der eingesetzten T-Zellkonstrukte**

Murine und humane T-Zellen wurden mit dem vollständigen Fusionsrezeptor (EGFRvIII-CD28-CD3ζ) transduziert (**E3**). Als Kontrolle wurden T-Zellen mit einer verkürzten, funktionslosen Variante des Rezeptors (**E3del**) und gänzlich untransduzierte T-Zellen (**UT**) verwendet. Modifiziert nach Karches, Bennebarek et al. (2019).

## 1.5 Auswahl der Zielantigene

### 1.5.1 TYRP1

*Tyrosinase-related protein 1* (TYRP1) ist ein Transmembranprotein, das spezifisch sowohl auf murinen, als auch humanen Melanozyten und Melanomzellen exprimiert

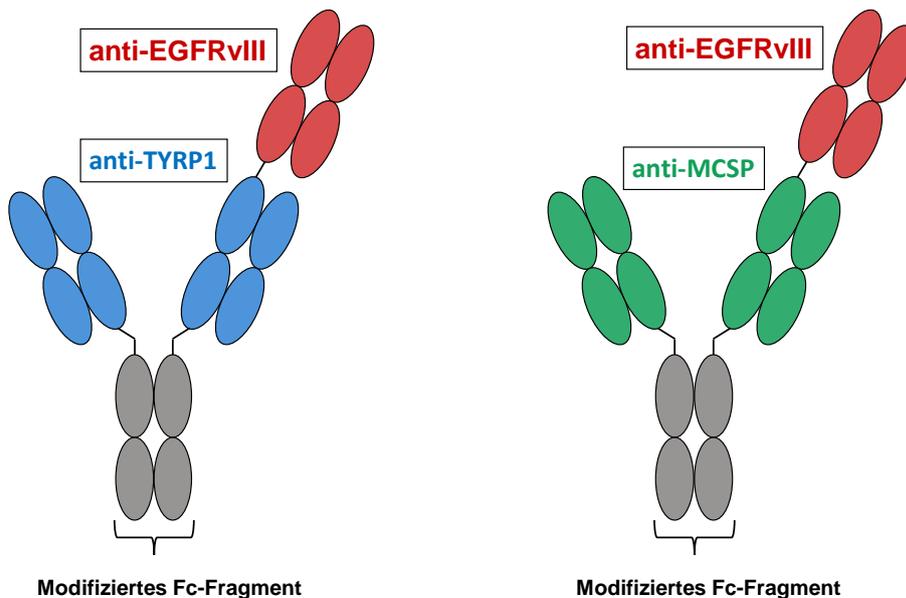
wird (Takechi, Hara et al. 1996). Es spielt eine wichtige Rolle in der Melaninbiosynthese und in der Verhinderung des dabei möglichen Zelluntergangs der Melanozyten (Jimbow, Gomez et al. 1997). Zudem hat TYRP1 eine entscheidende Funktion in der Regulation von Signalwegen, die die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Melanozyten steuern (Cheli, Ohanna et al. 2010). Es zeigte sich, dass eine stärkere Expression von TYRP1-mRNA und -protein mit einem schlechteren Therapieergebnis bei Melanompatienten verbunden ist (Journe, Id Boufker et al. 2011). Die Expression von TYRP1 blieb dabei im Verlauf der Erkrankung auch in späteren Metastasierungsstadien konstant, wodurch es ein geeignetes Ziel für Immuntherapien darstellt (El Hajj, Journe et al. 2013). Eine erste Phase-I-Studie mit einem anti-TYRP1 monoklonalen Antikörper für Patienten mit rezidivierendem Melanom zeigte bereits eine *disease-control*-Rate von 41 %. Dabei kam es trotz der Expression von TYRP1 auf Melanozyten nicht zu limitierenden Toxizitäten (Khalil, Postow et al. 2016).

### 1.5.2 MCSP

*Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan* (MCSP), auch *chondroitin sulfate proteoglycan-4* genannt (CSPG4), ist ein Transmembranprotein welches von humanen Nävi, Melanomzellen und verschiedenen anderen Tumorentitäten exprimiert wird (Wilson, Ruberto et al. 1983). Auf normalen Melanozyten und anderen gesunden Körpergeweben wird es hingegen kaum oder lediglich in einem vielfach geringeren Ausmaß exprimiert (Campoli, Ferrone et al. 2010, Krug, Birkholz et al. 2015). So findet sich MCSP auf verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen, was auf eine bedeutsame Rolle in der Zelldifferenzierung und Gewebeentwicklung hinweist (Legg, Jensen et al. 2003, Ghali, Wong et al. 2004). MCSP hat durch die Förderung der Zellmigration und der epithelial-mesenchymalen Transition einen entscheidenden Einfluss auf die maligne Progression, das Tumorüberleben und das Tumorwachstum (Yang, Price et al. 2004, Yang, Price et al. 2009). Durch seine Bedeutung in der Tumorgenese und der Nachweisbarkeit auf über 85 % aller malignen Melanome ist es somit ein vielversprechendes Tumorantigen für eine zielgerichtete Tumorthherapie (Campoli, Chang et al. 2004).

### 1.6 Aufbau der bispezifischen Antikörper

Um die Funktionalität des entwickelten Therapiekonzepts im murinen und humanen Modell zu zeigen, wurden zwei BiAk mit jeweils unterschiedlicher Antigenbindungsstelle eingesetzt. Beide BiAk sind humanisierte monoklonale Antikörper im IgG-Format, die in einer Kollaboration mit der Firma Roche entwickelt und von dieser zur Verfügung gestellt worden sind. Beide Antikörper haben ein 2:1 Format und besitzen ein *fragment antigen binding* (Fab), welches humanes EGFRvIII bindet, sowie zwei Fab gegen das tumorspezifische Zielantigen. Im murinen Modell wurden murine T-Zellen und der BiAk anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 verwendet. Diese anti-TYRP1-Domäne ist kreuzreaktiv gegen die murine und humane Antigenvariante. Im humanen Modell wurden humane T-Zellen mit dem BiAk anti-EGFRvIII x anti-MCSP verwendet, der sich gegen humanes MCSP richtet. Beide Antikörper besitzen ein modifiziertes *fragment crystallizable* (Fc), das die Bindung an Fc- $\gamma$ -Rezeptoren erschwert. Diese Modifizierung verhindert damit die Aktivierung von Immunzellen über *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Nimmerjahn, Gordan et al. 2015). Dies gewährleistet, dass eine eventuell nicht kontrollierbare unspezifische Aktivierung des Immunsystems ausgeschlossen werden kann. Die Bedeutung der Fc-Fragmente liegt darin, dass sie die Halbwertszeit des Antikörpers im Blutkreislauf durch Bindung an neonatale Fc-Rezeptoren (FcRn) signifikant erhöhen (Rath, Kuo et al. 2013). Bei Antikörpern im IgG-Format ist somit keine kontinuierliche Infusion notwendig.



**Abbildung 3: Darstellung der eingesetzten bispezifischen Antikörper**

Beide Antikörper basieren auf einem IgG-Format und haben eine 2+1-Struktur. Sie sind bivalent für das tumorspezifische Antigen (TYRP1 bzw. MCSP) und monovalent für die extrazelluläre Domäne des Fusionsrezeptors (EGFRvIII). Die Fc-Fragmente wurden zum Ausschluss von ADCC modifiziert.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Anti-Tumor-Effektivität Rezeptor-transduzierter T-Zellen mit der Flexibilität und Kontrollierbarkeit bispezifischer Antikörper zu kombinieren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass SAR-T-Zellen in Kombination mit BiAk funktionsfähig sind und zu einer spezifischen Anti-Tumor-Aktivität gegen Antigen-überexprimierende Pankreaskarzinomzelllinien führen. Darauf aufbauend soll nun die Effektivität von SAR-T-Zellen gegen Melanomzelllinien untersucht werden. Neben einem Antigen-überexprimierenden Modell soll dabei insbesondere auch die Aktivität gegen endogen Antigen-exprimierende Melanomzelllinien untersucht werden. Hierzu wurden die folgenden Ziele formuliert:

1. Generierung der TYRP1-überexprimierenden Tumorzelllinie YUMM1.1TYRP
2. Untersuchung der Funktionalität von **anti-EGFRvIII x anti-TYRP1** am Beispiel von YUMM1.1TYRP
  - Zytokinsekretion und Zytotoxizität muriner E3-T-Zellen
  - Proliferation muriner E3-T-Zellen
  - Einfluss auf den Phänotyp der E3-T-Zellen
3. Untersuchung der Funktionalität von **anti-EGFRvIII x anti-TYRP1** am Beispiel der endogen TYRP1-exprimierenden Tumorzelllinie B16F10
  - Zytokinsekretion und Zytotoxizität muriner E3-T-Zellen
  - Proliferation muriner E3-T-Zellen
  - Einfluss auf den Phänotyp der E3-T-Zellen
4. Untersuchung der Funktionalität von **anti-EGFRvIII x anti-MCSP** am Beispiel der endogen MCSP-exprimierenden Tumorzelllinien A375 und MV3
  - Zytokinsekretion und Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1

	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Alpha Imager HP</b>	Alpha Innotech	Kasendorf, Deutschland
<b>Analysenwaage ENTRIS224-1S</b>	Sartorius	Göttingen, Deutschland
<b>Sicherheitswerkbank HeraSAFE KS</b>	Heraeus, ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Zentrifuge 5418r</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Zentrifuge Rotina 420R</b>	Hettich GmbH	Tuttlingen, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub> - Inkubator (BD6220)</b>	Heraeus, ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>FACSCanto II</b>	BD Biosciences	New Jersey, USA
<b>Kühlschränke 4 °C und -20 °C</b>	Bosch	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	MTG GmbH	Bruckberg, Deutschland
<b>HERAfreeze™ HFU T Series</b>	Heraeus, ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Laborabzug 2-453-JAND</b>	Köttermann Systemlabor	Hänigsen, Deutschland
<b>Thermoschüttler Innova44</b>	New Brunswick Scientific, Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Mikroskop Axiovert 40C</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
<b>MiniMACS, QuadroMACS</b>	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Deutschland
<b>Mithras Ib 940</b>	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
<b>Multifuge 3L-R, X3 und 4KR</b>	Heraeus, ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Mr. Frosty™ Gefrierbehälter</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Nanodrop 2000c</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Pipetus</b>	Hirschmann	Eberstadt, Deutschland
<b>PowerPac™ Universal Netzgerät</b>	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
<b>Research plus Pipetten</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Shaker DOS-10L</b>	NeoLAB	Heidelberg, Deutschland
<b>Sprout Minizentrifuge</b>	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>T3 Thermocycler</b>	Biometra	Göttingen, Deutschland
<b>Vortexer RS VA 10</b>	Phoenix	Garbsen, Deutschland
<b>Thermomixer comfort</b>	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>GeneTouch Thermal Cycler</b>	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Welch Vakuumpumpe</b>	Promega	Wisconsin, USA

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2

	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Albumin Fraktion V (BSA)</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>BD Pharm Lyse Lysing Buffer</b>	BD Biosciences	New Jersey, USA
<b>Biocoll separating solution</b>	Biochrom	Berlin, Deutschland
<b>Calcium chloride</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
<b>Count Bright, counting beads</b>	LifeTechnologies	California, USA
<b>CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay</b>	Promega	Wisconsin, USA
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>Dynabeads Mouse T-Activator anti-CD3-anti-CD28</b>	Invitrogen	Massachusetts, USA
<b>EcoRI</b>	NEB	Massachusetts, USA
<b>Ethanol 100 %</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
<b>Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>FACSFlow, FACSSafe</b>	BD Biosciences	New Jersey, USA
<b>GeneJET Gel Extraction Kit</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>Heparin-sodium 2.500 IE / 5 ml</b>	Braun AG	Melsungen, Deutschland
<b>HEPES</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Isofluran</b>	CP PHARMA	Burgdorf, Deutschland
<b>LB Agar</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
<b>LB Medium</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
<b>LE Agarose</b>	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>NotI</b>	NEB	Massachusetts, USA
<b>Polybrene</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Q5 High-Fidelity DNA Polymerase</b>	NEB	Massachusetts, USA
<b>Q5 High GC Enhancer</b>	NEB	Massachusetts, USA
<b>RetroNectin</b>	TaKaRa	Kyoto, Japan
<b>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	ThermoFischerScientific	Massachusetts, USA
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen	Hilden, Deutschland
<b>SERVA DNA Stain Clear G</b>	SERVA	Heidelberg, Deutschland
<b>Natriumchlorid</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Schwefelsäure</b>	Apotheke Innenstadt	LMU München, Deutschland
<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

<b>Tween 20</b>	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
<b>ZombieDye Aqua</b>	BioLegend	Kalifornien, USA

### 2.1.3 Puffer

**Tabelle 3**

<b>Transfektionspuffer</b>	100 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 6,76 1,6 g NaCl 74 mg KCl 50 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g HEPES	<b>Blockpuffer</b>	2 % Albumin Fraktion V in ddH <sub>2</sub> O
<b>Calciumchloridpuffer</b>	100 ml ddH <sub>2</sub> O 2,7 g Calciumchlorid (2,5 M)	<b>Waschpuffer</b>	2 ml PBS 25 mM Hepes
<b>MACS-Puffer</b>	1000 ml PBS 5 ml FBS 2 mM EDTA	<b>FACS-Puffer</b>	1000 ml PBS 10 ml FBS

### 2.1.4 Zellkultur

#### 2.1.4.1 Reagenzien

**Tabelle 4**

	<b>Hersteller</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Blasticidin</b>	InvivoGen	Kalifornien, USA
<b>Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>HEPES-Buffer 1 M</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Fetal bovine serum (FBS)</b>	Gibco Products	New York, USA
<b>L-Glutamin 200 mM</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>MEM Non-essential amino acids (NEAA, 100 x)</b>	Gibco Products	New York, USA
<b>Natrium-Pyruvat</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>Phosphate-buffered Saline (PBS)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>Penicillin/ Streptomycin (100 x)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>Puromycin</b>	InvivoGen	Kalifornien, USA
<b>Roswell Park Memory Institute (RPMI)</b>	PAA	Pasching, Österreich
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
<b>Trypsin (10 x)</b>	PAA	Pasching, Österreich

## 2.1.4.2 Zellmedien

Tabelle 5

<b>Murines T-Zell-Medium</b>	RPMI 1640 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natrium-Pyruvat 0,1 % HEPES	<b>Humanes T-Zell-Medium</b>	RPMI 1640 VLE 2,5 % humanes Serum 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1 mM Natrium-Pyruvat 1 % MEM-NEAA
<b>RPMI Vollmedium</b>	RPMI 1640 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	<b>DMEM Vollmedium</b>	DMEM 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
<b>Selektionsmedium</b>	DMEM Vollmedium Puromycin Blasticidin	<b>Zytoxizitätsmedium</b>	RPMI Vollmedium ohne Phenolrot
<b>Einfriermedium</b>	90 % FBS 10 % DMSO		

## 2.1.4.3 Zelllinien

Tabelle 6

	<b>Medium</b>	<b>Zelltyp</b>	<b>Organismus</b>
<b>Murine T-Zellen</b>	Murines T-Zell-Medium	T-Zellen	murin
<b>B16 F10</b>	DMEM Vollmedium	Melanomzelllinie	murin
<b>PancOva</b>	DMEM Vollmedium	Ovalbuminexprimierende Pankreaskarzinomzelllinie	murin
<b>YUMM1.1</b>	DMEM Vollmedium mit 1 % MEM-NEAA	Melanomzelllinie	murin
<b>Humane T-Zellen</b>	Humanes T-Zell-Medium	T-Zellen	human
<b>A375</b>	DMEM Vollmedium	Melanomzelllinie	human
<b>MV3</b>	RPMI Vollmedium	Melanomzelllinie	human
<b>Panc1</b>	DMEM Vollmedium	Pankreaskarzinomzelllinie	human
<b>Platinum-E</b>	Selektionsmedium	Retrovirale Verpackungszelllinie	human
<b>Platinum-A</b>	Selektionsmedium	Retrovirale Verpackungszelllinie	human

## 2.1.4.4 Antikörper

Tabelle 7

	Konzentration	Klon	Hersteller	Herkunft
<b>Anti-mouse CD3ε</b>	0,5 mg/ml	145-2C11	BD Pharmingen	New Jersey, USA
<b>Anti-mouse CD28</b>	0,5 mg/ml	37.51	BD Pharmingen	New Jersey, USA
<b>Anti-mouse-CD69</b>	0,2 mg/ml	H1.2F3	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse CD279 (PD-1)</b>	0,2 mg/ml	29F.1A12	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse-CD3</b>	0,2 mg/ml	17A2	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse-IgG</b>	0,5 mg/ml	Poly4053	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-EGFR (Cetuximab)</b>	10 mg/ml		Apotheke Großhadern, LMU	München, Deutschland
<b>Anti-CD20 (Rituximab)</b>	5 mg/ml		Roche	Basel, Schweiz
<b>Anti-human-EGFR</b>	0,5 mg/ml	AY13	Biologend	San Diego, USA
<b>Anti-mouse/human TYRP1</b>	0,2 mg/ml	TA99	Novus Biologicals	Centennial, USA

## 2.1.4.5 Zytokine

Tabelle 8

	Katalognummer	Hersteller	Herkunft
<b>Rekombinantes humanes IL-2</b>	200-02	Preprotech	Rocky Hill, USA
<b>Rekombinantes humanes IL-15</b>	200-15	Preprotech	Rocky Hill, USA

## 2.1.4.6 Primer

Tabelle 9

<b>TYRP murine Primer Top</b>	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG AAA TCT TAC AAC GTC CTC CCC-3'
<b>TYRP murine Primer Bottom</b>	5'-A TTA GAA TTC TCA GAC CAT GGA GTG GTT AGG ATT C-3'

## 2.2 Zellbiologische Methoden

## 2.2.1 Zellkultur

## 2.2.1.1 Allgemeines Vorgehen

Sämtliche Zellen wurden in halbgeschlossenen Zellkulturflaschen bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % kultiviert. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen je nach Konfluenz passagiert. Dabei wurden alle Zellen nach vorherigem Waschen mit *Phosphate buffered saline* (PBS) unter Einsatz von Trypsin abgelöst, mit Zugabe von Medium zentrifugiert und zu einem Teil wieder zurück in die Zellkulturflasche gegeben. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle auf Mykoplasmen mittels eines PCR-Nachweises.

### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden fünf Millionen Zellen in 0,9 ml *fetal bovine serum* (FBS) zusammen mit 0,1 ml DMSO in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend sofort in einem *Mr. Frosty™* Gefrierbehälter in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt und eingefroren. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen so schnell wie möglich in 20 ml des jeweiligen Mediums überführt, abzentrifugiert und in einer steril verpackten Zellkulturflasche mit frischem Medium resuspendiert.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Trypanblaufärbung der Zellen bestimmt, wobei vitale Zellen mikroskopisch erkannt und mithilfe einer Neubauer-Zellkammer gezählt wurden. Unter Anwendung der folgenden Formel konnte daraufhin die Gesamtzahl der Zellen berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Quadranten}} \times 10 \times 10^3 \times 10$$

Verdünnungsfaktor
Berechnungsfaktor der Zählkammer
Umrechnung in ml

### 2.2.2 Generierung einer TYRP1-überexprimierenden Tumorzelllinie

Zur Isolierung der RNA wurden zunächst  $10^7$  B16F10-Zellen mit Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst. Es folgte die eigentliche RNA-Isolierung mit dem *RNeasy Mini Kit*. Dabei wurden alle Schritte nach Anleitung durchgeführt und die Proben nach Möglichkeit während des gesamten Verfahrens kühl gelagert. Das Umschreiben der gewonnenen mRNA in cDNA erfolgte daraufhin mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* von *Thermo Scientific*. Die Proben wurden dabei nach Anleitung vorbereitet und für 60 Minuten bei 42 °C im *GeneTouch Thermal Cycler* inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgemisch nach folgender Tabelle vorbereitet und für die PCR nach Anleitung im *GeneTouch Thermal Cycler* inkubiert:

**Tabelle 10**

Menge	Reagenz
10 µl	Reaktionspuffer
1 µl	dNTP
2,5 µl	<i>Forward Primer</i>
2,5 µl	<i>Reverse Primer</i>
2 µl	DNA
0,5 µl	Q5 HF DNA-Polymerase
10 µl	Q5 High GC Enhancer
21,5 µl	Nuklease-freies Wasser

Für die Ligation von Vektor und Insert wurde der retrovirale Vektor pMP71 verwendet, der eine Ampicillin-Resistenz besitzt. Vektor und *Insert* wurden mit Restriktionsenzymen an den Schnittstellen *NotI* und *EcoRI* geschnitten und nach Aufreinigung mithilfe einer T4 Ligase verbunden. Diese Schritte erfolgten nach Anleitung der Hersteller. Zur daraufhin folgenden Transformation wurden Mach1-Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden nach Zugabe des Plasmids für 10 Minuten auf Eis gelagert, um die Anlagerung an die Zellmembran zu gewährleisten. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden konnte die DNA ins Innere des

Bakteriums gelangen. Nach kurzer Kühlung auf Eis wurden die Bakterien zunächst für 60 Minuten bei 37 °C in LB Medium ohne Ampicillin inkubiert. Es folgte das Auftragen auf LB Agarplatten mit Ampicillin und eine Inkubation bei 37 °C für 12-16 Stunden. Nach Anwachsen von Bakterienkolonien, wurden diese in 5 ml LB Medium mit Ampicillin für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Isolierung der Plasmide wurde das *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* nach der enthaltenen Anleitung verwendet. Die erhaltenen Proben wurden zunächst erneut mit Restriktionsenzymen an den Schnittstellen *NotI* und *EcoRI* geschnitten. Nach Herstellung eines Agarose-Gels (TE-Puffer mit 1,5 % Agarose), wurden die Proben mit *loading dye* in einem Verhältnis von 4:1 gemischt und hinzugegeben. Die Gelelektrophorese wurde für 40 Minuten bei 90 Volt durchgeführt und konnte daraufhin durch Vergleich mit der standardisierten DNA-Leiter ausgelesen werden. Die DNA der vielversprechenden Proben wurde aus dem Agarosegel isoliert. Die Sequenzierung der Proben wurde daraufhin mit dem *Eurofins Sequencing Kit* unter Zugabe von *Primern*, die das *Insert* einrahmen, durchgeführt.

Zur Transduktion von YUMM1.1-Melanomzellen wurden zunächst Platinum-E Zellen in einer 6 *well* Multiwellplatte mit einer Konzentration von ein bis zwei Millionen Zellen/*well* in DMEM Vollmedium ausgesät, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 bis 70 % erreicht wurde. 18 µg der TYRP1-DNA wurden mit 15 µl Calciumchlorid vermischt und mit destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf 150 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde daraufhin mit 150 µl Transfektionspuffer vermischt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die ausgesäten Platinum-E Zellen getropft. Nach sechstständiger Inkubationszeit wurde das Medium durch frisches DMEM Vollmedium ersetzt. Eine passende Anzahl von *wells* einer 24 *well* Multiwellplatte wurde mit jeweils 400 µl Retronectin bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Diese Platte wurde nun mit Blockpuffer befüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurde der zentrifugierte Virusüberstand der Platinum-E Zellen auf die Platte gegeben und bei 3000 x g für 90 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Aussaat von 5 x 10<sup>5</sup> YUMM1.1-Zellen/ml in DMEM3+ mit 4 µg/ml Polybrene und eine Zentrifugation bei 800 x g und 32 °C für 30 Minuten. Nach 8 Stunden wurde das Medium aufgrund der Zytotoxizität des Polybrene durch DMEM3+ ersetzt und die Zellen für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Isolierung und Transduktion muriner T-Zellen

Das Protokoll zur retroviralen Transduktion muriner T-Zellen erstreckt sich über einen Zeitraum von fünf Tagen und wird deshalb im Folgenden ebenfalls tageweise dargestellt.

**Tag 1:** Platinum-E Zellen wurden in einer 6 *well* Multiwellplatte mit einer Konzentration von ein bis zwei Millionen Zellen/*well* in DMEM Vollmedium ausgesät, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von 50-70 % erreicht wurde.

**Tag 2:** 18 µg der jeweiligen DNA wurden mit 15 µl Calciumchlorid vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 150 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde daraufhin mit 150 µl Transfektionspuffer vermischt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die ausgesäten Platinum-E Zellen getropft. Nach sechstständiger Inkubationszeit wurde das Medium durch frisches DMEM Vollmedium ersetzt.

**Tag 3:** Aus einer C57 Bl/6 Maus wurde eine Milz entnommen und nach Lyse der Erythrozyten eine Einzelzellsuspension der Splenozyten erstellt. Diese wurden daraufhin für 24 Stunden in einer Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in RPMI Vollmedium resuspendiert und unter Zugabe von 10 IU/ml IL-2, 0,05 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 µg/ml anti-CD-3-Antikörper und 0,1 µg/ml anti-CD-28-Antikörper für 24 Stunden inkubiert. Am gleichen Tag wurde eine passende Anzahl von *wells* der

24 *well* Multiwellplatte mit jeweils 400 µl Retronectin bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tag 4:** Diese Platte wurde nun mit Blockpuffer befüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurde der zentrifugierte Virusüberstand der Platinum-E Zellen auf die Platte gegeben und bei 3000 x g für 90 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Platinum-E Zellen wurden erneut mit murinem T-Zell-Medium inkubiert. Nach der Zentrifugation und Entfernung des Virusüberstandes wurden die Splenozyten auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in murinem T-Zell-Medium eingestellt und nach Zugabe von 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 IU/ml IL-2 und  $1,3 \cdot 10^5$  anti-CD3-anti-CD28 Dynabeads /ml auf die Platte gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 800 x g und 32 °C für 30 Minuten, woraufhin die Zellen bis zum nächsten Tag inkubiert wurden.

**Tag 5:** Erneut wurde der zentrifugierte Virusüberstand von den Platinum-E-Zellen auf die T-Zellen gegeben und diese daraufhin bei 800 x g und 32 °C für 90 Minuten zentrifugiert. Nach 6 Stunden konnte die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie ermittelt und die Zellen in RPMI Vollmedium unter Zugabe von 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 5 IU/ml IL-15 inkubiert werden.

#### 2.2.4 Isolierung und Transduktion humaner T-Zellen

Das Protokoll zur retroviralen Transduktion humaner T-Zellen erstreckt sich über einen Zeitraum von sechs Tagen und wird deshalb im Folgenden ebenfalls tageweise dargestellt.

**Tag 1:** Platinum-A Zellen wurden in einer 6 *well* Multiwellplatte mit einer Konzentration von ein bis zwei Millionen Zellen/*well* in DMEM Vollmedium ausgesät, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 bis 70 % erreicht wurde. Eine 6 *well* Multiwellplatte wurde mit 2 µg/ml anti-human CD3 und 2 µg/ml anti-human CD28 in 1,2 ml PBS/*well* bedeckt. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C gelagert.

**Tag 2:** 18 µg der jeweiligen DNA wurden mit 15 µl Calciumchlorid vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 150 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde daraufhin mit 150 µl Transfektionspuffer vermischt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die ausgesäten Platinum-A-Zellen getropft. Nach sechststündiger Inkubationszeit wurde das Medium durch frisches DMEM Vollmedium ersetzt. Die Spritzen wurden vor der Blutentnahme mit 5 IU Heparin-Natrium/ml Blut befüllt. Jeweils 25 ml des entnommenen Blutes wurden mit 20 ml Natriumchlorid verdünnt. Auf 15 ml Biocoll wurden in einem Falcon nun langsam 30 ml des Blut-NaCl-Gemisches hinzugegeben. Dieses Falcon wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) lagerten sich nun als weißliche Schicht zwischen Plasma und Biocoll ab. Sie wurden in ein frisches Falcon überführt und in einem Verhältnis von 1:10 mit Natriumchlorid verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 520 x g. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen gezählt. Um die CD3-positiven Zellen mittels *magnetic-activated cell sorting* (MACS) zu isolieren wurden die PBMC nun mit 80 µl kaltem MACS-Puffer und 20 µl anti-human CD3 MACS *beads* pro  $10^7$  Zellen gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C gelagert. Daraufhin wurden 2 ml kalter MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben und die Mischung bei 4 °C für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Zellpellet mit 500 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert, bevor es in die LS-Säule des MACS-Kits gegeben wurde. Die Säule wurde drei Mal mit jeweils 3 ml kaltem MACS-Puffer mit magnetischem Kontakt gespült. Danach konnten die CD3-positiven Zellen mit 5 ml MACS-Puffer unter Entfernung des Magneten aus der Säule gespült werden. In der

Zwischenzeit wurde die 6 *well* Multiwellplatte von Tag 1 für 30 Minuten mit 1,5 ml PBS + 10 % FBS/*well* befüllt. Daraufhin konnten die CD3-positiven Zellen nun in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml unter Zugabe von 20 ng/ml IL-2, 5 ng/ml IL-15, 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und  $3,3 \times 10^5$  humanen anti-CD3-anti-CD28 Dynabeads/ml in humanem T-Zell-Medium resuspendiert und für 48 Stunden bei 36 °C inkubiert werden.

**Tag 3:** Es wurde eine passende Anzahl von *wells* einer 24 *well* Multiwellplatte mit jeweils 400  $\mu$ l Retronectin bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tag 4:** Diese 24 *well* Multiwellplatte wurde nun mit Blockpuffer befüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Retronectin wurde in eine zweite 24 *well* Multiwellplatte überführt und bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der geblockten Platte mit Waschpuffer wurde der zentrifugierte Virusüberstand der Platinum-A-Zellen auf die Platte gegeben und bei 3000 x g für 90 Minuten bei 32 °C zentrifugiert. Die Platinum-A-Zellen wurden erneut mit humanem T-Zell-Medium inkubiert. Nach der Zentrifugation und Entfernung des Virusüberstandes wurden die aktivierten T-Zellen von Tag 2 auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in humanem T-Zell-Medium eingestellt und nach Zugabe von 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 ng/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-15 auf die Platte gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 800 x g und 32 °C für 30 Minuten, woraufhin die Zellen bis zum nächsten Tag bei 37 °C inkubiert wurden.

**Tag 5:** Die erneut mit Retronectin befüllte 24 *well* Multiwellplatte wurde nun mit Blockpuffer befüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der geblockten Platte mit Waschpuffer wurde der zentrifugierte Virusüberstand der Platinum-A-Zellen auf die Platte gegeben und bei 3000 x g für 90 Minuten bei 32 °C zentrifugiert. Die T-Zellen vom vorherigen Tag wurden nun auf diese Platte gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

**Tag 6:** Die Transduktionseffizienz der humanen T-Zellen wurde mit einem *fluorescence-activated cell sorter* (FACS) bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen jeden zweiten Tag auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in humanem T-Zell-Medium unter Zugabe von 20 ng/ml IL-2, 5 ng/ml IL-15 und 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol eingestellt.

## 2.3 Funktionelle Assays

### 2.3.1 Stimulationsassays

Bei sämtlichen Versuchen wurden  $2 \times 10^4$  Tumorzellen pro *well* in Zellkulturplatten im 96 *well* Format ausplattiert. Je nach Experiment wurden variierende Konzentrationen von T-Zellen in murinem beziehungsweise humanem T-Zell-Medium hinzugegeben und für 48 Stunden inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, liegt das verwendete Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen bei 10:1. Es folgte die Abnahme des Überstandes und Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA.

### 2.3.2 ELISA

Für diese Arbeit wurden ELISA Kits von *BD Biosciences* entsprechend der Anleitung verwendet. Dieses System basiert auf der Sandwich-ELISA Methode und verwendet eine Meerrettichperoxidase (HRP) zur Umsetzung des Substrats und Vermittlung eines Farbumschlags. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde eine Standardkurve auf Grundlage des gegebenen Zytokinstandards erstellt. Die Fluoreszenz wurde mit dem Mithras Mikroplattenreader ausgelesen und mit *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism* analysiert.

### 2.3.3 Zytotoxizitätsassays

Nach Auftragen von  $2 \times 10^4$  Tumorzellen in 96 *well* Multiwellplatten wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen für ein Verhältnis von 10:1 in Zytotoxizitätsmedium hinzugegeben und für 14 bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei Experimenten mit einem anderen Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen, veränderte sich nur die Zahl der T-Zellen entsprechend. Zum Auslesen wurde der Überstand abgenommen und die LDH-Konzentration mittels eines Zytotoxizitätskits gemessen. Die Zytotoxizität wurde mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Experiment} - \text{Effektorzellen spontan} - \text{Zielzellen spontan}}{\text{Zielzellen Maximum} - \text{Zielzellen spontan}} \times 100$$

Die Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism 6*.

### 2.3.4 Durchflusszytometrie

Mit dem Durchflusszytometer werden Zellen einzeln durch verschiedene Laser bestrahlt, sodass aus dem entstehenden Streulicht Rückschlüsse auf die Zellgröße und -granularität gezogen werden können. Zusätzlich kann durch die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen auch die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals gemessen werden. Dies ermöglicht es, Zellen mit Fluoreszenzstoff-gekoppelten Antikörpern zu binden und dadurch auf eine Vielzahl weiterer Eigenschaften zu untersuchen. In dieser Arbeit richteten sich die Antikörper in erster Linie gegen Oberflächenproteine der Zellen, die Informationen über die Zellart, -vitalität und -aktivierung geben. Zur Färbung wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C gelagert und daraufhin mit PBS gewaschen.

### 2.3.5 Proliferationsassays

Es wurden  $2 \times 10^4$  Tumorzellen pro *well* in Zellkulturplatten im 96 *well* Format ausplattiert. Nach 6 Stunden wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen in Kombination mit der jeweiligen Konzentration des BiAk hinzugegeben. Nach Bestimmung der Ausgangszellzahl mit *counting beads* im Durchflusszytometer wurden die Zellen an jedem Zeitpunkt (24 Stunden, 48 Stunden) zunächst mit FACS-Antikörpern gefärbt, um bei der späteren Auswertung die T-Zellen bestimmen zu können. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellzahl mithilfe von *counting beads* im Durchflusszytometer bestimmt. Nun konnte durch Division der Zellzahl zum Zeitpunkt x durch die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 die relative Veränderung und somit Proliferation der T-Zellen zum Ausgangswert errechnet werden.

## 2.4 Statistische Auswertung

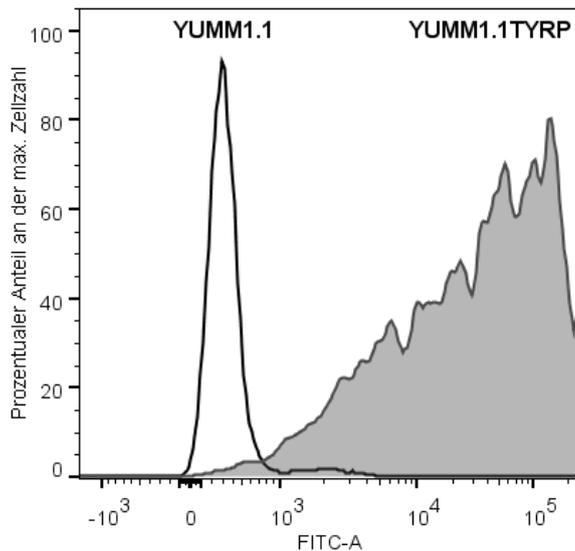
Zur statischen Auswertung wurde die Software *GraphPad Prism* verwendet. Die Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ab einem p-Wert < 0,05 wurde dabei von einer statistischen Signifikanz ausgegangen. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen dabei dem *standard error of the mean* (SEM).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Anti-EGFRvIII x anti-TYRP1-bispezifische Antikörper

##### 3.1.1 Generierung einer TYRP1-überexprimierenden Melanomzelllinie

Eine Untersuchung der murinen YUMM1.1-Melanomzelllinie mittels Durchflusszytometrie zeigte eine kaum messbare Expression des Zielantigens TYRP1. Daraufhin wurde durch retrovirale Transduktion eine TYRP1-überexprimierende YUMM1.1-Melanomzelllinie generiert, die im Folgenden als YUMM1.1TYRP bezeichnet wird. Nach erfolgreicher Transduktion zeigte sich im Durchflusszytometer eine starke Fluoreszenz der mit einem FITC-anti-mouse-TYRP1 gefärbten Melanomzellen (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Expression von TYRP1 auf untransduzierten und transduzierten YUMM1.1-Melanomzellen im Durchflusszytometer**

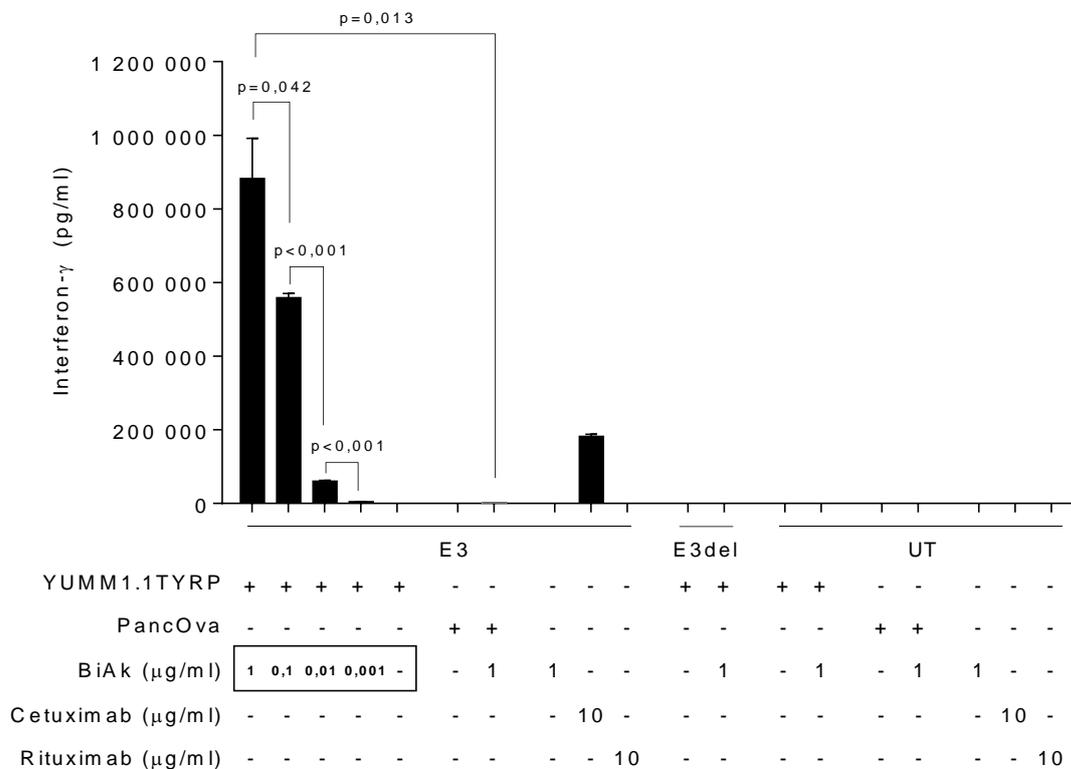
Die Tumorzellen wurden zunächst von anti-TYRP1-Antikörpern gebunden. Zur Auswertung im Durchflusszytometer wurde daraufhin ein FITC-markierter Sekundärantikörper verwendet.

#### 3.1.2 Murine E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP

##### 3.1.2.1 Spezifische Aktivierung der E3-T-Zellen durch YUMM1.1TYRP

Um die spezifische Aktivierung der E3-transduzierten T-Zellen in Kombination mit Melanomzellen und anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 zu untersuchen, wurde die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand von Kokulturen mit YUMM1.1TYRP-Melanomzellen gemessen. Als Kontrollen dienten T-Zellen, die mit einem gekürzten Fusionsrezeptor transduziert wurden (E3del), sowie untransduzierte T-Zellen (UT), denen der komplette Fusionsrezeptor fehlte. Dies stellte sicher, dass jegliche beobachtete T-Zell-Aktivierung ausschließlich durch den vollständigen E3-Fusionsrezeptor vermittelt wurde. Als Kontrolle der spezifischen Bindung an die Zielzellen dienten PancOva-Pankreastumorzelllinien, die TYRP1 als Melanomzell-spezifischen Marker nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. In allen Stimulationsexperimenten wurde zudem der anti-EGFR-Antikörper Cetuximab als Positivkontrolle verwendet, welcher unmittelbar an EGFRvIII des Fusionsrezeptors bindet und die E3-T-Zellen aktiviert. Um eine unspezifische Aktivierung auszuschließen, wurde der anti-CD20-Antikörper Rituximab als Isotypenkontrolle verwendet. E3-T-Zellen in Kokultur mit TYRP1-überexprimierenden YUMM1.1TYRP-Melanomzellen und anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 zeigten eine spezifische IFN- $\gamma$ -Ausschüttung (Abbildung 5). Die Aktivierung war dabei abhängig von der verwendeten Konzentration des BiAk. E3del-transduzierte T-Zellen und untransduzierte T-Zellen zeigten unabhängig von der Antikörperkonzentration

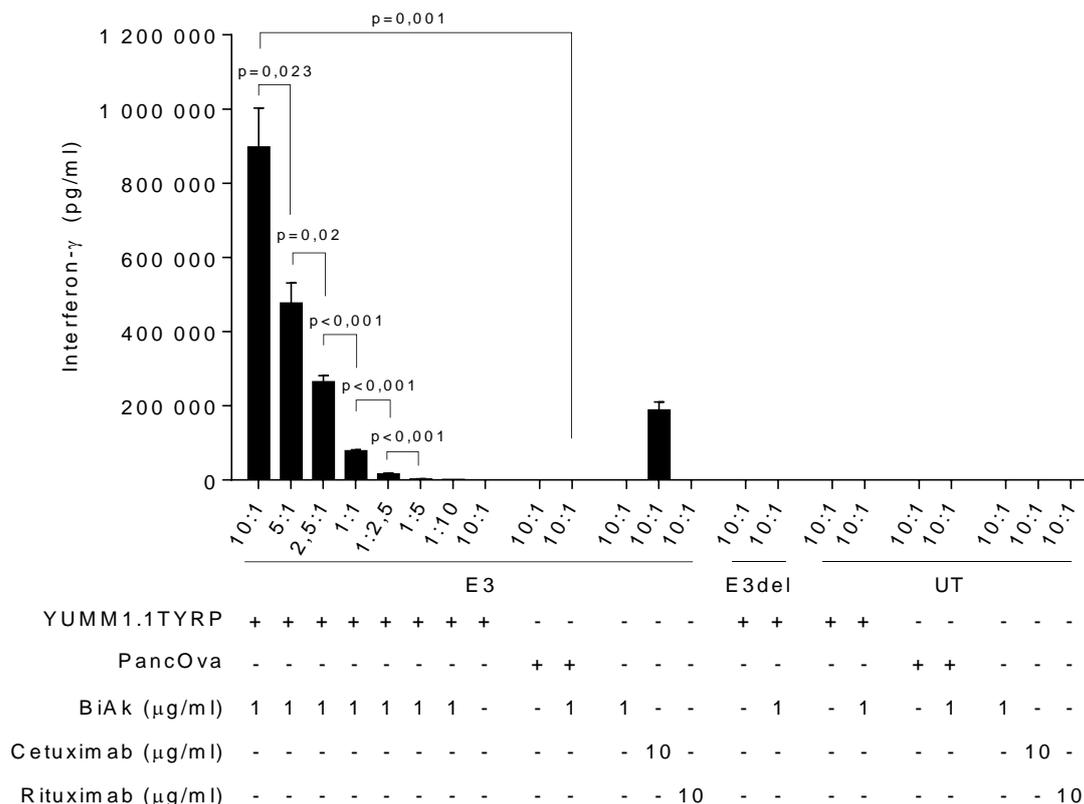
keine Aktivierung. PancOva-Zellen, die kein TYRP1-Antigen exprimieren und somit keine Bindestelle für anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 bieten, führten ebenfalls zu keiner T-Zell-Aktivierung. Als Schlussfolgerung dieser Ergebnisse wurde in allen folgenden Kokultorexperimenten mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1, wenn nicht anders beschrieben, eine Antikörperkonzentration von 1 µg/ml verwendet.



**Abbildung 5: Konzentrationsabhängige Aktivierung muriner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP**

Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand mittels ELISA nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Bei gleicher Konzentration des BiAk führte eine niedrigere Zahl transduzierter E3-T-Zellen im Verhältnis zu YUMM1.1TYRP zu einer geringeren Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und somit zu einer schwächeren T-Zell-Aktivierung (Abbildung 6). In allen Kokultorexperimenten wurde in Folge, wenn nicht anders beschrieben, ein Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10:1 verwendet.

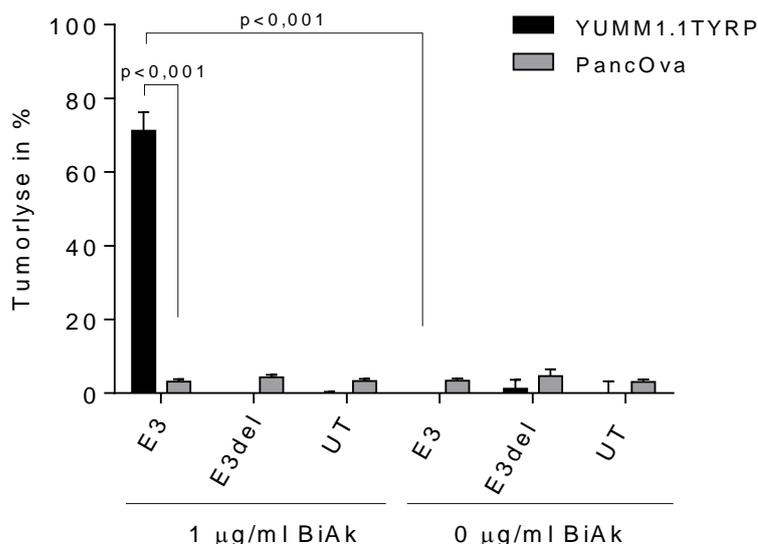


**Abbildung 6: Aktivierung muriner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl**

Messung der IFN-γ-Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt das eingesetzte Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.1.2.2 Spezifische Zytotoxizität gegen YUMM1.1TYRP

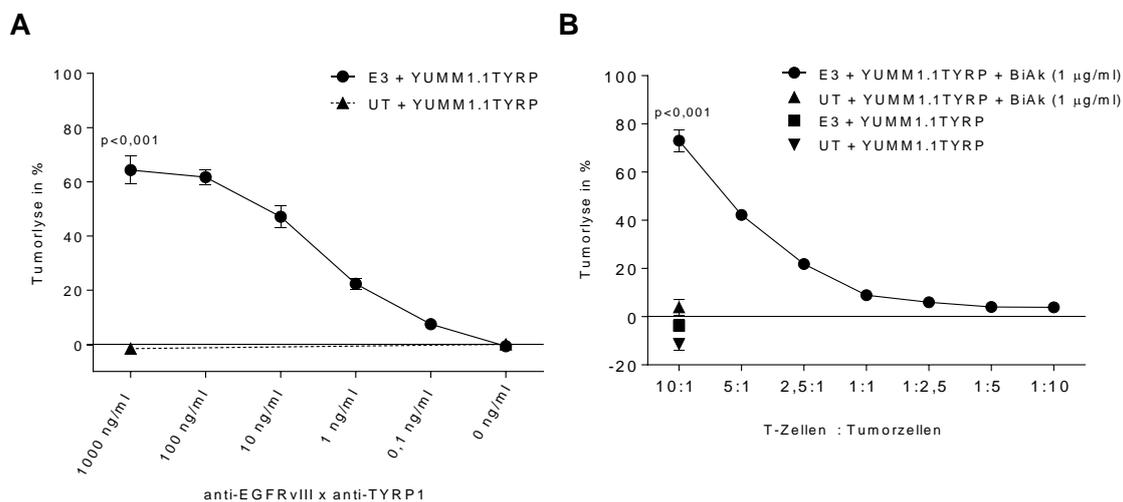
Nachdem gezeigt werden konnte, dass anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 die E3-transduzierten T-Zellen spezifisch aktivieren kann, wurde die Zytotoxizität der T-Zellen bestimmt. In Kokulturen mit E3-T-Zellen und YUMM1.1TYRP beziehungsweise PancOva zeigte sich nach 16 Stunden eine spezifische Lyse von ungefähr 70 % der Melanomzellen. Diese Lyse erfolgte ausschließlich nach Zugabe von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 (Abbildung 7). Anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 vermittelte keine nennenswerte Lyse der TYRP1-negativen PancOva-Zellen. Nur die T-Zellen, denen ein vollständiger E3-Fusionsrezeptor transduziert worden war, zeigten eine signifikante zytotoxische Aktivität.



**Abbildung 7: Zytotoxizität der E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. Dargestellt ist die spezifische Tumorlyse von YUMM1.1TYRP-Melanomzellen im Vergleich zu TYRP1-negativen PancOva-Kontrollzellen. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Zytotoxizität der E3-T-Zellen korrelierte dabei deutlich mit der Konzentration des BiAk (Abbildung 8 A). Zudem zeigte die Zytotoxizität ebenso wie die T-Zell-Aktivierung eine Abhängigkeit von der Anzahl der E3-T-Zellen (Abbildung 8 B). Eine steigende Anzahl an T-Zellen führte zu einer stärkeren Zytotoxizität. Eine Sättigung der Zytotoxizität durch eine steigende Anzahl an T-Zellen war nicht erkennbar.

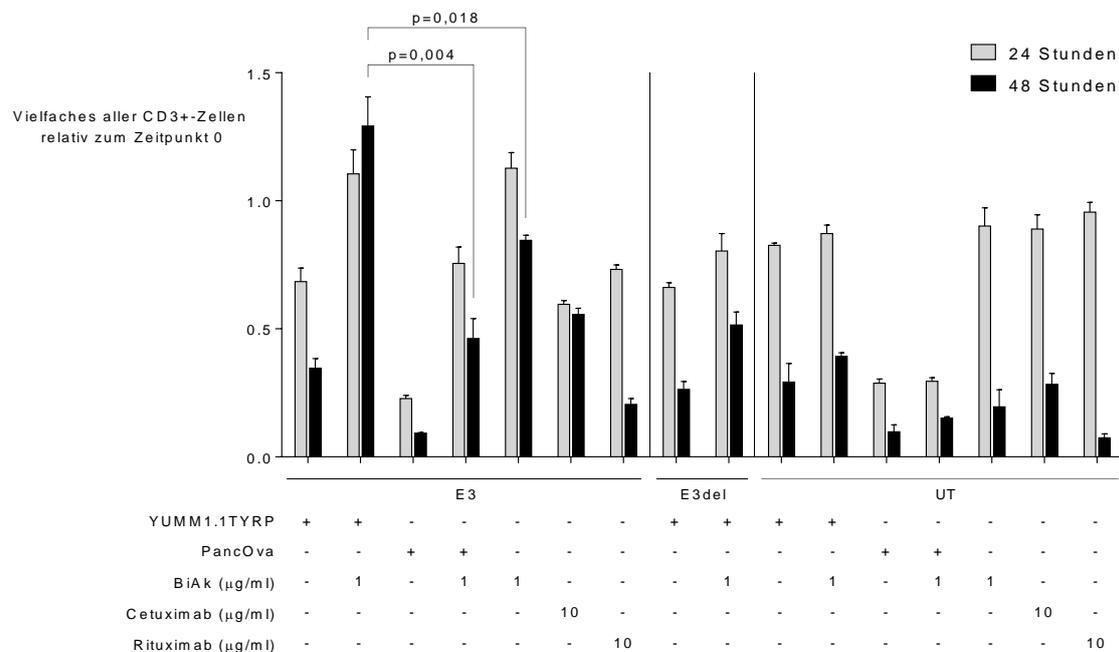


**Abbildung 8: Abhängigkeit der Zytotoxizität von der eingesetzten Konzentration von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und der Zellzahl**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. **A** Abhängigkeit der Tumorlyse von der Antikörperkonzentration. **B** Abhängigkeit der Tumorlyse vom Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen. Die Abszisse zeigt die eingesetzte Konzentration des BiAk (A), beziehungsweise das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen (B). Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.1.2.3 Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP auf die T-Zellproliferation

Um die Wirkung von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 auf die T-Zellen genauer zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt die Proliferation der T-Zellen gemessen. Mittels Durchflusszytometrie und *counting beads* wurde in den Kokulturen die Anzahl aller CD3<sup>+</sup>-Zellen nach 0, 24 und 48 Stunden bestimmt. Daraufhin konnte der Faktor berechnet werden, mit dem sich die Anzahl der T-Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 veränderte (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Proliferation muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP**

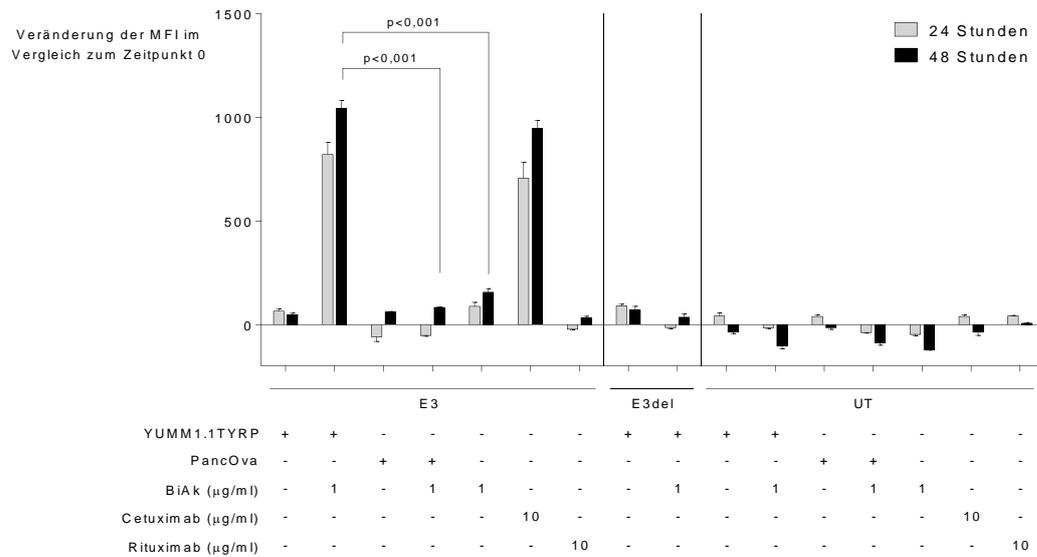
Nach 0, 24 und 48 Stunden wurde im Durchflusszytometer die Anzahl der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit *counting beads* ermittelt und der jeweilige Proliferationsfaktor berechnet. Gezeigt ist somit das Vielfache der T-Zellen im Verhältnis zum Ausgangszeitpunkt 0. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Eine Proliferation der T-Zellen konnte nur beobachtet werden, wenn E3-T-Zellen zusammen mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP kokultiert wurden. Diese Proliferation zeigte sich bereits nach 24 Stunden und führte nach 48 Stunden zu einer Erhöhung der T-Zellzahl um das ungefähr 1,3-fache im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Jede andere Kombination führte nach spätestens 48 Stunden zu einer Abnahme der T-Zellzahl. Somit führte anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 zu einer Proliferation und längerem Überleben der T-Zellen *in vitro*.

### 3.1.2.4 Phänotypisierung der T-Zellen

Um die Aktivierung der T-Zellen auch im Durchflusszytometer nachzuweisen, wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CD69 gemessen (Abbildung 10). CD69 ist ein Marker für eine frühe Aktivierung der T-Zellen. Die Expression wurde wie zuvor nach 0, 24 und 48 Stunden gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 die Expression von CD69 und somit eine Aktivierung der T-Zellen vermittelt. Diese beschränkte sich spezifisch auf Kokulturen von E3-transduzierten T-Zellen mit YUMM1.1TYRP-Melanomzellen. Es zeigte sich eine starke Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität in den ersten 24 Stunden und eine weitere Zunahme bis zum

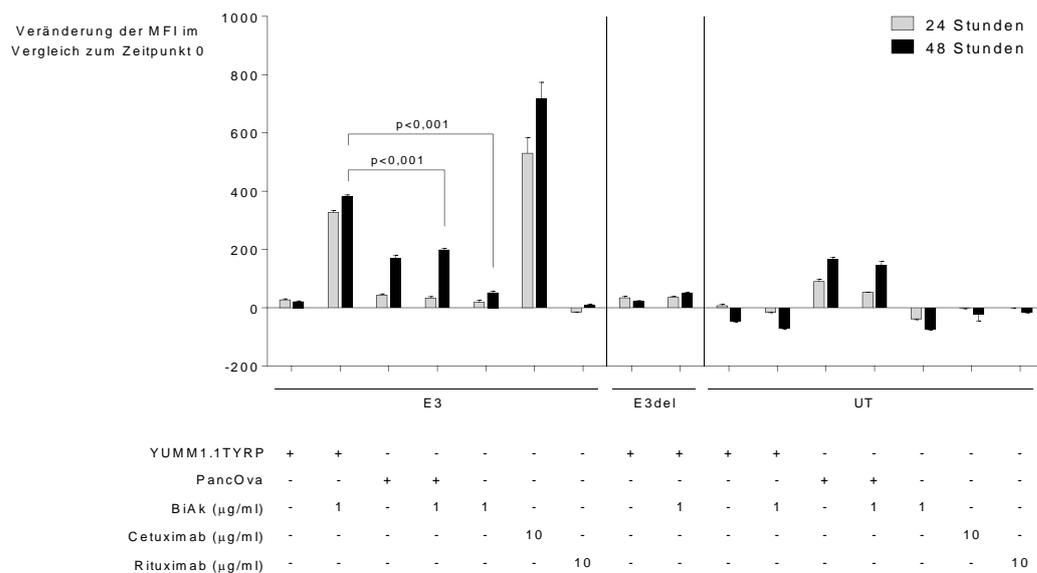
dritten Messzeitpunkt nach 48 Stunden. Jede andere gewählte Kombination von T-Zellen, BiAk und Tumorzellen führt zu keiner vergleichbaren Intensitätszunahme und somit zu keiner frühen Aktivierung der T-Zellen.



**Abbildung 10: CD69-Expression muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP**

Die Expression von CD69 auf den in Kokultur befindlichen T-Zellen wurde nach 0, 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer gemessen und als MFI dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Um die T-Zellen genauer zu charakterisieren wurden sie auf die Expression von PD-1 untersucht. Es fand sich eine starke Koexpression mit CD69 auf ihrer Oberfläche (Abbildung 11). Diese wurde insbesondere durch eine Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität nach 24 Stunden deutlich. Nach 48 Stunden exprimierten auch T-Zellen, die in Kontakt zu TYRP1-negativen PancOva-Tumorzellen waren, vermehrt PD-1.

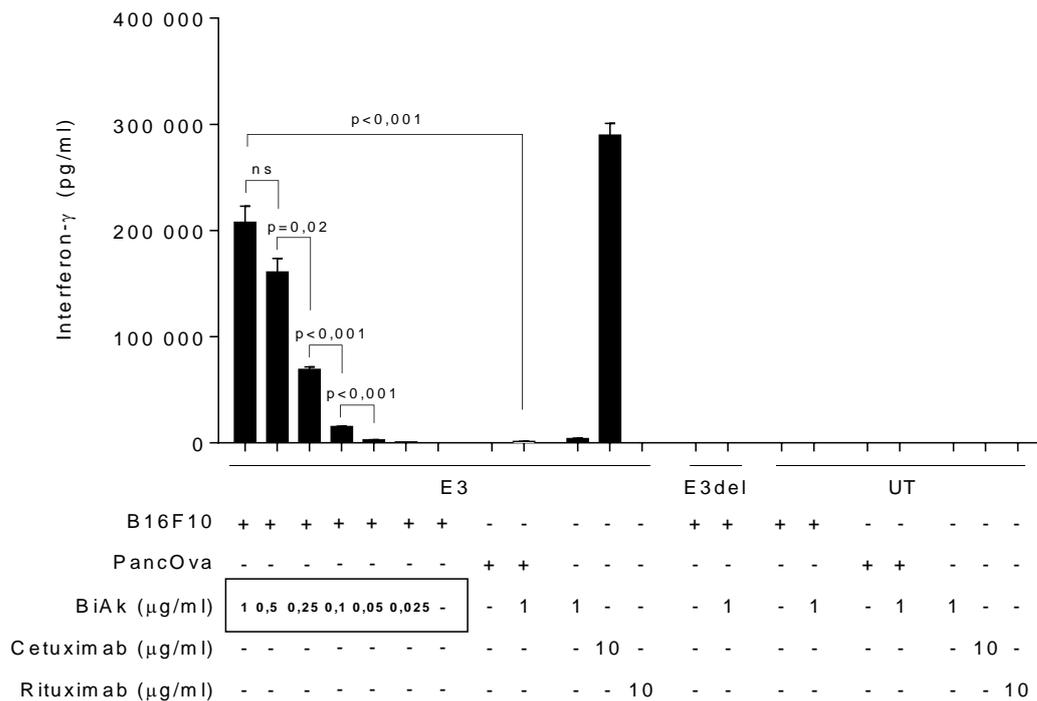


**Abbildung 11: PD-1-Expression muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und YUMM1.1TYRP**

Die Expression von PD-1 auf den in Kokultur befindlichen T-Zellen wurde nach 0, 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer gemessen und als MFI dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.1.3 Murine E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10  
 3.1.3.1 Spezifische T-Zell-Aktivierung durch B16F10

Nachdem in Versuchen mit den TYRP1-überexprimierenden YUMM1.1TYRP-Melanomzellen die Funktionalität des Konzepts gezeigt werden konnte, sollte nun ein weniger artifizielles Modell untersucht werden. Hierfür wurde die B16F10-Melanomzelllinie ausgewählt, welche endogen TYRP1 exprimiert. Kokulturen dieser Melanomzellen mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und E3-T-Zellen führten ebenfalls zu einer spezifischen E3-T-Zell-Aktivierung in Form einer IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Auch in diesem Modell zeigte sich eine Abhängigkeit der Aktivierung von der Konzentration des BiAk (Abbildung 12). Für alle weiteren Versuche mit B16F10-Melanomzellen wurde auf Grundlage dieses Versuchs eine Antikörperkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  gewählt.



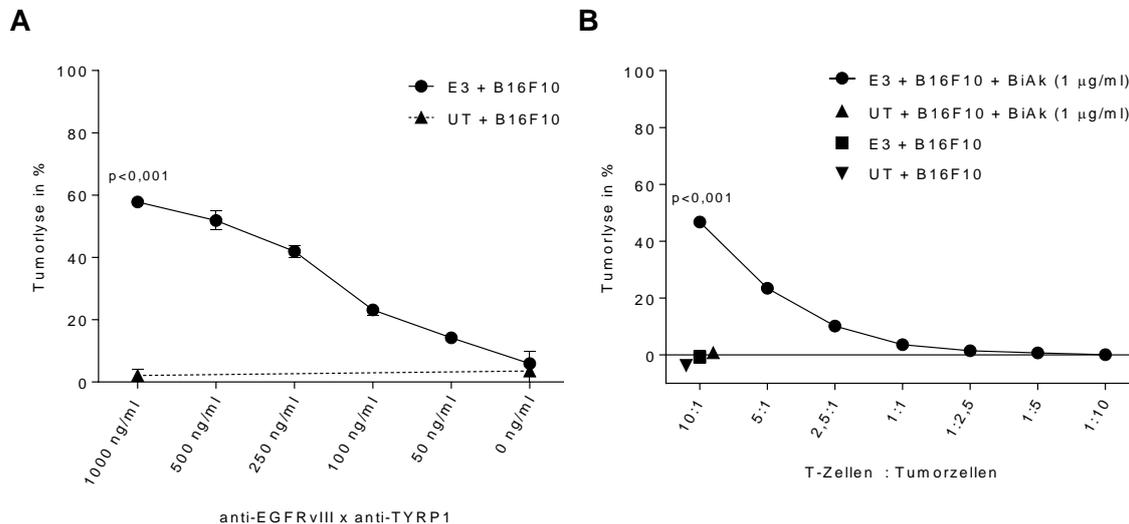
**Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Aktivierung muriner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10**

Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. ns = nicht signifikant.

Auch in Kokulturen mit B16F10-Melanomzellen zeigte sich ein Einfluss der E3-T-Zellzahl auf die IFN- $\gamma$ -Freisetzung (Abbildung 13). So wurde die stärkste T-Zell-Aktivierung bei einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 10:1 beobachtet. In den folgenden Versuchen wurde deshalb auch ein Verhältnis von T-Zellen- zu Tumorzellen von 10:1 gewählt.



Diese Zytotoxizität war wie auch in den vorangegangenen Experimenten sowohl abhängig von der Konzentration des BiAk (Abbildung 15 A) als auch vom Verhältnis von E3-T-Zellen zu B16F10-Melanomzellen (Abbildung 15 B). Eine signifikante Zytotoxizität zeigte sich dabei ab einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 2,5:1 und ab einer Konzentration des BiAk von 50 ng/ml. Eine steigende Antikörperkonzentration hatte nach 250 ng/ml keine signifikante weitere Zunahme der Zytotoxizität zur Folge. Eine Sättigung der Zytotoxizität durch eine steigende Anzahl an T-Zellen war nicht erkennbar.

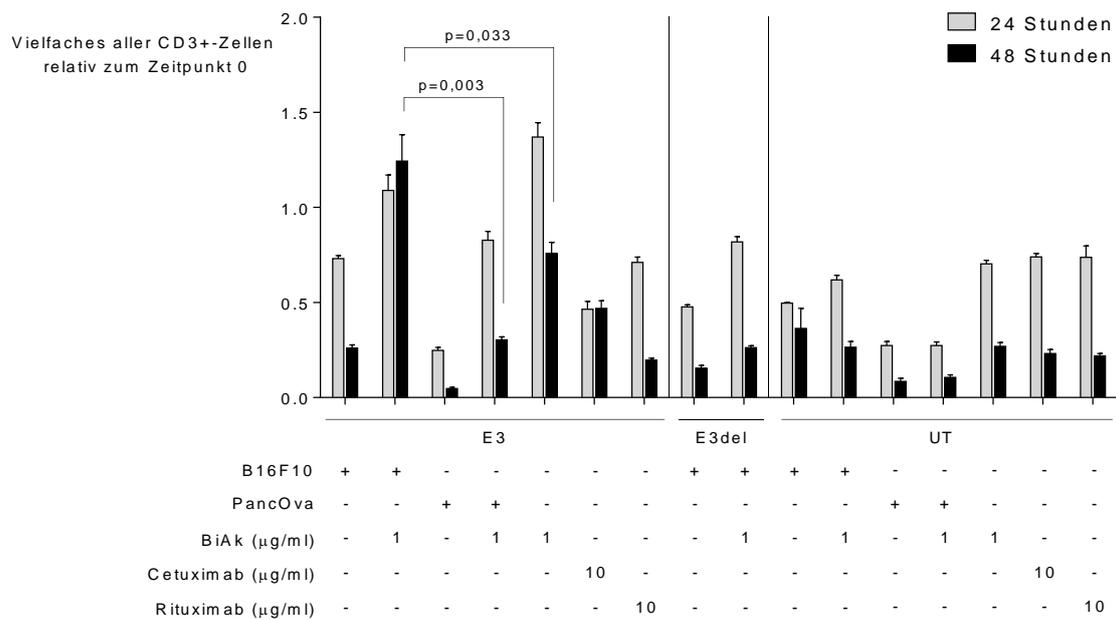


**Abbildung 15: Abhängigkeit der Zytotoxizität von der eingesetzten Konzentration von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und der Zellzahl**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. **A** Abhängigkeit der Tumorlyse von der Antikörperkonzentration. **B** Abhängigkeit der Tumorlyse vom Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen. Die Abszisse zeigt die eingesetzte Konzentration des BiAk (A), beziehungsweise das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen (B). Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.1.3.3 Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10 auf die T-Zellproliferation

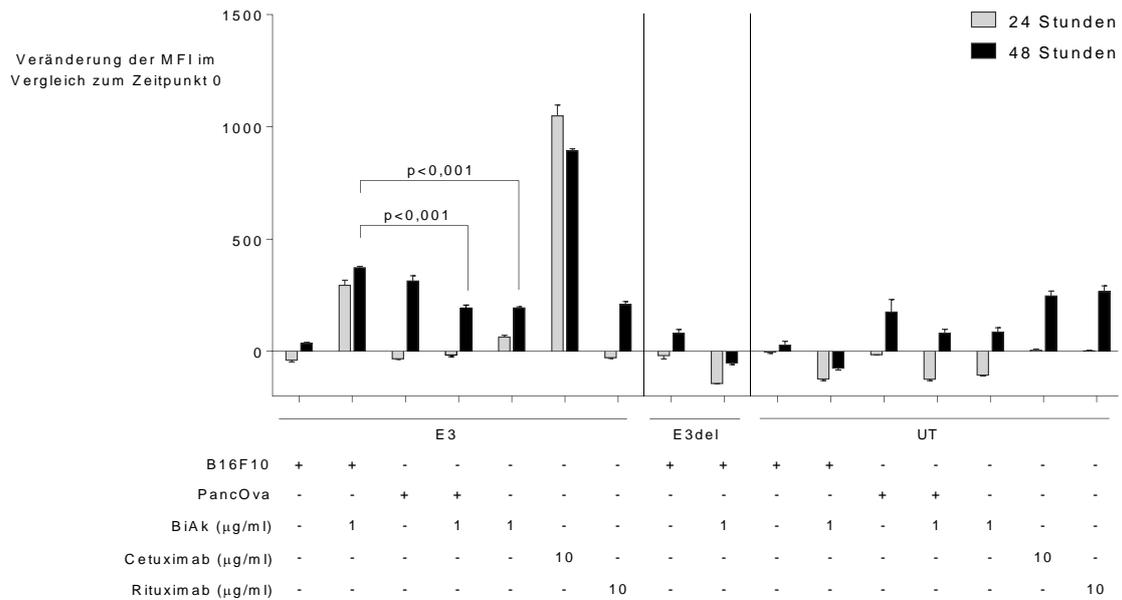
Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 auf die Proliferation von E3-T-Zellen in Kokultur mit B16F10 untersucht. Die Anzahl der T-Zellen wurde nach 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer bestimmt und zur Anzahl der zum Zeitpunkt 0 vorhandenen T-Zellen ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 16). Es konnte gezeigt werden, dass der BiAk durch B16F10 zu einer Proliferation der E3-T-Zellen führte. Die T-Zellzahl erreichte nach 48 Stunden das 1,3-fache des Ausgangswertes. Während B16F10-Zellen eine kontinuierliche T-Zellproliferation vermittelte, zeigten alle anderen Konditionen spätestens nach 48 Stunden einen Abfall der CD3<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zum Ausgangswert.



**Abbildung 16: Proliferation muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10**  
 Nach 0, 24 und 48 Stunden wurde im Durchflusszytometer die Anzahl der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen mit *counting beads* ermittelt und der jeweilige Proliferationsfaktor berechnet. Gezeigt ist somit das Vielfache der T-Zellen im Verhältnis zum Ausgangszeitpunkt 0. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.1.3.4 Phänotypisierung der T-Zellen

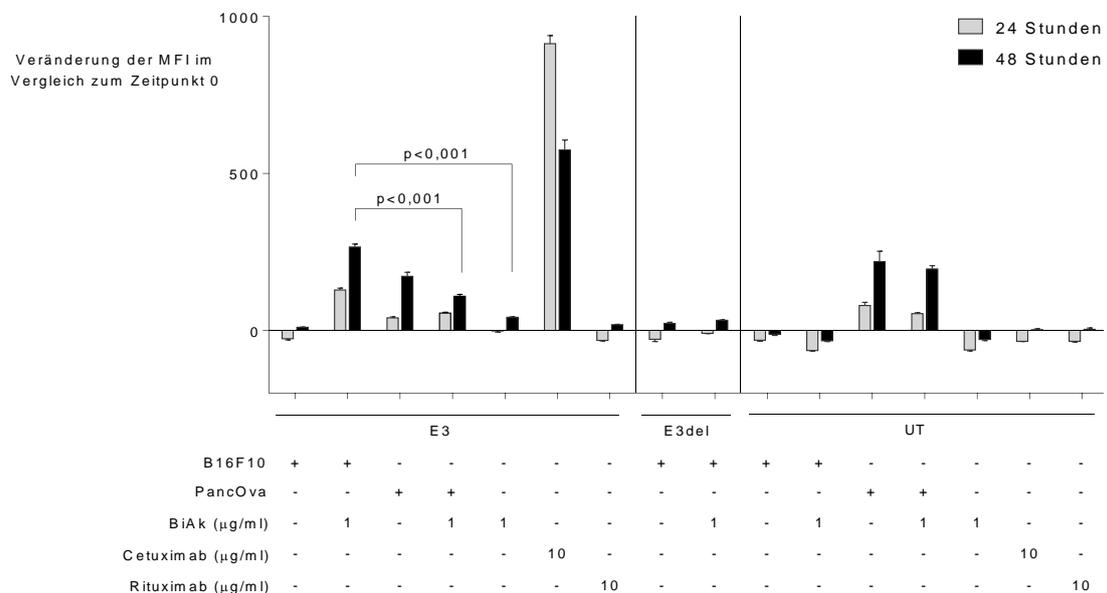
Im Durchflusszytometer konnte die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3<sup>+</sup>-Zellen nach Kontakt mit B16F10 nachgewiesen werden (Abbildung 17). Die Abhängigkeit der CD69-Expression von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 war eindeutig erkennbar. Im Vergleich zu Kokulturen mit YUMM1.1TYRP war insgesamt eine deutlich geringere mittlere Fluoreszenzintensität und somit CD69-Expression festzustellen. Als Marker einer frühen Aktivierung war nach 24 Stunden der deutlichste Intensitätsanstieg im Vergleich zu den Kontrollen erreicht.



**Abbildung 17: CD69-Expression muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10**

Die Expression von CD69 auf den in Kokultur befindlichen T-Zellen wurde nach 0, 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer gemessen und als MFI dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

CD3<sup>+</sup>-Zellen aus Kokulturen mit E3-T-Zellen, anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und TYRP1-positiven B16F10-Tumorzellen zeigten eine signifikant gesteigerte PD-1-Expression im Vergleich zu CD3<sup>+</sup>-Zellen aus Kokulturen mit PancOva-Kontrollzellen oder ohne Tumorzellen (Abbildung 18).



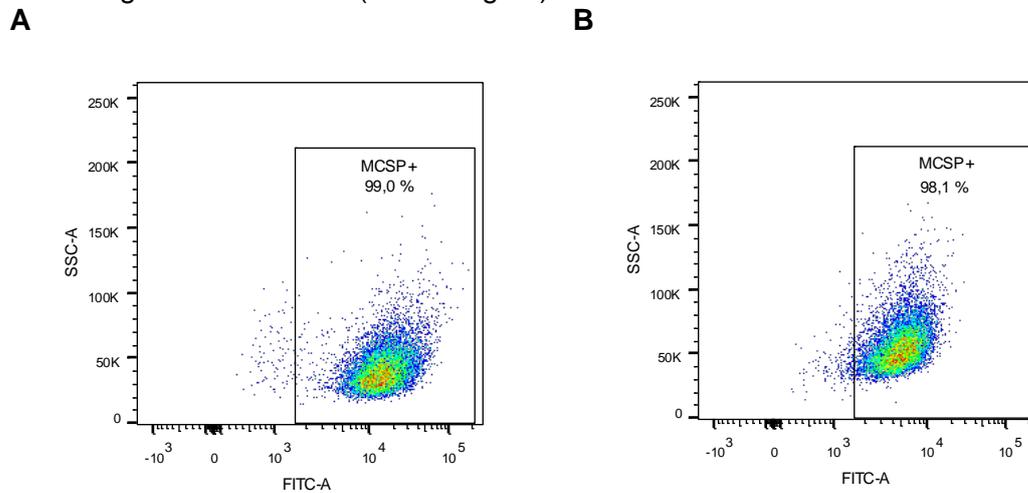
**Abbildung 18: PD-1-Expression muriner T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und B16F10**

Die Expression von PD-1 auf den in Kokultur befindlichen T-Zellen wurde nach 0, 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer gemessen und als MFI dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.2 Anti-EGFRvIII x anti-MCSP-bispezifische Antikörper

#### 3.2.1 MCSP-Expression der humanen Melanomzelllinien A375 und MV3

Im Durchflusszytometer wurde die MCSP-Expression der humanen Melanomzelllinien A375 und MV3 untersucht. Es konnte jeweils eine starke MCSP-Expression von über 98 % nachgewiesen werden (Abbildung 19).



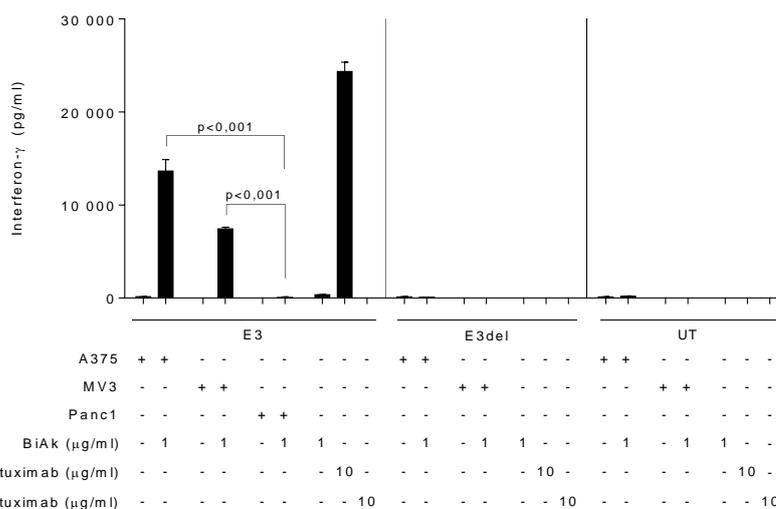
**Abbildung 19: MCSP-Expression der humanen Melanomzelllinien A375 und MV3 im Durchflusszytometer**

Die Tumorzellen wurden mit einem FITC-markierten anti-MCSP-Antikörper gebunden und im Durchflusszytometer ausgewertet. **A** Nachweis der MCSP-Expression auf A375-Melanomzellen. **B** Nachweis der MCSP-Expression auf MV3-Melanomzellen.

#### 3.2.2 Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-MCSP auf die Aktivierung humaner E3-T-Zellen

##### 3.2.2.1 MCSP-abhängige T-Zell-Aktivierung

Um den Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-MCSP auf die Aktivierung humaner E3-T-Zellen in Kombination mit MCSP-exprimierenden humanen Melanomzelllinien zu untersuchen, wurden vergleichende Kokulturrexperimente durchgeführt und IFN- $\gamma$  als Stimulationsmarker gemessen (Abbildung 20).



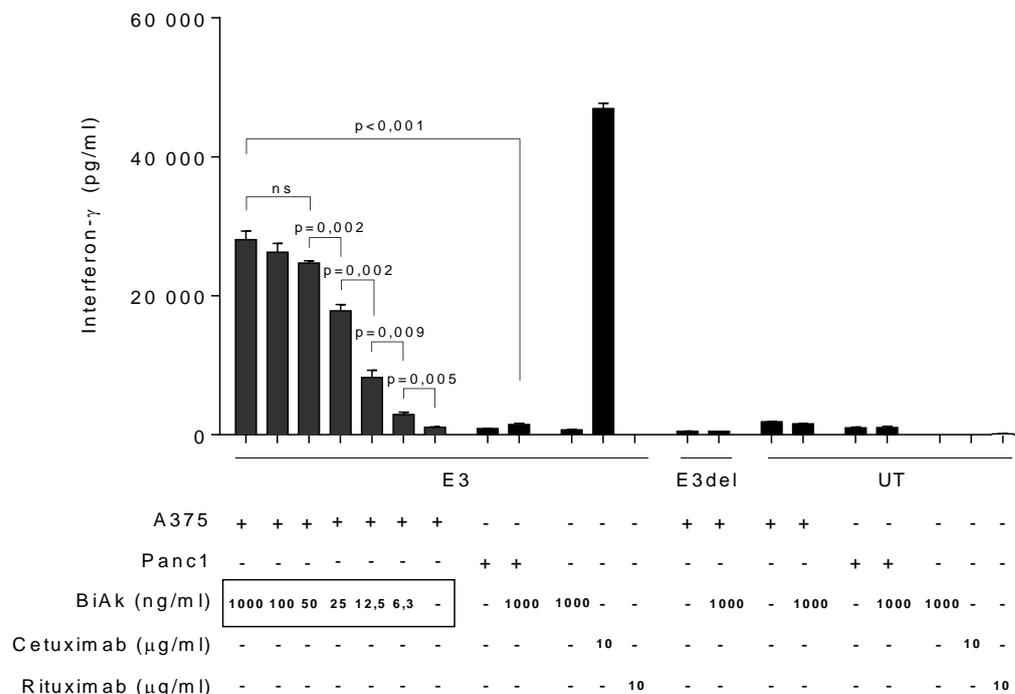
**Abbildung 20: Aktivierung humaner E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-MCSP und A375- oder MV3-Melanomzellen**

Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Wie auch im murinen Modell mit anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 konnte im humanen Modell mit anti-EGFRvIII x anti-MCSP eine spezifische Aktivierung der E3-T-Zellen gezeigt werden. Der BiAk vermittelte eine deutliche Aktivierung humaner E3-T-Zellen, die mit den MCSP-positiven Zelllinien A375 beziehungsweise MV3 über einen Zeitraum von 48 Stunden kokultiert worden waren. A375-Melanomzellen führten hierbei zur Ausschüttung von über 10.000 pg/ml IFN- $\gamma$ , während Versuche mit MV3 niedrigere Werte erreichten. MCSP-negative Panc1-Kontrollzellen führten unabhängig von anti-EGFRvIII x anti-MCSP zu keiner Stimulation der E3-T-Zellen.

### 3.2.2.2 Spezifische T-Zell-Aktivierung durch A375-Melanomzellen

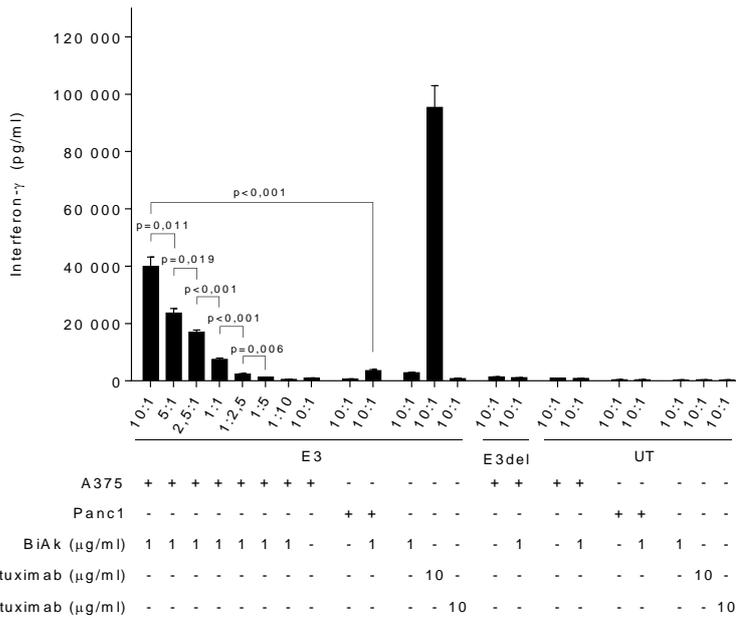
Es konnte gezeigt werden, dass anti-EGFRvIII x anti-MCSP in Kombination mit A375-Melanomzellen eine Aktivierung humaner E3-T-Zellen vermittelt. Diese Aktivierung ist abhängig von der eingesetzten Konzentration des BiAk (Abbildung 21). Eine Erhöhung der Konzentration von anti-EGFRvIII x anti-MCSP führte bis zu 50 ng/ml zu einer signifikant stärkeren Ausschüttung von IFN- $\gamma$ . Eine darüberhinausgehende Erhöhung der Konzentration des BiAk führte lediglich zu einer nicht signifikanten Steigerung der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung. Um eine ausreichende Konzentration zu gewährleisten, wurde für weitere Experimente dennoch eine Antikörperkonzentration von 1  $\mu$ g/ml verwendet.



**Abbildung 21: Konzentrationsabhängige Aktivierung humaner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-MCSP und A375-Melanomzellen**

Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. ns = nicht signifikant.

Die von anti-EGFRvIII x anti-MCSP vermittelte T-Zell-Aktivierung war zudem abhängig vom eingesetzten Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (Abbildung 22). Eine höhere Anzahl von E3-transduzierten humanen T-Zellen führte zu einer stärkeren Ausschüttung von IFN- $\gamma$ . Dieses Verhältnis von E3-T-Zellen zu A375-Melanomzellen wurde in dieser Versuchsreihe von 10:1 bis 1:10 titriert. Eine Sättigung der Zytotoxizität durch eine steigende Anzahl an T-Zellen war nicht erkennbar. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde in allen folgenden Versuchen ein Effektor-Zielzellverhältnis von 10:1 gewählt.

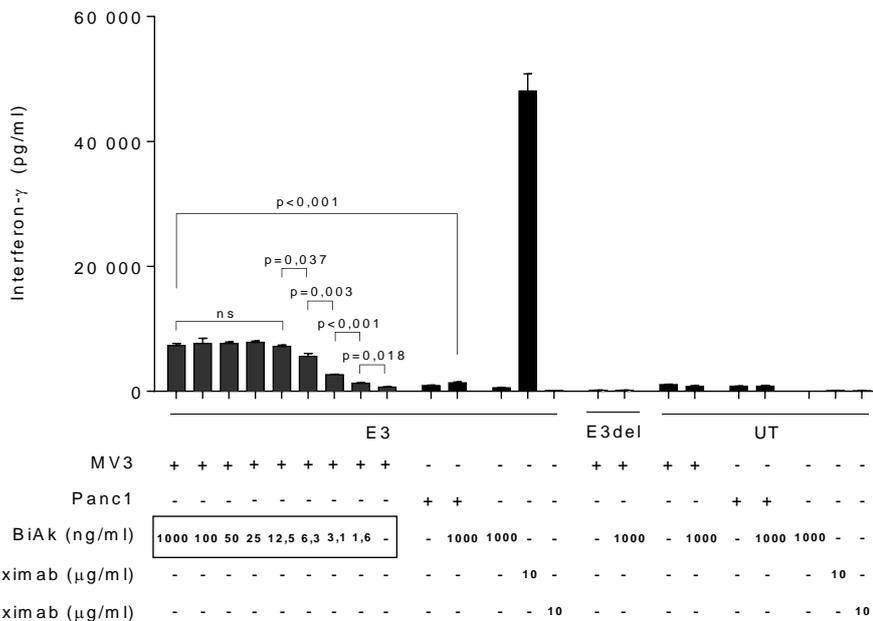


**Abbildung 22: Aktivierung humaner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-MCSP und A375 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl**

Messung der IFN-γ-Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt das eingesetzte Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.2.2.3 Spezifische T-Zell-Aktivierung durch MV3-Melanomzellen

Auch in Kokulturen mit humanen E3-T-Zellen und MCSP-exprimierenden MV3-Melanomzellen vermittelte anti-EGFRvIII x anti-MCSP eine konzentrationsabhängige Ausschüttung von IFN-γ (Abbildung 23).

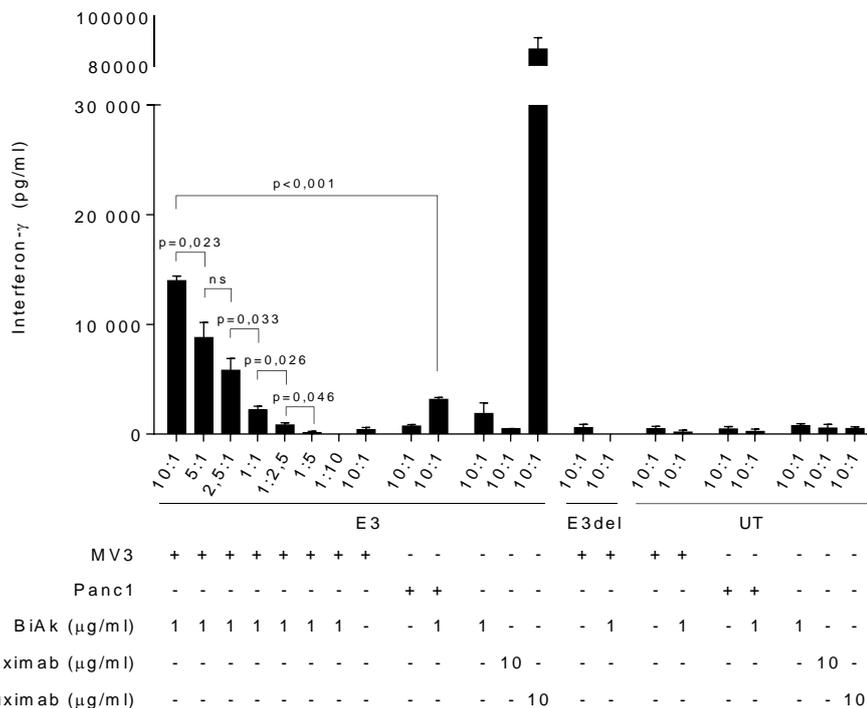


**Abbildung 23: Konzentrationsabhängige Aktivierung humaner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-MCSP und MV3-Melanomzellen**

Messung der IFN-γ-Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. ns = nicht signifikant.

Die Titration des BiAk führte bis zu einer Konzentration von 12,5 ng/ml zu einer verstärkten Ausschüttung von IFN- $\gamma$ . Eine höhere Antikörperkonzentration zeigte in der Folge keine signifikant stärkere Aktivierung der E3-T-Zellen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente mit verschiedenen Melanomzelllinien wurde dennoch auch in folgenden Versuchen mit MV3-Melanomzellen eine Antikörperkonzentration von 1  $\mu$ g/ml verwendet.

Die von anti-EGFRvIII x anti-MCSP vermittelte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung war in den mit MV3 durchgeführten Kokulturrexperimenten zudem abhängig von der verwendeten Anzahl der humanen E3-T-Zellen (Abbildung 24). Ein höheres Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen führte auch hier zu einer signifikant stärkeren T-Zell-Aktivierung. Eine Sättigung der Zytotoxizität durch eine steigende Anzahl an T-Zellen war nicht erkennbar. Auch in Versuchen mit MV3-Melanomzellen wurde aus diesem Grund ein Verhältnis von E3-T-Zellen zu MV3-Melanomzellen von 10:1 gewählt.



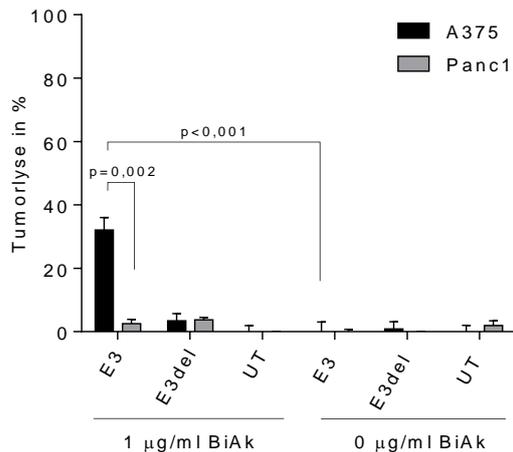
**Abbildung 24: Aktivierung humaner E3-T-Zellen durch anti-EGFRvIII x anti-MCSP und MV3 in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl**

Messung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand mittels Elisa nach Kokultur über 48 Stunden. Die Abszisse zeigt das eingesetzte Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. ns = nicht signifikant.

### 3.2.3 Einfluss von anti-EGFRvIII x anti-MCSP auf die Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen

#### 3.2.3.1 Spezifische Zytotoxizität gegen A375-Melanomzellen

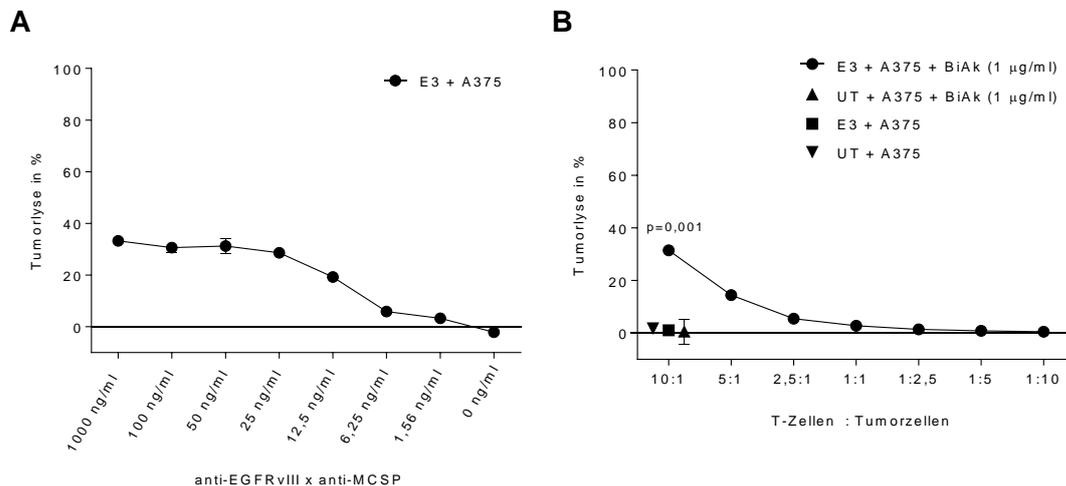
Um die Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen gegen A375-Melanomzellen zu untersuchen, wurde die LDH-Freisetzung nach 16-stündiger Kokultur gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass anti-EGFRvIII x anti-MCSP eine spezifische Lyse von MCSP-positiven A375-Melanomzellen vermittelt (Abbildung 25). So wurden ungefähr 35 % der schnell proliferierenden A375-Zellen lysiert. MCSP-negative Panc1-Pankreaskarzinomzellen zeigten keine erhöhte LDH-Freisetzung und wurden somit nicht lysiert.



**Abbildung 25: Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-MCSP und A375**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. Gezeigt wird die spezifische Tumorlyse der A375-Melanomzellen im Vergleich zu MCSP-negativen Panc1-Kontrollzellen. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Diese Zytotoxizität war in großem Maße abhängig von der Konzentration des BiAk (Abbildung 26 A). Bis zu einer Konzentration von 25 ng/ml führte die Titration des BiAk zu einer signifikant verstärkten Tumorlyse. Eine weitere Erhöhung der Antikörperkonzentration hatte keine vermehrte Lyse der A375-Melanomzellen zur Folge. Neben der Antikörperkonzentration war auch die Zahl der humanen E3-T-Zellen entscheidend. Eine höhere Anzahl der Effektorzellen führte zu einer signifikant stärkeren Zytotoxizität (Abbildung 26 B). Es war keine Sättigung der Zytotoxizität bei steigender T-Zellzahl erkennbar.

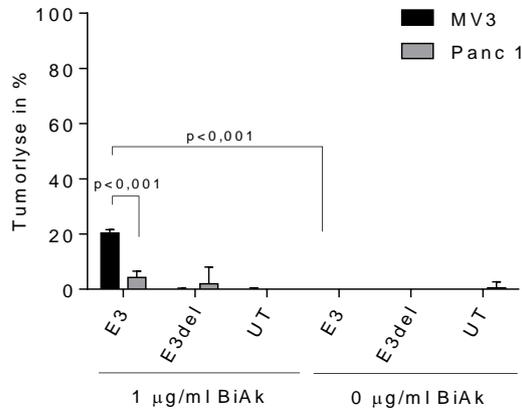


**Abbildung 26: Abhängigkeit der Zytotoxizität von der eingesetzten Konzentration von anti-EGFRvIII x anti-MCSP und der Zellzahl**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. **A** Abhängigkeit der Tumorlyse von der Antikörperkonzentration. **B** Abhängigkeit der Tumorlyse vom Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen. Die Abszisse zeigt die eingesetzte Konzentration des BiAk (A), beziehungsweise das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen (B). Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3.2.3.2 Spezifische Zytotoxizität gegen MV3-Melanomzellen

Ebenso konnte auch bei Experimenten mit MV3-Melanomzellen eine spezifische Lyse gezeigt werden (Abbildung 27). MCSP-negative Panc1-Pankreaskarzinomzellen zeigten keine erhöhte LDH-Freisetzung und wurden somit nicht lysiert.



**Abbildung 27: Zytotoxizität humaner E3-T-Zellen in Kokultur mit anti-EGFRvIII x anti-MCSP und MV3-Melanomzellen**

Die Zytotoxizität wurde mittels einer relativen LDH-Messung im Überstand der Kokulturen nach 16 Stunden bestimmt. Gezeigt wird die spezifische Tumorlyse der MV3-Melanomzellen im Vergleich zu MCSP-negativen Panc1-Kontrollzellen. Die Abszisse zeigt die verwendeten Zellen und Antikörper. Gezeigt sind die Mittelwerte der Triplikate eines repräsentativen Versuchs. Dargestellt ist der SEM. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination von *synthetic agonistic receptor* T-Zellen mit bispezifischen Antikörpern zur Therapie des Melanoms *in vitro* funktional ist. Die BiAk anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und anti-EGFRvIII x anti-MCSP vermittelten dabei eine spezifische Aktivierung muriner beziehungsweise humaner E3-T-Zellen ausschließlich in Kontakt mit Antigen-präsentierenden Melanomzellen. Die Aktivierung erfolgte exklusiv nach Bindung von E3-Fusionsrezeptor, BiAk und Zielantigen. Solange ein Baustein dieser Synapse fehlte, blieben die T-Zellen inaktiv. Als Bestätigung führten weder TYRP1<sup>-</sup> noch MCSP<sup>-</sup> Tumorzelllinien oder untransduzierte T-Zellen zu einer Aktivierung. Sobald die vollständige immunologische Synapse gebildet wurde, zeigte sich eine rasche T-Zell-Aktivierung und deutliche Lyse der Melanomzellen. Aktivierung und Zytotoxizität stiegen dabei mit der Anzahl der SAR-T-Zellen und der Konzentration des BiAk. Im murinen System führte die T-Zell-Aktivierung zudem zu einer nachhaltigen T-Zell-Proliferation und einer deutlichen Expression von PD-1 und CD69. Im Unterschied zu einer Monotherapie ermöglicht die Kombination transduzierter T-Zellen mit BiAk insbesondere eine verbesserte Therapiesteuerung mit flexibler Einbeziehung verschiedener tumorspezifischer Antigene und ermöglicht neue Ansatzpunkte zur Kontrolle auftretender Nebenwirkungen. Diese Arbeit zeigt somit erstmals eine neuartige Immuntherapie des malignen Melanoms unter Vermittlung zweier BiAk an vier verschiedenen Melanomzelllinien im murinen und humanen Modell.

### 4.2 Bedeutung einer modulierbaren Anti-Tumor-Aktivität

In Kokulturen mit Melanomzellen zeigte sowohl die Titration der T-Zellen als auch die der Antikörper einen starken Zusammenhang zur IFN- $\gamma$ -Ausschüttung als Marker der T-Zellaktivität. In klinischen Studien mit CAR-T-Zellen korrelierte die Infusion einer höheren Zelldosis ebenso einerseits mit einer ausgeprägteren Anti-Tumor-Aktivität, jedoch andererseits auch mit einem verstärkten Auftreten von Nebenwirkungen (Lee, Kochenderfer et al. 2015, Hay, Hanafi et al. 2017). Die maximale Anzahl infundierbarer T-Zellen wird somit durch das Ausmaß auftretender Nebenwirkungen wie dem CRS limitiert, das bei einer sehr hohen T-Zell-Dosis nicht kontrollierbare Ausmaße annehmen kann (Morgan, Yang et al. 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten E3-T-Zellen bleiben ohne Adapter funktionell anerg und sind im Ausmaß ihrer Aktivierung und Zytokinsekretion abhängig von der Konzentration des BiAk. Ein für das CRS ursächlicher Zytokinsturm ist durch die genaue Dosierbarkeit des BiAk und der Möglichkeit einer langsamen Dosissteigerung deshalb unwahrscheinlich.

Auch die titrierbare Tumorlyse ist eine bedeutsame Eigenschaft einer Tumortherapie. Bei einer Therapie mit konventionellen CAR-T-Zellen stellt das Tumorlysesyndrom ein ernsthaftes Risiko dar, das durch eine überschießende Zytotoxizität hervorgerufen wird (Porter, Levine et al. 2011, Kochenderfer, Dudley et al. 2013). Durch die unkontrollierte Tumorlyse werden unter anderem große Mengen an Nukleinsäuren und Kalium freigesetzt, die zu Nierenversagen, Herzrhythmusstörungen und Multiorganversagen führen können (Howard, Jones et al. 2011). Das Tumorlysesyndrom wird meist bei den eher therapiesensitiven hämatologischen Neoplasien beobachtet, die auch bereits gut auf zellvermittelte Therapien ansprechen. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Inzidenz bei soliden Tumoren durch weiterentwickelte zielgerichtete Therapien weiter ansteigen wird (Gold, Malamud et al. 1993, Meeks, Hammami et al. 2016). Das Auftreten eines Tumorlysesyndroms konnte in klinischen Studien bisher weder durch die Injektion einer geringeren Dosis an CAR-T-Zellen noch durch eine prophylaktische Gabe von Allopurinol gegen die erwartete Hyperurikämie verhindert werden (Porter, Levine et al. 2011, Kochenderfer, Dudley et al. 2013). Dies zeigt, dass im Umgang mit zellbasierten

Therapien die Tumorlast, die damit einhergehende Antigenpräsentation für modifizierte T-Zellen und die resultierende Anti-Tumoraktivität nur schwer abzuschätzen sind. Die in dieser Arbeit verwendeten BiAk ermöglichen dagegen eine titrierbare Zytotoxizität der E3-T-Zellen und damit eine kontrollierbare Tumorlyse.

#### 4.3 Risiko und Nutzen der T-Zell-Proliferation

Eine Herausforderung im Umgang mit konventionellen CAR-T-Zellen stellt in der klinischen Anwendung die *In-vivo*-Proliferation dar, die zu einer 1000-fachen Expansion der ursprünglich injizierten Zellen führen kann (Porter, Levine et al. 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass die den modifizierten T-Zellen präsentierte Antigenlast maßgeblich die Stärke der Expansion vermittelt (Finney, Brakke et al. 2019). So korreliert eine hohe Tumorlast mit der Schwere eines auftretenden CRS, das auf einer exponentiellen T-Zellproliferation und ungehemmten Zytokinausschüttung beruht (Maude, Frey et al. 2014, Maude, Teachey et al. 2015). Gleichzeitig ist eine Expansion von CAR-T-Zellen in klinischen Studien jedoch auch positiv mit einem Therapieansprechen assoziiert (Turtle, Hanafi et al. 2016, Shi, Shi et al. 2020). Dies verdeutlicht, dass zum Erreichen eines klinischen Therapieansprechens eine kontrollierte Proliferation notwendig ist, deren Mechanismen bei konventionellen CAR-T-Zell-Therapien bisher nur teilweise verstanden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch murine E3-T-Zellen nach Antikörperbindung proliferieren. Diese Proliferation war dabei abhängig von der Bindung des BiAk, aber weniger von der Bindung an antigenpräsentierende Tumorzellen. Obwohl anhand der CD69- und PD-1-Expression keine überdurchschnittliche T-Zell-Aktivierung erkennbar war, zeigten E3-T-Zellen auch durch alleinige Bindung des BiAk ohne Tumorzellen eine Proliferation innerhalb der ersten 24 Stunden. Nachhaltig war diese Proliferation über den Zeitraum von 48 Stunden jedoch erst durch die gleichzeitige Bindung an TYRP<sup>+</sup>-Tumorzellen. Eine solche geringe Proliferation ohne deutliche IFN- $\gamma$ -Sekretion wurde auch in anderen Studien beobachtet, die ebenfalls adaptermodulierte T-Zellen verwendeten (Chu, Zhou et al. 2018, Fu, He et al. 2019). Die den injizierten E3-T-Zellen präsentierte Antigenlast und daraus resultierende Proliferation kann jedoch maßgeblich durch die Dosis des BiAk bestimmt werden. Dies bietet die Möglichkeit zu einer stabilen T-Zell-Expansion unabhängig von der vorliegenden Tumorlast.

#### 4.4 Relevanz des Immunphänotyps am Beispiel von PD-1 und CD69

Eine der größten Hürden der T-Zell-Therapien gegen solide Tumoren besteht in der Immunsuppression der Tumorzellen durch die Expression von Oberflächenproteinen wie PD-L1 (Iwai, Ishida et al. 2002, Hirano, Kaneko et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine T-Zell-Aktivierung durch die Freisetzung von IFN- $\gamma$  zur Expression von PD-L1 auf zuvor PD-L1-negativen Tumorzellen führt (Dong, Strome et al. 2002). Gleichermäßen vermittelt eine T-Zell-Aktivierung die Expression von PD-1 auf T-Zellen (Ishida, Agata et al. 1992). Auch in dieser Arbeit zeigten insbesondere durch anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 aktivierte E3-T-Zellen eine deutliche PD-1-Expression. Der genaue Einfluss einer PD-1-Expression auf die T-Zellfunktion ist dabei jedoch komplex und derzeit nur teilweise verstanden. Während eine hohe Expressionsrate häufig mit einer Ermüdung der T-Zellen verbunden ist, haben niedrigere Expressionsraten insbesondere einen hemmenden Einfluss auf die Zytotoxizität und weniger auf die Zytokinsekretion der T-Zellen (Wei, Zhong et al. 2013). Durch die Blockade von PD-1 konnte in Studien die Funktionalität der auf diese Weise gehemmten T-Zellen wiederhergestellt werden, was zur erfolgreichen Entwicklung erster Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren führte (Barber, Wherry et al. 2006, Brahmer, Drake et al. 2010). Die

alleinige Expression von PD-1 kann jedoch nicht als sicheres Zeichen einer T-Zellermüdung gewertet werden, da dieser Zustand erst durch eine Vielzahl inhibitorischer Moleküle und ein komplexes Zusammenspiel verschiedener regulierender Gene zustande kommt. Eine PD-1-Expression auf T-Zellen ist daher eher als Reaktion auf eine T-Zell-Aktivierung zu werten, um eine überschießende Immunantwort zu unterbinden (Blackburn, Shin et al. 2009, Boussiotis 2016).

Die PD-1-Expression der E3-T-Zellen in der vorliegenden Arbeit bietet daher einen potenziellen Ansatzpunkt für die Kombination mit einer PD-1-Blockade zur Verbesserung der Anti-Tumoraktivität. Um die Herausforderungen des Tumormikromilieus zu bewältigen, werden auf dieser Basis auch bereits CAR-T-Zellen mit verschiedenen Therapien zur PD-1-Blockade kombiniert und in klinischen Studien untersucht (McGowan, Lin et al. 2020). Neben dem Einsatz von Immun-checkpoint-Inhibitoren rückt insbesondere auch die genetische Modulation von T-Zellen zur langfristigen PD-1-Depletion in den Fokus. So zeigten CAR-T-Zellen nach einer Unterdrückung der PD-1-Expression mittels CRISPR/Cas9 oder small-interfering RNA (siRNA) in Studien mit soliden Tumoren eine stärkere Anti-Tumoraktivität und eine längere Persistenz (Rupp, Schumann et al. 2017, Simon, Harrer et al. 2018, Hu, Zi et al. 2019). Eine Untersuchung der kostimulatorischen Domänen zeigte dabei, dass 4-1BB zu einer niedrigeren PD1-Expression und besseren Anti-Tumoraktivität gegen PD-L1-exprimierende Tumorzellen führt als CAR-T-Zellen mit CD28-Domänen (Du, Hirabayashi et al. 2019). Diese Ansätze könnten auch auf E3-T-Zellen übertragen werden.

Im murinen System wurde in der vorliegenden Arbeit des Weiteren gezeigt, dass die Bindung von anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 neben PD-1 auch zur Expression von CD69 führte. CD69 ist als Transmembranrezeptor auf verschiedenen Immunzellen nachweisbar und gilt als früher Marker einer T-Zell-Aktivierung (Gonzalez-Amaro, Cortes et al. 2013). Außerdem wird CD69 eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zelldifferenzierung und Zytokinsekretion im Rahmen einer Immunantwort zugesprochen (Cibrian, Sanchez-Madrid 2017). Die Phänotypisierung der E3-T-Zellen konnte bestätigen, dass ohne Kontakt zum BiAk keine Anzeichen einer Aktivierung vorlagen, wie sie durch eine Expression von CD69 und PD-1 zu beobachten gewesen wäre. Diese Eigenschaft ist wichtig für *In-vivo*-Experimente und bezüglich einer möglichen Patientenanwendung.

#### 4.5 Aufbau des E3-Fusionsrezeptors und mögliche Veränderungen

Der transduzierte E3-Fusionsrezeptor setzt sich aus EGFRvIII als extrazelluläre Domäne und CD3 $\zeta$  und CD28 als intrazelluläre Signalpeptide zusammen. EGFRvIII ist eine tumorspezifische Variante von EGFR und entsteht durch eine *in-frame*-Deletion von 801 Basenpaaren in der extrazellulären Domäne. Es wird insbesondere von Hirntumoren und zerebral metastasierenden Tumorentitäten wie Brust- und Lungentumoren exprimiert (Heimberger, Crotty et al. 2003). Auf gesundem Gewebe ist EGFRvIII dagegen nicht exprimiert, weshalb es derzeit als Zielantigen Gegenstand der klinischen Tumorforschung ist (Wikstrand, Hale et al. 1995). Insbesondere wird durch dieses Expressionsmuster eine *on-target-off-tumor*-Bindung der in dieser Arbeit verwendeten BiAk ausgeschlossen. Auch eine immunogene Reaktion gegen den Fusionsrezeptor ist unwahrscheinlich, da gerade die fehlende Immunogenität gegen EGFRvIII die tückische Eigenschaft für betroffene Tumorpatienten ist. Eine Immunantwort konnte dabei bisher nicht beobachtet werden (Sampson, Heimberger et al. 2010). Die Mutation verhindert zudem die Bindung aller bekannten Liganden des EGFR, wodurch eine unspezifische endogene Aktivierung der E3-T-Zellen unwahrscheinlich ist (Gan, Cvrljevic et al. 2013). Auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der endogen im Menschen gebildete

Ligand EGF nicht an EGFRvIII bindet. Diese Eigenschaften machen EGFRvIII zu einem vielversprechenden Antigen als Bindestelle der BiAk.

Die intrazelluläre Domäne des E3-Fusionsrezeptors orientiert sich am Aufbau eines CAR der zweiten Generation. Dieser besitzt zusätzlich zu CD3 $\zeta$  als zweite Signaldomäne meist CD28 oder 4-1BB, wobei beide Varianten beeindruckende klinische Ergebnisse zeigten. Insbesondere die Persistenz der injizierten CAR-T-Zellen verbesserte sich im Vergleich zur ersten Generation deutlich (Maude, Frey et al. 2014, Kochenderfer, Dudley et al. 2015). Das Signalpeptid CD3 $\zeta$  gehört zum T-Zell-Rezeptorkomplex und ist dafür verantwortlich, die extrazelluläre Bindung des TCR an eine intrazelluläre Signalkaskade weiterzugeben (Irving, Weiss 1991). Um die vollständige TCR-vermittelte T-Zell-Aktivierung zu imitieren, ist jedoch ein zweites Signal notwendig, das physiologischerweise durch die Bindung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 an den Liganden CD80 oder CD86 entsteht. Deshalb wurde das CD3 $\zeta$ -Signalpeptid intrazellulär mit CD28 gekoppelt, wodurch eine effektive IL-2-Produktion ermöglicht und eine vorzeitige T-Zell-Anergie vermieden wird (Kowolik, Topp et al. 2006). Um diesen Zusammenhang zu zeigen, wurde in der vorliegenden Arbeit als Negativkontrolle ein E3del-Konstrukt verwendet, das lediglich aus dem extrazellulären EGFRvIII-Teil besteht. Durch das Fehlen der intrazellulären Signalpeptide, kann die Bindung des BiAk nicht in eine T-Zell-Aktivierung übersetzt werden. Neben CD28 wurde in Studien insbesondere der Einfluss der kostimulatorischen Domänen 4-1BB und OX40 untersucht, die zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) gehören. Diese werden während der T-Zell-Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt als CD28 hochreguliert und beeinflussen so insbesondere die Zellexpansion und Zytokinsekretion (Hombach, Abken 2011). 4-1BB führte dabei als kostimulatorische CAR-Domäne im Vergleich zu CD28 *in vitro* zu einer geringeren Ermüdung der T-Zellen und zeigte in klinischen Versuchen bei gleicher Anti-Tumoreffektivität eine geringe Rate an schweren Nebenwirkungen (Long, Haso et al. 2015, Ying, He et al. 2019). Mittlerweile werden auch CAR der dritten Generation entwickelt, die CD3 $\zeta$  mit zwei kostimulatorischen Domänen verbinden. So zeigte ein CAR mit gleichzeitiger Expression von CD28 und 4-1BB eine verbesserte Expansion und verlängertes Überleben der CAR-T-Zellen gegenüber einer alleinigen Kostimulation durch CD28 (Ramos, Rouce et al. 2018). Dies lässt Rückschlüsse auf den E3-Fusionsrezeptor zu, der möglicherweise ebenfalls von einer zusätzlichen kostimulatorischen Domäne profitieren würde.

#### 4.6 Potenzial der ausgewählten Zielantigene

Damit ein Antigen als Zielantigen für zellbasierte Immuntherapien infrage kommt, sollte es verschiedene Anforderungen erfüllen. Um lokale und systemische Toxizitäten zu vermeiden, sollte das Antigen zunächst möglichst tumorspezifisch sein und nicht auf gesundem Gewebe exprimiert werden. Im Unterschied zu anderen zielgerichteten Therapien ist es bei zellbasierten Therapien jedoch oft nicht ausreichend, dass das Zielantigen lediglich in stärkerem Maße auf Tumorzellen als auf gesundem Gewebe exprimiert wird. Dies beruht einerseits auf der genetischen Instabilität von Tumoren, die zu eingeschränkter und im Ausmaß variabler Antigenexpression führt und andererseits auf der immunsupprimierenden Tumorumgebung (Hinrichs, Restifo 2013). So zeigten Patienten in verschiedenen klinischen Studien trotz weitreichender Toxizitäten an tumorfreien Geweben keine oder nur eine geringe Aktivität gegen den Tumor selbst (Parkhurst, Yang et al. 2011, Thistlethwaite, Gilham et al. 2017). Neben diesen *on-target*-Toxizitäten sind zudem *off-target*-Toxizitäten möglich, wenn ein Antigen auf gesundem Gewebe zwar nicht dem Zielantigen entspricht, jedoch ein identisches oder strukturell ähnliches Epitop besitzt. Für einen nachhaltigen Anti-Tumor-Effekt sollte das Antigen darüber hinaus auch möglichst homogen auf allen Tumorzellen und über alle Tumorstadien hinweg exprimiert sein. Diese Eigenschaft trifft insbesondere auf

Antigene zu, denen eine essenzielle Rolle in der Tumorgenese oder -progression zukommt (Hinrichs, Restifo 2013).

Die Zielantigene TYRP1 und MCSP (CSPG4) wurden bereits im Zusammenhang mit zellvermittelten Immuntherapien untersucht und konnten *in vitro* und *in vivo* gegen verschiedene Zelllinien einen ausgeprägten anti-tumoralen Effekt vermitteln (Burns, Zhao et al. 2010, Chinnasamy, Tran et al. 2013, Geldres, Savoldo et al. 2014). In klinischen Studien wurden Melanompatienten auch bereits mit monoklonalen Antikörpern gegen beide Antigene behandelt. Auch wenn sich deren Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf eine Therapie mit zellvermittelnden Substanzen übertragen lassen, so ist doch erwähnenswert, dass bei keiner der Studien nennenswerte Toxizitäten auftraten, obwohl beide Antigene auch in geringem Maße von gesunden Körperzellen exprimiert werden können. Insbesondere das Fehlen von *on-target-off-tumor*-Toxizitäten spricht damit insgesamt für eine hohe Melanomspezifität und legt die Verwendung als Tumorassoziiertes Antigen (TAA) für zellvermittelte Therapien nahe (Mittelman, Chen et al. 1990, Khalil, Postow et al. 2016). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die T-Zell-Aktivierung in hohem Maße von der Expression der Zielantigene abhängig ist. Nur Melanomzellen, die das Zielantigen exprimierten, führten zu einer signifikanten Stimulation der T-Zellen. Die Transduktion der murinen YUMM1.1-Zelllinie mit dem Melanomantigen TYRP1 ermöglichte zudem die Aktivierung zuvor nicht aktivierter T-Zellen. Diese Erkenntnis unterstreicht die hohe Antigenspezifität des Therapiemodells, welche wesentlich ist, um *off-target*-Effekte auszuschließen. Sowohl TYRP1 als auch MCSP kommt zudem eine entscheidende Bedeutung in der Zelldifferenzierung und dem Tumorüberleben zu, weshalb eine stabile Expression im Verlauf der Tumorprogression wahrscheinlich ist (Campoli, Ferrone et al. 2010, El Hajj, Journe et al. 2013). Aufgrund der prinzipiell möglichen Expression auf gesunden Melanozyten, ist jedoch in klinischen Versuchen insbesondere in Hinblick auf Toxizitäten der Haut und Augen erhöhte Vorsicht geboten.

#### 4.7 Charakteristika der bispezifischen Antikörper und alternativer Formate

Die in dieser Arbeit verwendeten BiAk basieren auf dem IgG-Format. Sie besitzen eine modifizierte Fc-Bindestelle, die keine Bindung von Fc- $\gamma$ -Rezeptoren ermöglicht. Durch diese Modifikation wird eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems ausgeschlossen. Im Unterschied zu *bispecific T-cell engager* (BiTE) wie Blinatumomab, die sich aus zwei miteinander verbundenen scFv zusammensetzen und kein Fc-Fragment besitzen, wurde jedoch aufgrund pharmakokinetischer Überlegungen auf eine Entfernung des Fc-Fragments verzichtet. Ein BiTE bindet an das endogene CD3 der T-Zellen des Patienten und an CD19 auf Lymphomzellen. Dies führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, Ausschüttung von Zytokinen und schließlich zur Lyse der CD19<sup>+</sup>-Zielzelle (Przepiorka, Ko et al. 2015). Blinatumomab wurde erfolgreich bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie eingesetzt und bot dabei durch seine geringe Halbwertszeit von nur wenigen Stunden eine im Vergleich zu CAR-T-Zellen deutlich verbesserte Kontrolle von Nebenwirkungen (Kantarjian, Stein et al. 2017). So konnten auch schwere CRS-Symptome bereits allein durch eine Unterbrechung der Antikörperinfusion schnell gebessert werden, wodurch sogar eine Therapiefortsetzung nach CRS möglich war (Marini, Sun et al. 2018). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit im Blut der Patienten, muss der Antikörper zur Therapie jedoch in Form einer kontinuierlichen Infusion verabreicht werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten BiAk ist eine Bindung des Fc-Fragments an FcRn dagegen weiterhin gewährleistet, wodurch eine im Vergleich zu BiTE verlängerte Halbwertszeit erreicht wird (Zhu, Wu et al. 2016, Yuraszek, Kasichayanula et al. 2017). Dies ermöglicht eine Anwendung auch bei Patienten, denen keine Dauerinfusion verabreicht werden kann. Eine effektive Therapie mit BiTE-Antikörpern setzt zudem voraus, dass der Patient ein potentes Immunsystem besitzt, um ausreichend viele und effektiv tumorlysierende T-

Zellen rekrutieren zu können. So zeigte Blinatumomab bei Patienten, die zuvor bereits immunsuppressiv mittels Chemotherapie behandelt wurden, einen Effekt, solange sich das Knochenmark zuvor ausreichend erholen konnte (Topp, Gokbuget et al. 2015). Im Unterschied zu Therapien genveränderten T-Zellen besteht jedoch weder ein Einfluss auf die Anzahl der aktivierten T-Zellen noch auf die Art der Aktivierung, da keine Kombination verschiedener T-Zell-aktivierender intrazellulärer Moleküle möglich ist und die Aktivierung allein auf der CD3-Bindung beruht.

Neben der Halbwertszeit bestimmt die Antikörperstruktur zudem auch die Bindungseigenschaften der BiAk. Sie besitzen ähnlich zu BiTE-Antikörpern eine monovalente Bindungsdomäne mit geringerer Affinität an den Fusionsrezeptor. Erst durch Präsentation des Zielantigens entsteht somit eine multivalente T-Zell-Aktivierung, die zur Bildung einer stabilen immunologischen Synapse führt (Brischwein, Parr et al. 2007). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine bivalente T-Zell-Bindung möglicherweise durch Rezeptorvernetzung zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung auch in Abwesenheit von Tumorzellen führte. Aus diesem Grund wurde ein 2+1-Format mit monovalenter T-Zell-Bindung gewählt, das bei vergleichbarer *on-target*-Lyse zu einer deutlich verringerten *off-target*-Aktivität führte (Kobold, Steffen et al. 2015). Durch die bivalente anti-TYRP1- beziehungsweise anti-MCSP-Bindungsdomäne entsteht dabei eine hohe Avidität für das Zielantigen, wodurch die BiAk hochselektiv sind und *off-target*-Bindungen unwahrscheinlich werden. Eine niedrige T-Zellaffinität hat dagegen den Vorteil, dass durch Ausbildung multipler, zeitlich begrenzter immunologischer Synapsen eine verbesserte Anti-Tumoraktivität und ein längeres Überleben der T-Zellen erreicht werden kann (Liu, Jiang et al. 2015, Ghorashian, Kramer et al. 2019).

#### 4.8 Immuntherapien zur Behandlung des malignen Melanoms

Das maligne Melanom ist bereits seit längerer Zeit ein beliebtes Tumormodell zur Erforschung von Immuntherapien. Dies hat zunächst praktische Gründe - die Entnahme von Zellen aus Hautläsionen ist unkompliziert, mit geringen Risiken für den Patienten verbunden und Melanomzellen lassen sich im Vergleich zu anderen Tumorentitäten einfach kultivieren (Maio 2012). Zudem fiel bei Melanompatienten bereits früh eine verhältnismäßig hohe Anzahl an spontanen Remissionen auf, die auf eine verstärkte Infiltration durch Immunzellen zurückzuführen waren (Kalialis, Drzewiecki et al. 2009). Es zeigte sich, dass maligne Melanome unter anderem aufgrund ihrer Pathogenese durch starke UV-Exposition eine hohe Rate an Spontanmutationen aufweisen, die zur Expression einer besonders hohen Zahl immunogener Antigene führt. Diese Neoantigene werden von infiltrierenden Immunzellen erkannt, weshalb das maligne Melanom zu den immunologisch „heißen“ Tumorentitäten gezählt wird (Walia, Mu et al. 2012, Schumacher, Schreiber 2015). Diese Erkenntnis führte zunächst zur erfolgreichen klinischen Anwendung von Interleukin-2 und später zum Einsatz von TIL (Rosenberg, Packard et al. 1988). Auch die aktuelle leitliniengerechte Therapie mit Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren beruht auf der prinzipiellen Immunogenität des Tumors und ist deshalb beim malignen Melanom in besonderer Weise wirksam (van Elsas, Hurwitz et al. 1999).

Sowohl TIL als auch Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren vermitteln ihren Effekt dabei im Wesentlichen durch die T-Zell-Rezeptor vermittelte Bindung an die von MHC-Rezeptoren präsentierten Antigene. Es zeigte sich, dass die Überlebenszeit von Patienten nach einer Therapie mit Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren unter anderem von der generellen Mutationslast des Tumors abhängt, die mit einer vermehrten Expression von Neoantigenen assoziiert ist (Van Allen, Miao et al. 2015, Johnson, Frampton et al. 2016). Auffällig ist jedoch, dass dabei teilweise auch Tumoren mit einer geringen Anzahl an Neoantigenen zu einer ausgeprägten Anti-Tumor-Aktivität führen können

(Hugo, Zaretsky et al. 2016). Die Ergebnisse von Kalaora et al. legen nahe, dass für einen Therapieerfolg daher nicht die reine Anzahl unterschiedlicher Neoantigene entscheidend ist, sondern die Isolierung der wenigen hoch immunogenen und breit exprimierten Neoantigene. So konnten *in vivo* bereits zwei neoantigen-spezifische T-Zell-Klone die Tumolyse von über 90 % der Melanomzellen einer Patientenbiopsie vermitteln (Kalaora, Wolf et al. 2018).

Trotz der prinzipiell hohen Immunogenität des malignen Melanoms sprachen in einer klinischen Studie mit dem Immun-*Checkpoint*-Inhibitor Pembrolizumab jedoch nur 42 % der Patienten mit einem fortgeschrittenen malignen Melanom auf eine Therapie mit anti-PD-1-Antikörpern an (Robert, Ribas et al. 2019). Eine mögliche Erklärung bietet die Heterogenität des malignen Melanoms. Schatton et al. konnten zeigen, dass eine bestimmte Subpopulation der Malignomzellen, *malignant-melanoma initiating cells* (MMIC), in besonderem Maße für die Tumorexpansion und Resistenzmechanismen verantwortlich ist und deren gezielte Depletion das Tumorstadium hemmen kann (Schatton, Murphy et al. 2008). Interessanterweise wird diese Zellpopulation insbesondere durch das bis vor wenigen Jahren als Erstlinientherapie verwendete Chemotherapeutikum Dacarbazin und durch MAP-Kinase-Inhibitoren, die derzeit als Erstlinientherapie verwendet werden, positiv selektioniert (Chartrain, Riond et al. 2012). Zudem hemmen MMIC die IL2-vermittelte T-Zellaktivierung und zeigen eine geringe Expressionsrate von MHC-1-Rezeptoren und Tumorassoziierten Antigenen (Schatton, Schutte et al. 2010). Die intratumorale T-Zell-Infiltration korreliert jedoch insbesondere beim malignen Melanom stark mit der Expression von MHC-1-Rezeptoren und weniger mit der Expression von TAA (Al-Batran, Rafiyan et al. 2005). Durch den resultierenden Selektionsdruck wird die Entstehung von MHC-1-mutierten oder -negativen Subpopulationen gefördert, die der Erkennung durch TIL entgehen können (Restifo, Marincola et al. 1996, Khong, Wang et al. 2004).

Der Verlust einer MHC-1-Expression auf Tumorzellen korreliert mit einer Tumorprogression, einem hohen Metastasierungsgrad, einem schlechteren Ansprechen auf Immuntherapien und in der Folge mit einer geringeren Überlebensrate der betroffenen Patienten (Kageshita, Hirai et al. 1999, Carretero, Romero et al. 2008, van Houdt, Sluijter et al. 2008). Ebenso sind auch MMIC insbesondere in Metastasen und seltener in Primärtumoren nachweisbar (Sousa, Espreafico 2008). In diesen späten Tumorstadien werden aktuell neben MAP-Kinase-Inhibitoren systemische Therapien mit Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren als Erstlinientherapie empfohlen. Eine Tumorprogression unter anti-CTLA4- oder anti-PD-1-Therapie ist aufgrund des MHC-abhängigen Wirkungsmechanismus eher bei Tumoren mit mutierten MHC-1-Rezeptorstatus zu beobachten (Sade-Feldman, Jiao et al. 2017). Es ist daher anzunehmen, dass eine effektive Therapie aufgrund der Heterogenität und der Resistenzmechanismen des malignen Melanoms zielgerichtet erfolgen muss, ohne von einer alleinigen Präsentation durch MHC-1-Rezeptoren abhängig zu sein.

Eine Lösung bieten insbesondere genetisch veränderte T-Zellen, die MHC-unabhängig Antigene binden können. Derzeit werden CAR-T-Zellen entwickelt, die neben TAA gleichzeitig auch an durch MHC-1-Rezeptoren präsentierte Antigene binden können (Maus, Plotkin et al. 2016). Studien bezüglich des Einsatzes von CAR-T-Zellen sind beim malignen Melanom jedoch bisher noch sehr limitiert und beschränken sich auf Tiermodelle. Eine große Schwierigkeit bereitet dabei insbesondere die Auswahl des richtigen Zielantigens. So konnten beispielsweise zwar anti-HER2-CAR-T-Zellen zur Behandlung eines TIL-resistenten humanen Melanoms im Mausexperiment eingesetzt werden, jedoch wird HER2 nur von weniger als 10 % aller primären Melanomläsionen exprimiert (Kluger, DiVito et al. 2004, Forsberg, Lindberg et al. 2019). Aktuell werden verschiedene klinische Studien mit CAR-T-Zellen zur Therapie des malignen Melanoms initiiert. Darunter befindet sich jedoch bislang keine, die MCSP oder TYRP1 als Zielantigen verwendet. Anti-MCSP-CAR-T-Zellen befinden sich aber momentan in

der Entwicklung und in diesem Zusammenhang soll auch die gleichzeitige Expression eines spezifischen TCR zur Verhinderung der Immunevasion untersucht werden (Simon, Harrer et al. 2019).

Auch SAR-T-Zellen könnten prinzipiell über Kombination mit BiAk sowohl gegen Neoantigene als auch TAA gerichtet werden. Antikörper gegen über MHC-1-Rezeptoren präsentierte Antigene, sogenannte TCR-*mimic* (TCRm) Antikörper, werden bereits seit einigen Jahren entwickelt (Wittman, Woodburn et al. 2006). Limitierend bleibt jedoch derzeit der aufwendige Prozess zur Identifikation von immunogenen Neoantigenen, die insbesondere beim malignen Melanom größtenteils einzigartig sind und für jeden Patienten eine personalisierte Therapieplanung erfordern. Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren bieten daher zum aktuellen Zeitpunkt eine elegante Möglichkeit, als universelle Therapie die Mutationslast des Tumors nutzbar zu machen (Schumacher, Schreiber 2015). Aus diesem Grund ist auf dem derzeitigen Stand der Forschung eine Therapie des malignen Melanoms basierend auf Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren, die von der Mutationslast und Neoantigenen des Melanoms profitieren, in Kombination mit einer zielgerichteten Therapie gegen TAA vielversprechend.

#### 4.9 Modulierbare SAR-T-Zellen im Vergleich zu konventionellen CAR-T-Zellen

##### 4.9.1 Steuerung einer ausgewogenen T-Zell-Aktivität

Die Grundlage einer effektiven Anti-Tumor-Aktivität von T-Zellen ist eine ausreichende Fähigkeit zur Proliferation, Zytokinsekretion und Tumorlyse, die während der Progression des malignen Melanoms und anderer Tumorentitäten zunehmend eingeschränkt wird (Baitsch, Baumgaertner et al. 2011, Woo, Turnis et al. 2012). Ursächlich hierfür ist eine vorzeitige Ermüdung der T-Zellen mit progressiver Differenzierung durch die Aktivierung regulatorischer Signalkaskaden und der zunehmenden Expression inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 (Wherry 2011). Auch die Potenz von CAR-T-Zellen ist wesentlich abhängig von der Proliferation und Persistenz der injizierten Zellen (Robbins, Dudley et al. 2004). Eine häufige Problematik in der Entwicklung von CAR-T-Zellen besteht dabei in einer Antigen-unabhängigen T-Zell-Aktivierung (Frigault, Lee et al. 2015). Long et al konnten zeigen, dass eine solches *tonic signalling* bei nahezu allen CAR-Konstrukten auftrat, die eine geringe Anti-Tumor-Aktivität zeigten. Bei den effizienten CAR-Konstrukten wurde dieses Phänomen dagegen nicht beobachtet. Diese Antigen-unabhängige Aktivierung basierte auf Interaktionen innerhalb der scFV, die zu einer Oligomerisierung und Bündelung der CAR auf der T-Zelloberfläche führen. Der Austausch der Signaldomäne CD28 durch 4-1BB verringerte diesen Effekt und verbesserte gleichzeitig das Überleben und die Leistung der untersuchten CAR-T-Zellen (Long, Haso et al. 2015). Die in dieser Arbeit verwendeten SAR-T-Zellen exprimieren dagegen kein scFv. Die Transduktion des Fusionsrezeptors führte in Abwesenheit des BiAk zu keiner gesteigerten tonischen Zellaktivierung über die basale Aktivierung hinaus. Auf diese Weise wird eine vorzeitige Ermüdung der SAR-T-Zellen verhindert. Die gemessene basale IFN- $\gamma$ -Sekretion der Zellen ist einerseits auf die konstitutive endogene Aktivierung nativer T-Zellen und andererseits auf eine Stimulation im Rahmen der Transduktion und Proliferation zurückzuführen (Ajina, Maher 2018). Eine geringe tonische Aktivierung zeigten humane E3-T-Zellen lediglich durch Bindung des BiAk. Proliferationsdaten und die Expressionsrate von CD69 lassen erkennen, dass eine dezente Aktivierung auch im murinen System ohne Bindung der Tumorzellen stattfindet. In Zusammenschau wird die nachhaltige Aktivierung, Proliferation und Zytotoxizität der E3-T-Zellen jedoch erst durch die Präsentation des Zielantigens vermittelt. Dennoch könnte ein Austausch von CD28 durch 4-1BB im E3-Fusionsrezeptor im Hinblick auf diese tonische Aktivierung erwogen werden.

Klinische Studien mit CAR-T-Zellen verlaufen bisher nach einem Alles-oder-nichts-Prinzip. Ab dem Zeitpunkt der Injektion verhalten sie sich im Hinblick auf die Anti-Tumorwirkung, Proliferation und Nebenwirkungen vollkommen autonom. Durch das Fehlen eines extrazellulären scFv sind SAR-T-Zellen dagegen in Abwesenheit der BiAk funktionell anerg, wodurch unspezifische *off-target*-Bindungen unwahrscheinlich werden. Zudem lassen sich SAR-T-Zellen durch Titration des BiAk an ein sinnvolles therapeutisches Fenster heranführen. Dies ermöglicht eine risikoärmere Anwendung in klinischen Studien. Im Unterschied zu CAR-T-Zellen, haben IgG-Antikörper eine Halbwertszeit von nur ungefähr 20 Tagen (Keizer, Huitema et al. 2010). Ohne Antikörper verlieren die transduzierten T-Zellen, wie *in vitro* gezeigt werden konnte, ihre Funktion, da sie durch kein im Organismus vorhandenes Antigen mehr stimuliert werden. Bei milden Nebenwirkungen könnte es somit ausreichen, die Antikörpergabe lediglich zu unterbrechen und zu einem späteren Zeitpunkt ohne erneute T-Zell-Infusion fortzusetzen. Falls die natürliche Elimination des BiAk keine ausreichende Symptomkontrolle bietet, könnten bei einer Therapie mit E3-T-Zellen zudem Antikörper gegen die EGFRvIII-Domäne oder den Fc-Teil eingesetzt werden. Therapien, die zur Verhinderung dieser Nebenwirkungen bei CAR-T-Zellen als einzige Möglichkeit den Einsatz von *safety switches* beinhalten, haben dagegen bisher meist den sofortigen und endgültigen Zelluntergang der injizierten T-Zellen zur Folge (Wang, Chang et al. 2011, Wu, Shi et al. 2017). Dies könnte den Therapieerfolg der Patienten gefährden und würde die Reaktivierung der T-Zellen bei Rezidiven ausschließen.

#### 4.9.2 Umgang mit tumoraler Heterogenität und Resistenzmechanismen

Maligne Melanome und andere Tumorerkrankungen zeigen eine Reihe von Mechanismen zur Umgehung einer Immunantwort und widerstehen selbst aggressiven Therapieverfahren. Eine Erklärung hierfür liegt in der ausgeprägten zellulären Heterogenität vieler Tumorentitäten. Die genetische Analyse von Tumorzellen des gleichen histopathologischen Typs unterschiedlicher Patienten zeigt dabei sowohl eine ausgeprägte intertumorale als auch intratumorale Heterogenität. Diese ist bereits in der Primärläsion nachzuweisen und nimmt mit der Progression des Tumors weiter zu. Verantwortlich hierfür ist einerseits die genetische Instabilität der Tumorzellen, die mit fortschreitender Proliferation zur Anreicherung von Mutationen führt. Andererseits treten evolutionäre Selektionsprozesse auf, die unter anderem auch durch Tumorthapien über Selektionsmechanismen zur Ausbildung von Resistenzen führen (Bhang, Ruddy et al. 2015, Dagogo-Jack, Shaw 2018). Bezüglich des malignen Melanoms konnte schon vor einiger Zeit gezeigt werden, dass T-Zell-Therapien gegen ein einzelnes Melanomantigen das Wachstum Antigen-negativer Melanomvarianten fördern (Jager, Ringhoffer et al. 1996). Auch in klinischen Studien verschiedener zielgerichteter Immuntherapien anderer Tumorentitäten traten trotz initial ermutigender Ergebnisse häufig Tumorantigen-negative Rezidive auf. Diese entstehen zum Teil durch *loss-of-function*-Mutationen und eine daraufhin folgende Selektion des Antigen-negativen Klons. Antigene, die dabei nicht von CAR-T-Zellen als Ziel verwendet wurden, waren davon nicht betroffen (Sampson, Heimberger et al. 2010, Rapoport, Stadtmauer et al. 2015).

Im Unterschied zu CAR-T-Zellen kann durch die Verwendung von SAR-T-Zellen mit BiAk nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Auswahl des Zielantigens der T-Zellen gesteuert werden. Dadurch ist auch bei einer multispezifischen Therapie lediglich die Transduktion eines einzigen Fusionsrezeptors nötig. Durch die Vermittlung verschiedener Antikörper kann dennoch eine Vielzahl von Antigenen auf dem Tumor gebunden werden. Dies erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit der T-Zellen und minimiert die Gefahr, dass sich Tumorzellen durch eine niedrigere Antigenexpression der Kontrolle des Immunsystems entziehen (Hegde, Corder et al. 2013). Da eine polyvalente Therapie somit das Potenzial für eine effektive Tumorthapie besitzt, rückt

auch die Entwicklung multispezifischer CAR-T-Zellen momentan in den Fokus verschiedener Arbeitsgruppen (Genssler, Burger et al. 2016, Zah, Lin et al. 2016). Jedem Einsatz dieser CAR-T-Zellen geht jedoch zwangsweise ein aufwendiges Prozedere der Zellentnahme und -transduktion voraus. Eine kurzfristige Reaktion auf veränderte Expressionsmuster der Tumorzellen ist dadurch nicht möglich. Bei einer Therapie mit SAR-T-Zellen ist dagegen nach der einmaligen Transduktion über das Einbringen neuer BiAk eine dynamische Zielauswahl möglich, ohne dafür neue T-Zellen entnehmen zu müssen.

#### 4.10 Vergleich von SAR-T-Zellen mit weiteren modulierbaren T-Zell-Therapien

Die vielversprechende Idee einer universellen T-Zelle, deren Aktivierung spezifisch durch einen Adapter vermittelt wird, wurde in anderer Form auch von weiteren Arbeitsgruppen verfolgt (Tamada, Geng et al. 2012, Urbanska, Lanitis et al. 2012, Ma, Kim et al. 2016). Die bezüglich ihrer Anwendung wohl einfachste zellvermittelte Therapieform besteht dabei in der Monotherapie mit CD3-aktivierenden BiAk. Diese BiAk bieten den Vorteil einer unkomplizierten Anwendung ohne jegliche labortechnische Zellmodifikation. Die bisher klinisch eingesetzten Antikörper scheinen allerdings auf einen Großteil ihres Potenzials zu verzichten. Bisherige BiTE-Antikörper aktivieren unspezifisch potenziell alle CD3-exprimierenden T-Zellen im Organismus, bieten ihnen dabei aber keine Kostimulation in Form einer CD28-Aktivierung. Dieser zweite Stimulus ist jedoch zur Ausbildung einer umfänglichen und nachhaltigen T-Zell-Aktivierung essenziell (June, Ledbetter et al. 1987, Mueller, Jenkins et al. 1989). So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die anti-CD19 BiTE-Moleküle exprimieren und zusätzlich zur CD3-Aktivierung mit CD28 kostimuliert werden, eine verstärkte Anti-Tumor-Effektivität besitzen. Insbesondere wurde so auch eine gesteigerte sequenzielle Aktivität im Vergleich zu ausschließlich CD3-stimulierten T-Zellen erreicht (Velasquez, Szoor et al. 2017). Für eine effiziente Therapie wird deshalb die Entwicklung gentechnisch veränderter T-Zellen favorisiert, die wie CAR-T-Zell-Therapien von der Kombination verschiedener intrazellulärer Signaldomänen profitieren.

Die derzeitig verfügbaren modifizierbaren Therapiemodelle lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe verwendet konventionelle CAR-T-Zellen, die ein scFv exprimieren und sich gegen einen molekularen Adapter richten. Diese Adapter bestehen häufig aus einem kompletten IgG-Antikörper oder alternativ aus Antikörperfragmenten, die aufgrund ihrer Größe eine bessere Tumorpenetration und geringere Immunogenität erreichen sollen. Andererseits geht damit auch eine geringere Halbwertszeit einher, die zwar die nachhaltige Tumorerinfiltration einschränkt, dafür jedoch eine enge Therapiekontrolle ermöglicht. Als Antikörperfragment wird entweder das komplette Fab, ein scFv, oder sogar nur eine einzige monomere variable Domäne verwendet (Darowski, Kobold et al. 2019). Anstelle von Antikörpern können auch *small molecules* wie Folsäure verwendet werden, die über Folsäure-Rezeptoren die Bindung an Tumorzellen ermöglichen (Kim, Ma et al. 2015). Die Verbindung zu CAR-T-Zellen wird über die Konjugation der Adapter mit spezifischen Markern erreicht, wie FITC oder Peptid-Neoepitopen (Cartellieri, Feldmann et al. 2016, Ma, Kim et al. 2016). Diese Gruppe von T-Zellmodellen erlaubt somit zwar eine Modulation der T-Zell-Aktivität, birgt aber wie konventionelle CAR-T-Zellen die Gefahr von *off-tumor*-Toxizitäten durch scFv-exprimierenden T-Zellen. Auch wenn die verwendeten Zielantigene nicht im menschlichen Organismus exprimiert werden, können scFv-exprimierende CAR-T-Zellen durch molekulare Mimikry *off-target*-Toxizitäten verursachen. Zudem ist FITC ein Fluoreszenzfarbstoff, der *in vivo* immunogen wirkt und somit potenziell zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (Wang, Nakamura et al. 1996, Tamada, Geng et al. 2012).

Die andere Gruppe modifizierbarer T-Zell-Therapien verwendet auf CAR-T-Zellen basierende Modelle, bei denen jedoch die extrazelluläre Domäne nicht durch ein scFv gebildet wird. Zu dieser Gruppe gehören auch die in dieser Arbeit präsentierten SAR-T-Zellen, die extrazellulär EGFRvIII exprimieren. Andere Arbeitsgruppen verwendeten modifiziertes Avidin oder Streptavidin, die an mit Biotin markierte Antikörper binden. Da Biotin jedoch auch natürlicherweise im humanen Serum nachweisbar ist, besteht prinzipiell die Gefahr einer unspezifischen T-Zell-Bindung (Mock, Malik 1992). Zudem kann eine Immunogenität der modifizierten Rezeptoren bislang nicht ausgeschlossen werden (Urbanska, Lanitis et al. 2012, Lohmueller, Ham et al. 2017). Auch die Expression eines Fc- $\gamma$ -Rezeptor III (Fc $\gamma$ R III) wurde ausgiebig untersucht, der durch die Bindung an den Fc-Teil von Antikörpern die Verwendung klinisch bereits verwendeter therapeutischer Antikörper als Adapter ermöglichen kann (Kudo, Imai et al. 2014, Rataj, Jacobi et al. 2018). Obwohl die Diskriminationsfähigkeit der T-Zellen durch Antikörpermodifikationen verbessert werden kann, droht bei diesem Ansatz die unspezifische Bindung an zirkulierende Antikörper.

Cho et al. entwickelten dagegen eine neuartige Plattform, bei der die Bindung der CAR-T-Zellen zu den scFv-Adaptoren auf Leucin-Zippen basiert. Durch Modulierung der Affinität sowohl zum Tumorantigen als auch zur T-Zelle und der Entwicklung aktivierender und inhibierender Adapter soll eine Feinjustierung der Immunantwort möglich werden (Darowski, Kobold et al. 2019). Um die Immunogenität der Leucin-Zipper zu reduzieren, basieren sie auf humanen Transkriptionsfaktoren. Auch wenn diese im humanen Organismus intrazellulär lokalisiert sind, kann das Risiko einer Interaktion zwischen synthetischen Komponenten der CAR-T-Zellen und endogenen Strukturen bisher noch nicht ausgeschlossen werden (Cho, Collins et al. 2018). Die Verbindung zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten SAR-T-Zellen zu BiAk wird dagegen über EGFRvIII vermittelt, das als tumorspezifisches Peptid im menschlichen Organismus physiologischer Weise nicht vorkommt und in klinischen Studien bisher keine Immunantwort auslösen konnte (Humphrey, Wong et al. 1990, Sampson, Heimberger et al. 2010).

#### 4.11 Ausblick

Da es sich bei der hier gezeigten Arbeit um *In-vitro*-Experimente handelt, sind weitere Versuche notwendig, um das vorgestellte Therapiemodell *in vivo* zu untersuchen. Insbesondere interessant für die Zukunft wären Untersuchungen in einem immunkompetenten Mausmodell. In dieser Arbeit wurde eine PD-1-Expression der murinen T-Zellen gezeigt, die einen entscheidenden Einfluss auf die *In-vivo*-Aktivität haben könnte. Neben der weiteren Untersuchung der PD-1-PD-L1-Achse, gibt es andere Aspekte wie die Stabilität der Antigenexpression auf Tumorzellen, der Einfluss von Zytokinen und immunsuppressiver Zellen wie MDSC und Makrophagen im Tumormikromilieu, die einen Einfluss auf die Effektivität der SAR-T-Zellen haben könnten. Auch die Penetration des soliden Tumors durch SAR-T-Zellen und BiAk könnte in weiteren Experimenten untersucht werden. Obwohl der E3-Fusionsrezeptor in dieser Studie erfolgreiche Ergebnisse zeigte, ließen sich auf Grundlage neuer Studienergebnisse bezüglich des CAR-Designs auch weitere Modifikationen vornehmen. So wäre beispielsweise eine zusätzliche Stimulation durch eine 4-1BB-Domäne möglich, die insbesondere bezüglich einer *In-vivo*-Anwendung in Studien Vorteile zeigte.

## 5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom bleibt auch nach der Entwicklung neuer Immuntherapien besonders im metastasierten Stadium eine Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Trotz beeindruckender Ergebnisse bei hämatologischen Neoplasien, sind T-Zellbasierte Immuntherapien bei soliden Tumoren bisher deutlich weniger effektiv und bergen gefährliche Nebenwirkungen wie das *cytokine release syndrome* (CRS). In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob *Synthetic-Agonistic-Receptor*-transduzierte T-Zellen (SAR-T-Zellen) in Kombination mit den bispezifischen Antikörpern (BiAk) anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und anti-EGFRvIII x anti-MCSP die Therapie solider Tumore am Beispiel des malignen Melanoms verbessern können. Aufbauend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Kobold, Steffen et al. 2015, Karches, Benmebarek et al. 2019) konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die spezifische Aktivierung und Zytotoxizität humaner und muriner SAR-T-Zellen durch die Verwendung von BiAk moduliert werden kann. Nachdem Karches et al. *in vitro* und *in vivo* eine spezifische Anti-Tumor-Aktivität gegen Antigen-überexprimierende Pankreaskarzinomzelllinien nachweisen konnten, zeigt die vorliegende Arbeit, dass lediglich durch den Austausch der BiAk *in vitro* eine spezifische Anti-Tumor-Aktivität gegen endogen Antigen-exprimierende Melanomzelllinien möglich ist. Die verwendeten SAR-T-Zellen exprimierten dabei in den Versuchen einen Fusionsrezeptor gleichen Aufbaus, der in Kombination mit BiAk eine MHC-unabhängige Anti-Tumor-Aktivität ermöglicht.

In *In-vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass murine und humane E3-T-Zellen in Kokultur mit *tyrosinase related protein 1* (TYRP1)- beziehungsweise *melanoma-associated chondroitin sulfate* (MCSP)-exprimierenden Melanomzellen durch die Vermittlung der BiAk aktiviert werden. Diese Aktivierung führte zur Lyse verschiedener Antigen-exprimierender Zelllinien. Aktivierung und Lyse waren dabei sowohl abhängig von der Anzahl der SAR-T-Zellen als auch von der Konzentration des BiAk. Antigen-negative Tumorzelllinien führten weder zur T-Zell-Aktivierung noch zur Tumorlyse. Die Expression eines tumorspezifischen Antigens auf zuvor Antigen-negativen Melanomzellen ermöglichte dagegen die Stimulation und Zytotoxizität der SAR-T-Zellen. Die BiAk vermittelten im murinen Modell die Proliferation der T-Zellen und eine Expression von CD69- und PD-1-Markern im Sinne einer T-Zell-Aktivierung.

Die Effektivität und damit einhergehende Nebenwirkungen können somit durch die Anzahl der eingesetzten SAR-T-Zellen und die Dosis des BiAk beeinflusst werden. Ohne BiAk verlieren SAR-T-Zellen ihre Funktion, da sie durch kein im Organismus vorhandenes Antigen stimuliert werden. Dadurch wird das Risiko unkalkulierbarer Nebenwirkungen gesenkt. SAR-T-Zellen können in der Folge als Universalzellen durch Kombination mit verschiedenen Antikörpern gegen eine Vielzahl tumorspezifischer Antigene gerichtet werden. Dies erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit der T-Zellen, minimiert die Gefahr eines *tumor escape* durch Herunterregulation des Antigens und erlaubt eine unkomplizierte Anpassung der Therapie an eine veränderte Antigenexpression des Tumors. Weitere Versuche sind insbesondere in *In-vivo*-Modellen nötig, um die Tumorpenetranz und den Einfluss des immunsuppressiven Tumormilieus auf die Leistungsfähigkeit der SAR-T-Zellen zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit die grundlegende Funktionalität von SAR-T-Zellen in Kombination mit bispezifischen Antikörpern zur Behandlung von Melanomzellen *in vitro* gezeigt werden. Dies stellt einen Grundstein im Sinne einer *proof-of-concept*-Studie zur modifizierbaren Zelltherapie solider Tumore am Beispiel des malignen Melanoms dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ajina A, Maher J. "Strategies to address chimeric antigen receptor tonic signaling." *Mol Cancer Ther* 2018; 17:1795-1815
- Al-Batran S E, Rafiyan M R, Atmaca A, Neumann A, Karbach J, Bender A, Weidmann E, Altmannsberger H M, Knuth A, Jager E. "Intratumoral t-cell infiltrates and mhc class i expression in patients with stage iv melanoma." *Cancer Res* 2005; 65:3937-3941
- American Cancer Society (2016). "Cancer facts & figures 2016" Atlanta, 2016
- Ascierto P A, Dreno B, Larkin J, Ribas A, Liskay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Atkinson V, Dutriaux C, Garbe C, Hsu J, Jones S, Li H, McKenna E, Voulgari A, McArthur G A. "5-year outcomes with cobimetinib plus vemurafenib in braf (v600) mutation-positive advanced melanoma: Extended follow-up of the cobrim study." *Clin Cancer Res* 2021;
- Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, Raghav S K, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N, Speiser D E. "Exhaustion of tumor-specific cd8(+) t cells in metastases from melanoma patients." *J Clin Invest* 2011; 121:2350-2360
- Balch C M, Soong S J, Gershenwald J E, Thompson J F, Reintgen D S, Cascinelli N, Urist M, McMasters K M, Ross M I, Kirkwood J M, Atkins M B, Thompson J A, Coit D G, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu P Y, Lyman G H, Morabito A. "Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the american joint committee on cancer melanoma staging system." *J Clin Oncol* 2001; 19:3622-3634
- Barber D L, Wherry E J, Masopust D, Zhu B, Allison J P, Sharpe A H, Freeman G J, Ahmed R. "Restoring function in exhausted cd8 t cells during chronic viral infection." *Nature* 2006; 439:682-687
- Beatty G L, Haas A R, Maus M V, Torigian D A, Soulen M C, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine B L, Albelda S M, Kalos M, June C H. "Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mrna-engineered t cells induce anti-tumor activity in solid malignancies." *Cancer Immunol Res* 2014; 2:112-120
- Bhang H E, Ruddy D A, Krishnamurthy Radhakrishna V, Caushi J X, Zhao R, Hims M M, Singh A P, Kao I, Rakiec D, Shaw P, Balak M, Raza A, Ackley E, Keen N, Schlabach M R, Palmer M, Leary R J, Chiang D Y, Sellers W R, Michor F, Cooke V G, Korn J M, Stegmeier F. "Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding." *Nat Med* 2015; 21:440-448
- Blackburn S D, Shin H, Haining W N, Zou T, Workman C J, Polley A, Betts M R, Freeman G J, Vignali D A, Wherry E J. "Coregulation of cd8+ t cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection." *Nat Immunol* 2009; 10:29-37
- Boussiotis V A. "Molecular and biochemical aspects of the pd-1 checkpoint pathway." *N Engl J Med* 2016; 375:1767-1778
- Brahmer J R, Drake C G, Wollner I, Powderly J D, Picus J, Sharfman W H, Stankevich E, Pons A, Salay T M, McMiller T L, Gilson M M, Wang C, Selby M, Taube J M, Anders R, Chen L, Korman A J, Pardoll D M, Lowy I, Topalian S L. "Phase i study of single-agent anti-programmed death-1 (mdx-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." *J Clin Oncol* 2010; 28:3167-3175
- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner E R, Werner-Felmayer G, Weiss H G, Gobel G, Margreiter R, Konigsrainer A, Fuchs D, Amberger A. "Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating t cells." *Clin Cancer Res* 2006; 12:1144-1151
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. "Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* 2018;

- Brischwein K, Parr L, Pflanz S, Volkland J, Lumsden J, Klinger M, Locher M, Hammond S A, Kiener P, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle P A. "Strictly target cell-dependent activation of t cells by bispecific single-chain antibody constructs of the bite class."  
*J Immunother* 2007; 30:798-807
- Brown C E, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner J R, Naranjo A, Ostberg J R, Blanchard M S, Kilpatrick J, Simpson J, Kurien A, Priceman S J, Wang X, Harshbarger T L, D'Apuzzo M, Ressler J A, Jensen M C, Barish M E, Chen M, Portnow J, Forman S J, Badie B. "Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor t-cell therapy."  
*N Engl J Med* 2016; 375:2561-2569
- Budno J N, Kochenderfer J N. "Toxicities of chimeric antigen receptor t cells: Recognition and management."  
*Blood* 2016; 127:3321-3330
- Burns W R, Zhao Y, Frankel T L, Hinrichs C S, Zheng Z, Xu H, Feldman S A, Ferrone S, Rosenberg S A, Morgan R A. "A high molecular weight melanoma-associated antigen-specific chimeric antigen receptor redirects lymphocytes to target human melanomas."  
*Cancer Res* 2010; 70:3027-3033
- Callahan M K, Kluger H, Postow M A, Segal N H, Lesokhin A, Atkins M B, Kirkwood J M, Krishnan S, Bhole R, Horak C, Wolchok J D, Sznol M. "Nivolumab plus ipilimumab in patients with advanced melanoma: Updated survival, response, and safety data in a phase i dose-escalation study."  
*J Clin Oncol* 2018; 36:391-398
- Campoli M, Ferrone S, Wang X. "Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4."  
*Adv Cancer Res* 2010; 109:73-121
- Campoli M R, Chang C C, Kageshita T, Wang X, McCarthy J B, Ferrone S. "Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (hmw-maa): A melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (mscp) with biological and clinical significance."  
*Crit Rev Immunol* 2004; 24:267-296
- Carretero R, Romero J M, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho F M, Real L M, Garrido F, Cabrera T. "Analysis of hla class i expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy."  
*Immunogenetics* 2008; 60:439-447
- 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 J* 2016; 6:e458
- Chartrain M, Riond J, Stennevin A, Vandenberghe I, Gomes B, Lamant L, Meyer N, Gairin J E, Guilbaud N, Annereau J P. "Melanoma chemotherapy leads to the selection of abcb5-expressing cells."  
*PLoS One* 2012; 7:e36762
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. "Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes."  
*Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:27-40
- Chinnasamy D, Tran E, Yu Z, Morgan R A, Restifo N P, Rosenberg S A. "Simultaneous targeting of tumor antigens and the tumor vasculature using t lymphocyte transfer synergize to induce regression of established tumors in mice."  
*Cancer Res* 2013; 73:3371-3380
- Cho J H, Collins J J, Wong W W. "Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of t cell responses."  
*Cell* 2018; 173:1426-1438 e1411
- Chu W, Zhou Y, Tang Q, Wang M, Ji Y, Yan J, Yin D, Zhang S, Lu H, Shen J. "Bi-specific ligand-controlled chimeric antigen receptor t-cell therapy for non-small cell lung cancer."  
*Biosci Trends* 2018; 12:298-308
- Cibrian D, Sanchez-Madrid F. "Cd69: From activation marker to metabolic gatekeeper."  
*Eur J Immunol* 2017; 47:946-953

- Dagogo-Jack I, Shaw A T. "Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies."  
*Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15:81-94
- Darowski D, Kobold S, Jost C, Klein C. "Combining the best of two worlds: Highly flexible chimeric antigen receptor adaptor molecules (car-adaptors) for the recruitment of chimeric antigen receptor t cells."  
*MAbs* 2019; 11:621-631
- Davila M L, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, Chung S S, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, He Q, Fink M, Shinglot H, Youssif M, Satter M, Wang Y, Hosey J, Quintanilla H, Halton E, Bernal Y, Bouhassira D C, Arcila M E, Gonen M, Roboz G J, Maslak P, Douer D, Frattini M G, Giral S, Sadelain M, Brentjens R. "Efficacy and toxicity management of 19-28z car t cell therapy in b cell acute lymphoblastic leukemia."  
*Sci Transl Med* 2014; 6:224ra225
- Di Stasi A, De Angelis B, Rooney C M, Zhang L, Mahendravada A, Foster A E, Heslop H E, Brenner M K, Dotti G, Savoldo B. "T lymphocytes coexpressing ccr4 and a chimeric antigen receptor targeting cd30 have improved homing and antitumor activity in a hodgkin tumor model."  
*Blood* 2009; 113:6392-6402
- Dong H, Strome S E, Salomao D R, Tamura H, Hirano F, Flies D B, Roche P C, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon V A, Celis E, Chen L. "Tumor-associated b7-h1 promotes t-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion."  
*Nat Med* 2002; 8:793-800
- Du H, Hirabayashi K, Ahn S, Kren N P, Montgomery S A, Wang X, Tiruthani K, Mirlekar B, Michaud D, Greene K, Herrera S G, Xu Y, Sun C, Chen Y, Ma X, Ferrone C R, Pylayeva-Gupta Y, Yeh J J, Liu R, Savoldo B, Ferrone S, Dotti G. "Antitumor responses in the absence of toxicity in solid tumors by targeting b7-h3 via chimeric antigen receptor t cells."  
*Cancer Cell* 2019; 35:221-237 e228
- Dudley M E, Gross C A, Langan M M, Garcia M R, Sherry R M, Yang J C, Phan G Q, Kammula U S, Hughes M S, Citrin D E, Restifo N P, Wunderlich J R, Prieto P A, Hong J J, Langan R C, Zlott D A, Morton K E, White D E, Laurencot C M, Rosenberg S A. "Cd8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma."  
*Clin Cancer Res* 2010; 16:6122-6131
- Dudley M E, Wunderlich J, Nishimura M I, Yu D, Yang J C, Topalian S L, Schwartzentruber D J, Hwu P, Marincola F M, Sherry R, Leitman S F, Rosenberg S A. "Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive t lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma."  
*J Immunother* 2001; 24:363-373
- Dudley M E, Wunderlich J R, Yang J C, Hwu P, Schwartzentruber D J, Topalian S L, Sherry R M, Marincola F M, Leitman S F, Seipp C A, Rogers-Freezer L, Morton K E, Nahvi A, Mavroukakis S A, White D E, Rosenberg S A. "A phase i study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific t lymphocytes in patients with metastatic melanoma."  
*J Immunother* 2002; 25:243-251
- El Hajj P, Journe F, Wiedig M, Laios I, Sales F, Galibert M D, Van Kempen L C, Spatz A, Badran B, Larsimont D, Awada A, Ghanem G. "Tyrosinase-related protein 1 mrna expression in lymph node metastases predicts overall survival in high-risk melanoma patients."  
*Br J Cancer* 2013; 108:1641-1647
- Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart E W, Bray F. "International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk?"  
*Int J Cancer* 2013; 132:385-400
- Eskilsson E, Rosland G V, Solecki G, Wang Q, Harter P N, Graziani G, Verhaak R G W, Winkler F, Bjerkvig R, Miletic H. "Egfr heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma."  
*Neuro Oncol* 2018; 20:743-752
- Feng K, Guo Y, Dai H, Wang Y, Li X, Jia H, Han W. "Chimeric antigen receptor-modified t cells for the immunotherapy of patients with egfr-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer."  
*Sci China Life Sci* 2016; 59:468-479
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D M, Forman D, Bray F. "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012."  
*Int J Cancer* 2015; 136:E359-386

- Finney O C, Brakke H M, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D, Lopez M, Futrell R B, Orentas R J, Li D, Gardner R A, Jensen M C. "Cd19 car t cell product and disease attributes predict leukemia remission durability."  
*J Clin Invest* 2019; 130:
- Forsberg E M V, Lindberg M F, Jespersen H, Alsen S, Bagge R O, Donia M, Svane I M, Nilsson O, Ny L, Nilsson L M, Nilsson J A. "Her2 car-t cells eradicate uveal melanoma and t-cell therapy-resistant human melanoma in il2 transgenic nod/scid il2 receptor knockout mice."  
*Cancer Res* 2019; 79:899-904
- Freeman G J, Long A J, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz L J, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne M C, Horton H F, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman M R, Carreno B M, Collins M, Wood C R, Honjo T. "Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation."  
*J Exp Med* 2000; 192:1027-1034
- Friday B B, Adjei A A. "Advances in targeting the ras/raf/mek/erk mitogen-activated protein kinase cascade with mek inhibitors for cancer therapy."  
*Clin Cancer Res* 2008; 14:342-346
- Frigault M J, Lee J, Basil M C, Carpenito C, Motohashi S, Scholler J, Kawalekar O U, Guedan S, McGettigan S E, Posey A D, Jr., Ang S, Cooper L J, Platt J M, Johnson F B, Paulos C M, Zhao Y, Kalos M, Milone M C, June C H. "Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of t cells."  
*Cancer Immunol Res* 2015; 3:356-367
- Fu M, He Q, Guo Z, Zhou X, Li H, Zhao L, Tang H, Zhou X, Zhu H, Shen G, He Y, Lei P. "Therapeutic bispecific t-cell engager antibody targeting the transferrin receptor."  
*Front Immunol* 2019; 10:1396
- Gan H K, Cvrljevic A N, Johns T G. "The epidermal growth factor receptor variant iii (egfrviii): Where wild things are altered."  
*FEBS J* 2013; 280:5350-5370
- Gattinoni L, Klebanoff C A, Palmer D C, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, Finkelstein S E, Theoret M R, Rosenberg S A, Restifo N P. "Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred cd8+ t cells."  
*J Clin Invest* 2005; 115:1616-1626
- Geldres C, Savoldo B, Hoyos V, Caruana I, Zhang M, Yvon E, Del Vecchio M, Creighton C J, Ittmann M, Ferrone S, Dotti G. "T lymphocytes redirected against the chondroitin sulfate proteoglycan-4 control the growth of multiple solid tumors both in vitro and in vivo."  
*Clin Cancer Res* 2014; 20:962-971
- Genssler S, Burger M C, Zhang C, Oelsner S, Mildenerberger I, Wagner M, Steinbach J P, Wels W S. "Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival."  
*Oncoimmunology* 2016; 5:e1119354
- Ghali L, Wong S T, Tidman N, Quinn A, Philpott M P, Leigh I M. "Epidermal and hair follicle progenitor cells express melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan core protein."  
*J Invest Dermatol* 2004; 122:433-442
- Ghorashian S, Kramer A M, Onuoha S, Wright G, Bartram J, Richardson R, Albon S J, Casanovas-Company J, Castro F, Popova B, Villanueva K, Yeung J, Vetharoy W, Guvenel A, Wawrzyniecka P A, Mekkaoui L, Cheung G W, Pinner D, Chu J, Lucchini G, Silva J, Ciocarlie O, Lazareva A, Inglott S, Gilmour K C, Ahsan G, Ferrari M, Manzoor S, Champion K, Brooks T, Lopes A, Hackshaw A, Farzaneh F, Chiesa R, Rao K, Bonney D, Samarasinghe S, Goulden N, Vora A, Veys P, Hough R, Wynn R, Pule M A, Amrolia P J. "Enhanced car t cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with all treated with a low-affinity cd19 car."  
*Nat Med* 2019; 25:1408-1414
- Goff S L, Smith F O, Klapper J A, Sherry R, Wunderlich J R, Steinberg S M, White D, Rosenberg S A, Dudley M E, Yang J C. "Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: Analysis of tumors resected for til."  
*J Immunother* 2010; 33:840-847

Gold J E, Malamud S C, LaRosa F, Osband M E. "Adoptive chemoimmunotherapy using ex vivo activated memory t-cells and cyclophosphamide: Tumor lysis syndrome of a metastatic soft tissue sarcoma." *Am J Hematol* 1993; 44:42-47

Gonzalez-Amaro R, Cortes J R, Sanchez-Madrid F, Martin P. "Is cd69 an effective brake to control inflammatory diseases?" *Trends Mol Med* 2013; 19:625-632

Gross G, Waks T, Eshhar Z. "Expression of immunoglobulin-t-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10024-10028

Grupp S A, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter D L, Rheingold S R, Teachey D T, Chew A, Hauck B, Wright J F, Milone M C, Levine B L, June C H. "Chimeric antigen receptor-modified t cells for acute lymphoid leukemia." *N Engl J Med* 2013; 368:1509-1518

Harlin H, Meng Y, Peterson A C, Zha Y, Tretiakova M, Slingsluff C, McKee M, Gajewski T F. "Chemokine expression in melanoma metastases associated with cd8+ t-cell recruitment." *Cancer Res* 2009; 69:3077-3085

Hartmann A, Schirmacher P, Sterlacci W, Koch W, Liesenfeld D B, Schif B, Garbe C. "Braf mutation testing in melanoma: Results from a german observational multicenter study." *Virchows Arch* 2019; 474:71-78

Hay K A, Hanafi L A, Li D, Gust J, Liles W C, Wurfel M M, Lopez J A, Chen J, Chung D, Harju-Baker S, Cherian S, Chen X, Riddell S R, Maloney D G, Turtle C J. "Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after cd19 chimeric antigen receptor-modified t-cell therapy." *Blood* 2017; 130:2295-2306

Hegde M, Corder A, Chow K K, Mukherjee M, Ashoori A, Kew Y, Zhang Y J, Baskin D S, Merchant F A, Brawley V S, Byrd T T, Krebs S, Wu M F, Liu H, Heslop H E, Gottschalk S, Yvon E, Ahmed N. "Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred t cells in glioblastoma." *Mol Ther* 2013; 21:2087-2101

Heimberger A B, Crotty L E, Archer G E, Hess K R, Wikstrand C J, Friedman A H, Friedman H S, Bigner D D, Sampson J H. "Epidermal growth factor receptor viii peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors." *Clin Cancer Res* 2003; 9:4247-4254

Hinrichs C S, Restifo N P. "Reassessing target antigens for adoptive t-cell therapy." *Nat Biotechnol* 2013; 31:999-1008

Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies D B, Lau J S, Zhu G, Tamada K, Chen L. "Blockade of b7-h1 and pd-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity." *Cancer Res* 2005; 65:1089-1096

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, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel J M, Linette G P, Hogg D, Ottensmeier C H, Lebba 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." *N Engl J Med* 2010; 363:711-723

Hombach A A, Abken H. "Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the t cell antitumor response benefits from combined cd28-ox40 signalling." *Int J Cancer* 2011; 129:2935-2944

Hosonaga M, Arima Y, Sampetean O, Komura D, Koya I, Sasaki T, Sato E, Okano H, Kudoh J, Ishikawa S, Saya H, Ishikawa T. "Her2 heterogeneity is associated with poor survival in her2-positive breast cancer." *Int J Mol Sci* 2018; 19:

Howard S C, Jones D P, Pui C H. "The tumor lysis syndrome." *N Engl J Med* 2011; 364:1844-1854

Hu W, Zi Z, Jin Y, Li G, Shao K, Cai Q, Ma X, Wei F. "Crispr/cas9-mediated pd-1 disruption enhances human mesothelin-targeted car t cell effector functions."  
*Cancer Immunol Immunother* 2019; 68:365-377

Hugo W, Zaretsky J M, Sun L, Song C, Moreno B H, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, Pang J, Chmielowski B, Cherry G, Seja E, Lomeli S, Kong X, Kelley M C, Sosman J A, Johnson D B, Ribas A, Lo R S. "Genomic and transcriptomic features of response to anti-pd-1 therapy in metastatic melanoma."  
*Cell* 2016; 165:35-44

Humphrey P A, Wong A J, Vogelstein B, Zalutsky M R, Fuller G N, Archer G E, Friedman H S, Kwatra M M, Bigner S H, Bigner D D. "Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma."  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4207-4211

Irving B A, Weiss A. "The cytoplasmic domain of the t cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways."  
*Cell* 1991; 64:891-901

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. "Induced expression of pd-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death."  
*EMBO J* 1992; 11:3887-3895

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. "Involvement of pd-l1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by pd-l1 blockade."  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:12293-12297

Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. "Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and cd8+ cytotoxic-t-cell responses: Evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo."  
*Int J Cancer* 1996; 66:470-476

Jimbow K, Gomez P F, Toyofuku K, Chang D, Miura S, Tsujiya H, Park J S. "Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from tgn to stage i melanosome, late endosome, through gene transfection study."  
*Pigment Cell Res* 1997; 10:206-213

Johnson D B, Frampton G M, Rioth M J, Yusko E, Xu Y, Guo X, Ennis R C, Fabrizio D, Chalmers Z R, Greenbowe J, Ali S M, Balasubramanian S, Sun J X, He Y, Frederick D T, Puzanov I, Balko J M, Cates J M, Ross J S, Sanders C, Robins H, Shyr Y, Miller V A, Stephens P J, Sullivan R J, Sosman J A, Lovly C M. "Targeted next generation sequencing identifies markers of response to pd-1 blockade."  
*Cancer Immunol Res* 2016; 4:959-967

Johnson L A, Morgan R A, Dudley M E, Cassard L, Yang J C, Hughes M S, Kammula U S, Royal R E, Sherry R M, Wunderlich J R, Lee C C, Restifo N P, Schwarz S L, Cogdill A P, Bishop R J, Kim H, Brewer C C, Rudy S F, VanWaes C, Davis J L, Mathur A, Ripley R T, Nathan D A, Laurencot C M, Rosenberg S A. "Gene therapy with human and mouse t-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen."  
*Blood* 2009; 114:535-546

Jordan K R, Amaria R N, Ramirez O, Callihan E B, Gao D, Borakove M, Manthey E, Borges V F, McCarter M D. "Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients."  
*Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:1711-1722

Journe F, Id Boufker H, Van Kempen L, Galibert M D, Wiedig M, Sales F, Theunis A, Nonclercq D, Frau A, Laurent G, Awada A, Ghanem G. "Tyrrp1 mrna expression in melanoma metastases correlates with clinical outcome."  
*Br J Cancer* 2011; 105:1726-1732

June C H, Ledbetter J A, Gillespie M M, Lindsten T, Thompson C B. "T-cell proliferation involving the cd28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression."  
*Mol Cell Biol* 1987; 7:4472-4481

Juneja V R, McGuire K A, Manguso R T, LaFleur M W, Collins N, Haining W N, Freeman G J, Sharpe A H. "Pd-l1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits cd8 t cell cytotoxicity."  
*J Exp Med* 2017; 214:895-904

- Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin D J, Ferrone S. "Down-regulation of hla class i antigen-processing molecules in malignant melanoma: Association with disease progression."  
*Am J Pathol* 1999; 154:745-754
- Kalaora S, Wolf Y, Feferman T, Barnea E, Greenstein E, Reshef D, Tirosh I, Reuben A, Patkar S, Levy R, Quinkhardt J, Omokoko T, Qutob N, Golani O, Zhang J, Mao X, Song X, Bernatchez C, Haymaker C, Forget M A, Creasy C, Greenberg P, Carter B W, Cooper Z A, Rosenberg S A, Lotem M, Sahin U, Shakhhar G, Ruppin E, Wargo J A, Friedman N, Admon A, Samuels Y. "Combined analysis of antigen presentation and t-cell recognition reveals restricted immune responses in melanoma."  
*Cancer Discov* 2018; 8:1366-1375
- Kalialis L V, Drzewiecki K T, Klyver H. "Spontaneous regression of metastases from melanoma: Review of the literature."  
*Melanoma Res* 2009; 19:275-282
- Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, Fielding A K, Schuh A C, Ribera J M, Wei A, Dombret H, Foa R, Bassan R, Arslan O, Sanz M A, Bergeron J, Demirkan F, Lech-Maranda E, Rambaldi A, Thomas X, Horst H A, Bruggemann M, Klapper W, Wood B L, Fleishman A, Nagorsen D, Holland C, Zimmerman Z, Topp M S. "Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia."  
*N Engl J Med* 2017; 376:836-847
- 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."  
*Clin Cancer Res* 2019; 25:5890-5900
- Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado C H, Robbins P F, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli J R, Adema G J, Miki T, Rosenberg S A. "Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection."  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:6458-6462
- Keizer R J, Huitema A D, Schellens J H, Beijnen J H. "Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies."  
*Clin Pharmacokinet* 2010; 49:493-507
- Khalil D N, Postow M A, Ibrahim N, Ludwig D L, Cosaert J, Kambhampati S R, Tang S, Grebennik D, Kauh J S, Lenz H J, Flaherty K T, Hodi F S, Lawrence D P, Wolchok J D. "An open-label, dose-escalation phase i study of anti-tyrp1 monoclonal antibody imc-20d7s for patients with relapsed or refractory melanoma."  
*Clin Cancer Res* 2016; 22:5204-5210
- Khong H T, Wang Q J, Rosenberg S A. "Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: Tumor escape by antigen loss and loss of mhc expression."  
*J Immunother* 2004; 27:184-190
- Kim M S, Ma J S, Yun H, Cao Y, Kim J Y, Chi V, Wang D, Woods A, Sherwood L, Caballero D, Gonzalez J, Schultz P G, Young T S, Kim C H. "Redirection of genetically engineered car-t cells using bifunctional small molecules."  
*J Am Chem Soc* 2015; 137:2832-2835
- Kluger H M, DiVito K, Berger A J, Halaban R, Ariyan S, Camp R L, Rimm D L. "Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma -- a large cohort tissue microarray study."  
*Melanoma Res* 2004; 14:207-210
- Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, Grassmann S, Henkel J, Castoldi R, Zeng Y, Chmielewski M, Schmollinger 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."  
*J Natl Cancer Inst* 2015; 107:364
- Kochenderfer J N, Dudley M E, Carpenter R O, Kassim S H, Rose J J, Telford W G, Hakim F T, Halverson D C, Fowler D H, Hardy N M, Mato A R, Hickstein D D, Gea-Banacloche J C, Pavletic S Z, Sportes C, Maric I, Feldman S A, Hansen B G, Wilder J S, Blacklock-Schuver B, Jena B, Bishop M R, Gress R E, Rosenberg S A. "Donor-derived cd19-targeted t cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation."  
*Blood* 2013; 122:4129-4139

Kochenderfer J N, Dudley M E, Kassim S H, Somerville R P, Carpenter R O, Stetler-Stevenson M, 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, 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." *J Clin Oncol* 2015; 33:540-549

Kowolik C M, Topp M S, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, Smith D D, Forman S J, Jensen M C, Cooper L J. "Cd28 costimulation provided through a cd19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred t cells." *Cancer Res* 2006; 66:10995-11004

Krug C, Birkholz K, Paulus A, Schwenkert M, Schmidt P, Hoffmann N, Hombach A, Fey G, Abken H, Schuler G, Schuler-Thurner B, Dorrie J, Schaft N. "Stability and activity of mcsp-specific chimeric antigen receptors (cars) depend on the scfv antigen-binding domain and the protein backbone." *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:1623-1635

Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff A M, Chng W J, Campana D. "T lymphocytes expressing a cd16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing." *Cancer Res* 2014; 74:93-103

Lamers C H, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, Vulto A, den Bakker M, Oosterwijk E, Debets R, Gratama J W. "Treatment of metastatic renal cell carcinoma with caix car-engineered t cells: Clinical evaluation and management of on-target toxicity." *Mol Ther* 2013; 21:904-912

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J J, Rutkowski P, Lao C D, Cowey C L, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci P F, Smylie M, Hogg D, Hill A, Marquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schoffski P, Carlino M S, Lebbe C, McArthur G, Ascierto P A, Daniels G A, Long G V, Bastholt L, Rizzo J I, Balogh A, Moshyk A, Hodi F S, Wolchok J D. "Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma." *N Engl J Med* 2019; 381:1535-1546

LeBien T W, Tedder T F. "B lymphocytes: How they develop and function." *Blood* 2008; 112:1570-1580

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, Tschernia 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." *Lancet* 2015; 385:517-528

Legg J, Jensen U B, Broad S, Leigh I, Watt F M. "Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis." *Development* 2003; 130:6049-6063

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2019). "Diagnostik, therapie und nachsorge des melanoms." 2019, Langversion 3.1

Lippitz B E. "Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review." *Lancet Oncol* 2013; 14:e218-228

Liu X, Jiang S, Fang C, Yang S, Olalere D, Pequignot E C, Cogdill A P, Li N, Ramones M, Granda B, Zhou L, Loew A, Young R M, June C H, Zhao Y. "Affinity-tuned erbb2 or egfr chimeric antigen receptor t cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice." *Cancer Res* 2015; 75:3596-3607

Lohmueller J J, Ham J D, Kvorjak M, Finn O J. "Msa2 affinity-enhanced biotin-binding car t cells for universal tumor targeting." *Oncoimmunology* 2017; 7:e1368604

Long A H, Haso W M, Shern J F, Wanhainen K M, Murgai M, Ingaramo M, Smith J P, Walker A J, Kohler M E, Venkateshwara V R, Kaplan R N, Patterson G H, Fry T J, Orentas R J, Mackall C L. "4-1bb costimulation ameliorates t cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors." *Nat Med* 2015; 21:581-590

Ma J S, Kim J Y, Kazane S A, Choi S H, 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."  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E450-458

Maio M. "Melanoma as a model tumour for immuno-oncology."  
*Ann Oncol* 2012; 23 Suppl 8:viii10-14

Marini B L, Sun Y, Burke P W, Perissinotti A J. "Successful reintroduction of blinatumomab in a patient with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia following grade 4 cytokine release syndrome."  
*J Oncol Pharm Pract* 2018; 24:67-73

Maude S L, Frey N, Shaw P A, Aplenc R, Barrett D M, Bunin N J, Chew A, Gonzalez V E, Zheng Z, Lacey S F, Mahnke Y D, Melenhorst J J, Rheingold S R, Shen A, Teachey D T, Levine B L, June C H, Porter D L, Grupp S A. "Chimeric antigen receptor t cells for sustained remissions in leukemia."  
*N Engl J Med* 2014; 371:1507-1517

Maude S L, Teachey D T, Porter D L, Grupp S A. "Cd19-targeted chimeric antigen receptor t-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia."  
*Blood* 2015; 125:4017-4023

Maus M V, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Riviere I, Merghoub T, Wolchok J, Renner C, Sadelain M. "An mhc-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires tcr-like affinity to maintain antigen specificity."  
*Mol Ther Oncolytics* 2016; 3:1-9

McGowan E, Lin Q, Ma G, Yin H, Chen S, Lin Y. "Pd-1 disrupted car-t cells in the treatment of solid tumors: Promises and challenges."  
*Biomed Pharmacother* 2020; 121:109625

Meeks M W, Hammami M B, Robbins K J, Cheng K L, Lionberger J M. "Tumor lysis syndrome and metastatic melanoma."  
*Med Oncol* 2016; 33:134

Milone M C, Fish J D, Carpenito C, Carroll R G, Binder G K, Teachey D, Samanta M, Lakhai M, Gloss B, Danet-Desnoyers G, Campana D, Riley J L, Grupp S A, June C H. "Chimeric receptors containing cd137 signal transduction domains mediate enhanced survival of t cells and increased antileukemic efficacy in vivo."  
*Mol Ther* 2009; 17:1453-1464

Mittelman A, Chen Z J, Kageshita T, Yang H, Yamada M, Baskind P, Goldberg N, Puccio C, Ahmed T, Arlin Z, et al. "Active specific immunotherapy in patients with melanoma. A clinical trial with mouse antiidiotypic monoclonal antibodies elicited with syngeneic anti-high-molecular-weight-melanoma-associated antigen monoclonal antibodies."  
*J Clin Invest* 1990; 86:2136-2144

Mock D M, Malik M I. "Distribution of biotin in human plasma: Most of the biotin is not bound to protein."  
*Am J Clin Nutr* 1992; 56:427-432

Morgan R A, Dudley M E, Wunderlich J R, Hughes M S, Yang J C, Sherry R M, Royal R E, Topalian S L, Kammula U S, Restifo N P, Zheng Z, Nahvi A, de Vries C R, Rogers-Freezer L J, Mavroukakis S A, Rosenberg S A. "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes."  
*Science* 2006; 314:126-129

Morgan R A, Yang J C, Kitano M, Dudley M E, Laurencot C M, Rosenberg S A. "Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing erbb2."  
*Mol Ther* 2010; 18:843-851

Morris E C, Stauss H J. "Optimizing t-cell receptor gene therapy for hematologic malignancies."  
*Blood* 2016; 127:3305-3311

Mueller D L, Jenkins M K, Schwartz R H. "Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of t cell antigen receptor occupancy."  
*Annu Rev Immunol* 1989; 7:445-480

Nagarsheth N, Wicha M S, Zou W. "Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy."

*Nat Rev Immunol* 2017; 17:559-572

Neelapu S S, Locke F L, Bartlett N L, Lekakis L J, Miklos D B, Jacobson C A, Braunschweig I, Oluwole O O, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman J M, Stiff P J, Friedberg J W, Flinn I W, Goy A, Hill B T, Smith M R, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro J E, Westin J R, Chavez J C, Ghobadi A, Komanduri K V, Levy R, Jacobsen E D, Witzig T E, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J, Go W Y. "Axicabtagene ciloleucel car t-cell therapy in refractory large b-cell lymphoma."

*N Engl J Med* 2017; 377:2531-2544

Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A. "FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities."

*Trends Immunol* 2015; 36:325-336

Noguchi T, Ward J P, Gubin M M, Arthur C D, Lee S H, Hundal J, Selby M J, Graziano R F, Mardis E R, Korman A J, Schreiber R D. "Temporally distinct pd-1 expression by tumor and host cells contributes to immune escape."

*Cancer Immunol Res* 2017; 5:106-117

Parkhurst M R, Yang J C, Langan R C, Dudley M E, Nathan D A, Feldman S A, Davis J L, Morgan R A, Merino M J, Sherry R M, Hughes M S, Kammula U S, Phan G Q, Lim R M, Wank S A, Restifo N P, Robbins P F, Laurencot C M, Rosenberg S A. "T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis."

*Mol Ther* 2011; 19:620-626

Phan G Q, Rosenberg S A. "Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: The potential and promise of cancer immunotherapy."

*Cancer Control* 2013; 20:289-297

Porter D L, Levine B L, Kalos M, Bagg A, June C H. "Chimeric antigen receptor-modified t cells in chronic lymphoid leukemia."

*N Engl J Med* 2011; 365:725-733

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."

*Clin Cancer Res* 2015; 21:4035-4039

Rafiq S, Hackett C S, Brentjens R J. "Engineering strategies to overcome the current roadblocks in car t cell therapy."

*Nat Rev Clin Oncol* 2019;

Ramos C A, Rouce R, Robertson C S, Reyna A, Narala N, Vyas G, Mehta B, Zhang H, Dakhova O, Carrum G, Kamble R T, Gee A P, Mei Z, Wu M F, Liu H, Grilley B, Rooney C M, Heslop H E, Brenner M K, Savoldo B, Dotti G. "In vivo fate and activity of second- versus third-generation cd19-specific car-t cells in b cell non-hodgkin's lymphomas."

*Mol Ther* 2018; 26:2727-2737

Rapoport A P, Stadtmauer E A, Binder-Scholl G K, Goloubeva O, Vogl D T, Lacey S F, Badros A Z, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha S K, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer J E, Bennett A D, Gerry A B, Pumphrey N J, Williams D, Tayton-Martin H K, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel D L, Levine B L, Jakobsen B K, Kalos M, June C H. "Ny-eso-1-specific tcr-engineered t cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma."

*Nat Med* 2015; 21:914-921

Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen K P, Endres S, Anz D, Kobold S. "C-c chemokine receptor type-4 transduction of t cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive t cell transfer."

*Oncoimmunology* 2016; 5:e1105428

Rataj F, Jacobi S J, Stoiber S, Asang F, Ogonek J, Tokarew N, Cadilha B L, van Puijenbroek E, Heise C, Duewell P, Endres S, Klein C, Kobold S. "High-affinity cd16-polymorphism and fc-engineered antibodies enable activity of cd16-chimeric antigen receptor-modified t cells for cancer therapy."

*Br J Cancer* 2018;

Rath T, Kuo T T, Baker K, Qiao S W, Kobayashi K, Yoshida M, Roopenian D, Fiebiger E, Lencer W I, Blumberg R S. "The immunologic functions of the neonatal fc receptor for igg."  
*J Clin Immunol* 2013; 33 Suppl 1:S9-17

Restifo N P, Marincola F M, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli J R, Rosenberg S A. "Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy."  
*J Natl Cancer Inst* 1996; 88:100-108

Robbins P F, Dudley M E, Wunderlich J, El-Gamil M, Li Y F, Zhou J, Huang J, Powell D J, Jr., Rosenberg S A. "Cutting edge: Persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy."  
*J Immunol* 2004; 173:7125-7130

Robbins P F, El-Gamil M, Li Y F, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg S A. "A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes."  
*J Exp Med* 1996; 183:1185-1192

Robert Koch Institute (ed.) and the Association of Population-based Cancer Registries in Germany (ed). (2018). "Cancer in germany 2013/2014."  
Berlin, 2018, 11th edition

Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob J J, Mortier L, Daud A, Carlino M S, McNeil C M, Lotem M, Larkin J M G, Lorigan P, Neyns B, Blank C U, Petrella T M, Hamid O, Su S C, Krepler C, Ibrahim N, Long G V. "Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (keynote-006): Post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study."  
*Lancet Oncol* 2019; 20:1239-1251

Rosenberg S A, Packard B S, Aebersold P M, Solomon D, Topalian S L, Toy S T, Simon P, Lotze M T, Yang J C, Seipp C A, et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report."  
*N Engl J Med* 1988; 319:1676-1680

Rosenberg S A, Yang J C, Sherry R M, Kammula U S, Hughes M S, Phan G Q, Citrin D E, Restifo N P, Robbins P F, Wunderlich J R, Morton K E, Laurencot C M, Steinberg S M, White D E, Dudley M E. "Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using t-cell transfer immunotherapy."  
*Clin Cancer Res* 2011; 17:4550-4557

Ruella M, Barrett D M, Kenderian S S, Shestova O, Hofmann T J, Perazzelli J, Klichinsky M, Aikawa V, Nazimuddin F, Kozlowski M, Scholler J, Lacey S F, Melenhorst J J, Morrisette J J, Christian D A, Hunter C A, Kalos M, Porter D L, June C H, Grupp S A, Gill S. "Dual cd19 and cd123 targeting prevents antigen-loss relapses after cd19-directed immunotherapies."  
*J Clin Invest* 2016; 126:3814-3826

Rupp L J, Schumann K, Roybal K T, Gate R E, Ye C J, Lim W A, Marson A. "Crispr/cas9-mediated pd-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor t cells."  
*Sci Rep* 2017; 7:737

Sade-Feldman M, Jiao Y J, Chen J H, Rooney M S, Barzily-Rokni M, Eliane J P, Bjorgaard S L, Hammond M R, Vitzthum H, Blackmon S M, Frederick D T, Hazar-Rethinam M, Nadres B A, Van Severter E E, Shukla S A, Yizhak K, Ray J P, Rosebrock D, Livitz D, Adalsteinsson V, Getz G, Duncan L M, Li B, Corcoran R B, Lawrence D P, Stemmer-Rachamimov A, Boland G M, Landau D A, Flaherty K T, Sullivan R J, Hacohen N. "Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation."  
*Nat Commun* 2017; 8:1136

Sampson J H, Heimberger A B, Archer G E, Aldape K D, Friedman A H, Friedman H S, Gilbert M R, Herndon J E, 2nd, McLendon R E, Mitchell D A, Reardon D A, Sawaya R, Schmittling R J, Shi W, Vredenburgh J J, Bigner D D. "Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant iii peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma."  
*J Clin Oncol* 2010; 28:4722-4729

Schatton T, Murphy G F, Frank N Y, Yamaura K, Waaga-Gasser A M, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan L M, Weishaupt C, Fuhlbrigge R C, Kupper T S, Sayegh M H, Frank M H. "Identification of cells initiating human melanomas."  
*Nature* 2008; 451:345-349

Schatton T, Schutte U, Frank N Y, Zhan Q, Hoerning A, Robles S C, Zhou J, Hodi F S, Spagnoli G C, Murphy G F, Frank M H. "Modulation of t-cell activation by malignant melanoma initiating cells." *Cancer Res* 2010; 70:697-708

Schumacher T N, Schreiber R D. "Neoantigens in cancer immunotherapy." *Science* 2015; 348:69-74

Shi D, Shi Y, Kaseb A O, Qi X, Zhang Y, Chi J, Lu Q, Gao H, Jiang H, Wang H, Yuan D, Ma H, Wang H, Li Z, Zhai B. "Chimeric antigen receptor-glypican-3 t-cell therapy for advanced hepatocellular carcinoma: Results of phase 1 trials." *Clin Cancer Res* 2020;

Simon B, Harrer D C, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, Uslu U. "The sirna-mediated downregulation of pd-1 alone or simultaneously with ctla-4 shows enhanced in vitro car-t-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma." *Exp Dermatol* 2018; 27:769-778

Simon B, Harrer D C, Schuler-Thurner B, Schuler G, Uslu U. "Arming t cells with a gp100-specific tcr and a cspg4-specific car using combined DNA- and rna-based receptor transfer." *Cancers (Basel)* 2019; 11:

Slaney C Y, Kershaw M H, Darcy P K. "Trafficking of t cells into tumors." *Cancer Res* 2014; 74:7168-7174

Sousa J F, Espreafico E M. "Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets." *BMC Cancer* 2008; 8:19

Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M. "Intratumoral foxp3+vegfr2+ regulatory t cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer." *Clin Immunol* 2013; 146:26-33

Takechi Y, Hara I, Naftzger C, Xu Y, Houghton A N. "A melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy." *Clin Cancer Res* 1996; 2:1837-1842

Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, Davila E. "Redirecting gene-modified t cells toward various cancer types using tagged antibodies." *Clin Cancer Res* 2012; 18:6436-6445

Tas F. "Metastatic behavior in melanoma: Timing, pattern, survival, and influencing factors." *J Oncol* 2012; 2012:647684

Taube J M, Anders R A, Young G D, Xu H, Sharma R, McMiller T L, Chen S, Klein A P, Pardoll D M, Topalian S L, Chen L. "Colocalization of inflammatory response with b7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape." *Sci Transl Med* 2012; 4:127ra137

Tchou J, Zhao Y, Levine B L, Zhang P J, Davis M M, Melenhorst J J, Kulikovskaya I, Brennan A L, Liu X, Lacey S F, Posey A D, Jr., Williams A D, So A, Conejo-Garcia J R, Plesa G, Young R M, McGettigan S, Campbell J, Pierce R H, Matro J M, DeMichele A M, Clark A S, Cooper L J, Schuchter L M, Vonderheide R H, June C H. "Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (car) t cells in metastatic breast cancer." *Cancer Immunol Res* 2017; 5:1152-1161

Teachey D T, Lacey S F, Shaw P A, Melenhorst J J, Maude S L, Frey N, Pequignot E, Gonzalez V E, Chen F, Finklestein J, Barrett D M, Weiss S L, Fitzgerald J C, Berg R A, Aplenc R, Callahan C, Rheingold S R, Zheng Z, Rose-John S, White J C, Nazimuddin F, Wertheim G, Levine B L, June C H, Porter D L, Grupp S A. "Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor t-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Discov* 2016; 6:664-679

Thistlethwaite F C, Gilham D E, Guest R D, Rothwell D G, Pillai M, Burt D J, Byatte A J, Kirillova N, Valle J W, Sharma S K, Chester K A, Westwood N B, Halford S E R, Nabarro S, Wan S, Austin E, Hawkins R E. "The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (ceacam5)-specific car t cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity." *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66:1425-1436

Topp M S, Gokbuget N, Stein A S, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou R C, Dombret H, Fielding A K, Heffner L, Larson R A, Neumann S, Foa R, Litzow M, Ribera J M, Rambaldi A, Schiller G, Bruggemann M, Horst H A, Holland C, Jia C, Maniar T, Huber B, Nagorsen D, Forman S J, Kantarjian H M. "Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory b-precursor acute lymphoblastic leukaemia: A multicentre, single-arm, phase 2 study." *Lancet Oncol* 2015; 16:57-66

Turtle C J, Hanafi L A, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, Hawkins R, Chaney C, Cherian S, Chen X, Soma L, Wood B, Li D, Heimfeld S, Riddell S R, Maloney D G. "Immunotherapy of non-hodgkin's lymphoma with a defined ratio of cd8+ and cd4+ cd19-specific chimeric antigen receptor-modified t cells." *Sci Transl Med* 2016; 8:355ra116

Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn R C, Gavin B P, Kelderman S, Yu J, Scholler N, Powell D J, Jr. "A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel t-cell antigen receptor." *Cancer Res* 2012; 72:1844-1852

Van Allen E M, Miao D, Schilling B, Shukla S A, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen M H G, Goldinger S M, Utikal J, Hassel J C, Weide B, Kaehler K C, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu C J, Schadendorf D, Garraway L A. "Genomic correlates of response to ctla-4 blockade in metastatic melanoma." *Science* 2015; 350:207-211

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic t lymphocytes on a human melanoma." *Science* 1991; 254:1643-1647

van Elsas A, Hurwitz A A, Allison J P. "Combination immunotherapy of b16 melanoma using anti-cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 (ctla-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (gm-csf)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation." *J Exp Med* 1999; 190:355-366

van Houdt I S, Sluijter B J, Moesbergen L M, Vos W M, de Gruijl T D, Molenkamp B G, van den Eertwegh A J, Hooijberg E, van Leeuwen P A, Meijer C J, Oudejans J J. "Favorable outcome in clinically stage ii melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating t-lymphocytes and preserved mhc class i antigen expression." *Int J Cancer* 2008; 123:609-615

Velasquez M P, Szoor A, Vaidya A, Thakkar A, Nguyen P, Wu M F, Liu H, Gottschalk S. "Cd28 and 41bb costimulation enhances the effector function of cd19-specific engager t cells." *Cancer Immunol Res* 2017; 5:860-870

Walia V, Mu E W, Lin J C, Samuels Y. "Delving into somatic variation in sporadic melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; 25:155-170

Wang P, Nakamura K, Mimura Y, Takeo K, Tanaka T, Fujimoto M. "Immune response to different doses of a hapten of fluorescein isothiocyanate analyzed by two-dimensional affinity electrophoresis." *Electrophoresis* 1996; 17:1273-1279

Wang X, Chang W C, Wong C W, Colcher D, Sherman M, Ostberg J R, Forman S J, Riddell S R, Jensen M C. "A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells." *Blood* 2011; 118:1255-1263

Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, Freeman G J, Krogsgaard M, Riley J L. "Strength of pd-1 signaling differentially affects t-cell effector functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E2480-2489

Wherry E J. "T cell exhaustion." *Nat Immunol* 2011; 12:492-499

Wikstrand C J, Hale L P, Batra S K, Hill M L, Humphrey P A, Kurpad S N, McLendon R E, Moscatello D, Pegram C N, Reist C J, et al. "Monoclonal antibodies against egfrviii are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas." *Cancer Res* 1995; 55:3140-3148

- Wilson B S, Ruberto G, Ferrone S. "Immunochemical characterization of a human high molecular weight--melanoma associated antigen identified with monoclonal antibodies."  
*Cancer Immunol Immunother* 1983; 14:196-201
- Wittman V P, Woodburn D, Nguyen T, Neethling F A, Wright S, Weidanz J A. "Antibody targeting to a class i mhc-peptide epitope promotes tumor cell death."  
*J Immunol* 2006; 177:4187-4195
- Woo S R, Turnis M E, Goldberg M V, Bankoti J, Selby M, Nirschl C J, Bettini M L, Gravano D M, Vogel P, Liu C L, Tansombatvisit S, Grosso J F, Netto G, Smeltzer M P, Chaux A, Utz P J, Workman C J, Pardoll D M, Korman A J, Drake C G, Vignali D A. "Immune inhibitory molecules lag-3 and pd-1 synergistically regulate t-cell function to promote tumoral immune escape."  
*Cancer Res* 2012; 72:917-927
- Wu X, Shi B, Zhang J, Shi Z, Di S, Fan M, Gao H, Wang H, Gu J, Jiang H, Li Z. "A fusion receptor as a safety switch, detection, and purification biomarker for adoptive transferred t cells."  
*Mol Ther* 2017; 25:2270-2279
- Yang J, Price M A, Li G Y, Bar-Eli M, Salgia R, Jagadeeswaran R, Carlson J H, Ferrone S, Turley E A, McCarthy J B. "Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition."  
*Cancer Res* 2009; 69:7538-7547
- Yang J, Price M A, Neudauer C L, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson M A, McCarthy J B. "Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances fak and erk activation by distinct mechanisms."  
*J Cell Biol* 2004; 165:881-891
- Ying Z, He T, Wang X, Zheng W, Lin N, Tu M, Xie Y, Ping L, Zhang C, Liu W, Deng L, Qi F, Ding Y, Lu X A, Song Y, Zhu J. "Parallel comparison of 4-1bb or cd28 co-stimulated cd19-targeted car-t cells for b cell non-hodgkin's lymphoma."  
*Mol Ther Oncolytics* 2019; 15:60-68
- Yuraszeck T, Kasichayanula S, Benjamin J E. "Translation and clinical development of bispecific t-cell engaging antibodies for cancer treatment."  
*Clin Pharmacol Ther* 2017; 101:634-645
- Zah E, Lin M Y, Silva-Benedict A, Jensen M C, Chen Y Y. "T cells expressing cd19/cd20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant b cells."  
*Cancer Immunol Res* 2016; 4:498-508
- Zhou J, Dudley M E, Rosenberg S A, Robbins P F. "Selective growth, in vitro and in vivo, of individual t cell clones from tumor-infiltrating lymphocytes obtained from patients with melanoma."  
*J Immunol* 2004; 173:7622-7629
- Zhu M, Wu B, Brandl C, Johnson J, Wolf A, Chow A, Doshi S. "Blinatumomab, a bispecific t-cell engager (bite((r))) for cd-19 targeted cancer immunotherapy: Clinical pharmacology and its implications."  
*Clin Pharmacokinet* 2016; 55:1271-1288

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
BiAk	Bispezifischer Antikörper
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
CAR	<i>Chimeric-antigen-receptor</i>
CRS	<i>Cytokine-release-syndrom</i>
CSPG4	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan-4</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ddH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E3	Vollständiger E3-Fusionsrezeptor
E3del	Verkürzter E3-Fusionsrezeptor
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epithelial growth factor receptor variant III</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcγR III	Fc-γ-Rezeptor III
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCSP	<i>Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor-cells</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
Plat-E	Platinum-E
Plat-A	Platinum-A
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAR	<i>Synthetic agonistic receptor</i>
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TYRP1	<i>Tyrosinase related protein 1</i>
UT	Untransduziert

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Stefan Endres und Prof. Sebastian Kobold für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in der Abteilung für Klinische Pharmakologie durchzuführen. Insbesondere bedanke ich mich dabei für das Vertrauen meines Doktorvaters Prof. Sebastian Kobold, welches mir die eigenverantwortliche Forschung an faszinierenden Projekten ermöglichte und wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Felicitas Stein und Richard Klaus bedanken, die mich durch ihre Vorarbeiten und wissenschaftliche Betreuung enorm unterstützt haben.

Zudem bedanke ich mich bei der Firma Roche und insbesondere bei Dr. Christian Klein und Dr. Martina Geiger für die Bereitstellung der Antikörper und eine produktive Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie, die mir gerade am Anfang meiner Arbeit geduldig geholfen haben und mir immer wieder auf verschiedenste Weise zur Seite standen. Ein besonderer Dank richtet sich dabei auch an die Doktoranden meines Jahrgangs, deren moralische Unterstützung unbezahlbar war und die die gemeinsame Zeit unvergesslich gemacht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir durch stetigen Rückhalt und fortlaufende Inspiration das Leben bereichern.

## Eidesstattliche Versicherung

Keyl, Julius Johannes

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***Synthetic agonistic receptor T-Zellen in Kombination mit den bispezifischen Antikörpern anti-EGFRvIII x anti-TYRP1 und anti-EGFRvIII x anti-MCSP zur Behandlung maligner Melanomzellen *in vitro****

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.

Essen, 24.11.2021

---

Ort, Datum

Julius Keyl

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand