

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**Generierung eines synthetischen agonistischen Rezeptors
für die Transduktion muriner T-Zellen
zur Kombination mit tetravalenten bispezifischen Antikörpern
im Zellkulturmodell einer Brustkrebs-Zelllinie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mathias Kurzay

aus Crailsheim

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Nadia Harbeck

Univ. Prof. Dr. med. Lars Lindner

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter:

Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

30.09.2021

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prognose und Therapie von Tumorerkrankungen.....	1
1.2	Immunsystem-Tumor-Interaktionen	1
1.2.1	Immunsuppression im Tumormilieu.....	2
1.3	Krebsimmuntherapie.....	3
1.3.1	Antikörperbasierte Immuntherapie	3
1.3.1.1	Monospezifische Antikörper.....	4
1.3.1.2	Bispezifische Antikörper	4
1.3.1.3	Limitierungen und Vorteile mono- und bispezifischer Antikörper.....	5
1.3.2	Zellbasierte Immuntherapie	6
1.3.2.1	Adoptiver T-Zelltransfer.....	7
1.3.2.2	Chimärer-Antigen-Rezeptor-modifizierte T-Zellen.....	7
1.4	Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zelltransfer mit synthetischen agonistischen Rezeptor modifizierten T-Zellen und bispezifischem Antikörper	8
1.5	Fragestellung.....	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Geräte.....	11
2.2	Reagenzien und Chemikalien	11
2.3	Kommerzielle Kits	12
2.4	Zellkulturmaterial	12
2.4.1	Zelllinien.....	12
2.4.2	Zellkulturmedium	13
2.4.3	Wachstumsfaktoren und Zytokine	13
2.5	Puffer und Lösungen.....	13
2.6	Antikörper	14
2.6.1	Durchflusszytometrie.....	14
2.6.2	Bispezifische Antikörper	14
2.7	Synthetische agonistische Rezeptoren	14
2.8	Primer.....	15
2.9	Software	15
2.10	Molekularbiologische Methoden	15
2.10.1	RNA Isolation und Reverse Transkription.....	15
2.10.2	<i>Overlap Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16
2.10.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.10.4	Herstellung kompetenter DH5α <i>E. coli</i> Bakterien	18
2.10.5	Plasmidgewinnung.....	18

2.10.5.1	Digestion	18
2.10.5.2	Ligation	18
2.10.6	Retrovirale Transduktion primärer muriner T-Zellen	19
2.10.6.1	Herstellung des Retrovirus	19
2.10.6.2	T-Zell-Transduktion	19
2.11	Immunologische Methoden	20
2.11.1	Durchflusszytometrie	20
2.11.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	20
2.12	Zellkultur	20
2.12.1	Zellkulturarbeiten	20
2.12.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	20
2.12.3	Isolation muriner Splenozyten	21
2.13	Experimente	21
2.13.1	SAR-T-Zellstimulation und Bestimmung der IFN- γ -Konzentration	21
2.13.2	Konfokalmikroskopie zur Bestimmung von Zellclustern	21
2.13.3	Tumorlyse in Echtzeit mittels Impedanzmessung	22
2.14	Tierhaltung	22
2.15	Statistik	23
3	Ergebnisse	25
3.1	SAR-Konstruktion	25
3.1.1	Klonierung	25
3.1.2	Expression des SAR auf T-Zellen	25
3.2	SAR-T-Zellstimulation	26
3.2.1	Stimulation mit monospezifischem Antikörper	26
3.2.2	Stimulation mit bispezifischem Antikörper	28
3.2.3	Simulation mit bispezifischem Antikörper und EpCAM	28
3.2.4	Stimulation mit bispezifischem Antikörper in Kokultur mit EpCAM ⁺ Brustkrebszellen	30
3.3	Clusterbildung aktivierter SAR-T-Zellen	31
3.4	Tumorlyse	32
4	Diskussion	33
4.1	EpCAM als Zielantigen in der Immuntherapie	33
4.2	SAR-Design	34
4.2.1	EGFRvIII und Cripto 1 als geeignete SAR-Markerantigene	34
4.2.2	Ko-Stimulatoren im SAR-Design	36
4.2.3	Die <i>Non-signaling-hinge</i> -Region im SAR-Design	38
4.3	Aktivierung der SAR-T-Zellen durch monospezifische Antikörper	39
4.4	Aktivierung der SAR-T-Zellen durch bispezifische Antikörper	40

4.5	SAR-T-Zell-Tumor-Interaktion	41
4.6	Steuerung der zellbasierten Immuntherapie mittels modularen Adaptermolekülen	44
4.7	Ausblick	45
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Anhang.....	63
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	63
7.2	Publikationen	65
7.2.1	Originalpublikationen	65
7.2.2	Poster-Präsentationen.....	65
7.3	Danksagung	67

1 Einleitung

1.1 Prognose und Therapie von Tumorerkrankungen

In Deutschland stellten Krebserkrankungen im Jahr 2017 die zweithäufigste Todesursache (24,4 % aller Todesfälle) nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (37,0 % aller Todesfälle) dar (Statistisches Bundesamt 2017). In den nächsten zwei Jahrzehnten wird vor allem in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Lohnniveau ein Anstieg der Krebsinzidenz um das 1,5-fache erwartet (Bray et al. 2012, Stewart & Wild 2014). Obwohl sich die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahren erheblich verbessert haben, werden die meisten Krebstodesfälle durch therapierefraktäre Metastasen verursacht (Langley & Fidler 2007). Die drei Säulen der Krebstherapie – die chirurgische Intervention, die Radiotherapie und die zytostatische Chemotherapie – stoßen weiterhin an ihre Grenzen.

Die zytostatische Chemotherapie bildet das Rückgrat der Krebstherapie. Die therapeutische Breite ist jedoch schmal, das Nebenwirkungsprofil belastend für den Patienten und die Resistenzmechanismen von Tumorzellen reichlich. Zudem steigt nach einer Chemotherapie das Risiko an einem Zweitmalignom zu erkranken. Tumore weisen unterschiedliche Zellpopulationen auf, die genetisch instabil sind und sich hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, Antigenität, Chemotherapeutikaresistenzen und ihres Metastasierungsverhaltens unterscheiden (Fidler 1990). Wenige in Seneszenz verweilende Tumorzellen können noch nach Jahren zu Rezidiven führen. Diese Eigenschaften und die Limitierungen der bisherigen Therapien haben unter anderem zur Entwicklung neuer Krebstherapien geführt. Die personalisierte Krebsimmuntherapie hat sich als vierte Säule der Krebstherapie etabliert. Sie adressiert bestimmte Merkmale und Eigenschaften von Tumorzellen. Diese werden nicht direkt zerstört, sondern das Immunsystem wird gezielt gegen Tumorzellen rekrutiert und eine spezifische Immunantwort induziert (Vanneman & Dranoff 2012). In der Fachzeitschrift *Science* wurde die Krebsimmuntherapie im Jahr 2013 als Durchbruch des Jahres gefeiert (Couzin-Frankel 2013). In der Regel ist jedoch keine der genannten Säulen für sich allein ausreichend, um eine vollständige Heilung zu erreichen, sodass Kombinationstherapien Gegenstand intensiver Forschungen sind.

1.2 Immunsystem-Tumor-Interaktionen

Bei der Zellteilung kommt es häufig, ausgelöst durch kanzerogene Substanzen, Strahlung, chronische Entzündung, Virusbefall oder auch spontan zu Schäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Mutationen treten millionenfach im Körper auf, bleiben aber in den allermeisten Fällen dank verschiedener intrinsischer und extrinsischer zellulärer Kontrollmechanismen klinisch inapparent. Bei aberranter Zellteilung greifen intrinsische Mechanismen, die eine DNA-Reparatur einleiten oder bei

nicht reparablen Schäden die Seneszenz oder Apoptose der betroffenen Zellen induzieren (Lowe et al. 2004). Versagen die intrinsischen Kontrollmechanismen, stehen den entarteten Zellen diverse extrinsische Kontrollmechanismen gegenüber.

Eine wichtige extrinsische Kontrolle findet durch das Immunsystem statt. Mutierte Zellen werden durch bestimmte Effektorzellen erkannt und abgebaut. Das Immunsystem verhindert dadurch ein Fortschreiten zu einer Krebserkrankung. Diese These wurde 1957 durch F. Macfarlane Burnet und 1959 durch Lewis Thomas unter dem Begriff *immunosurveillance* postuliert (Burnet 1957, Thomas & Lawrence 1959).

Die *immunosurveillance* ist nur ein Teil der hochkomplexen Immunsystem-Tumor-Interaktion und wird im Modell des *tumor immunoediting* als erste von drei Phasen als Eliminierung bezeichnet (Dunn et al. 2002). Die drei Phasen bestehen aus Eliminierung, Equilibrium und *escape*. Das Immunsystem erkennt mutierte Zellen und baut diese ab (Eliminierung). Die Immunsystem-Tumor-Interaktion befindet sich im Gleichgewicht, wenn Tumorzellen zwar nicht vollständig eliminiert, deren Wachstum aber kontrolliert werden kann (Equilibrium). Unter diesem hohen Selektionsdruck gelingt es einzelnen Tumorzellen durch diverse Mechanismen dem Immunsystem zu entgehen, was zur Progression bis hin zur Manifestation der Krebserkrankung führt (*escape*) (Dunn et al. 2004a, Dunn et al. 2004b).

1.2.1 Immunsuppression im Tumormilieu

Tumoren weisen zahlreiche zelluläre, zellgebundene oder über lösliche Faktoren vermittelte Mechanismen auf, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Sie exprimieren überwiegend Differenzierungsantigene, die ebenfalls im gesunden Gewebe vorkommen und nur selten tumorspezifische Neoantigene. Auf diese Weise präsentiert sich die Tumorzelle als körpereigen und wird vom Immunsystem toleriert (Sotomayor et al. 1996). Zudem unterliegen Tumorzellen einer enormen genetischen Instabilität (Lengauer et al. 1998). Dies führt zum Verlust der Humanen Leukozytenantigene (HLA) und einer fehlregulierten Antigenprozessierung bzw. -präsentation und folglich zum Entzug vor dem Immunsystem (Algarra et al. 2000, Marincola et al. 2000).

Darüber hinaus interagieren Tumorzellen direkt über zellgebundene Oberflächenmoleküle mit Immunzellen und hemmen diese. Sie überexprimieren Moleküle wie CD80, CD86, *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) und *Fas ligand* (FasL). Diese wirken nach Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf Immuneffektorzellen wie *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA 4), *programmed cell death protein 1* (PD-1) oder *Fas* inhibitorisch oder proapoptotisch (Hahne et al. 1996, Perez et al. 1997, Keir et al. 2006).

Neben den genannten zellulären und zellgebundenen Mechanismen bedienen sich Tumorzellen diverser löslicher Faktoren wie TGF- β , IL-10 und CCL22 zur Generierung eines immunsuppressiven Tumormilieus. Diese Faktoren werden direkt vom Tumor oder von Zellen im Tumorstroma sezerniert (Joyce & Fearon 2015). TGF- β hemmt die T-Zellaktivierung, -differenzierung und -proliferation (Li et al. 2006). Darüber hinaus wird die Expression zytolytischer Substanzen wie Perforin, IFN- γ und Granzyme A und B unterdrückt (Thomas & Massague 2005). IL-10 findet sich reichlich im Tumormilieu und führt zur gestörten Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (Gerlini et al. 2004). CCL22 führt zur gesteigerten Migration regulatorischer T-Zellen ins Tumormilieu, die wiederum ein immunsuppressives Milieu erzeugen (Curiel et al. 2004, Sugiyama et al. 2013).

Zusammengefasst ist die Immunsystem-Tumor-Interaktion hochkomplex. Versagen die intrinsischen und extrinsischen Kontrollmechanismen des Körpers kommt es zur Entstehung von Krebserkrankungen. Für die Weiterentwicklung effektiverer Therapien ist das Verständnis dieser Interaktionen und der Entzugsmechanismen unabdingbar und Gegenstand aktueller Forschungen.

1.3 Krebsimmuntherapie

Das Modell des *immunoediting* zeigt, dass dem Immunsystem eine entscheidende Rolle in der Vermeidung von Krebserkrankungen zukommt. Vor diesem Aspekt ist das Ziel der Krebsimmuntherapie das Immunsystem über verschiedene Mechanismen zu (re-) mobilisieren und Tumorzellen wieder dafür adressierbar zu machen. Zu den erfolgreichsten Vertretern der Krebsimmuntherapie zählen die Therapie mit Antikörpern und der adoptive T-Zelltransfer (AZT) (Kruger et al. 2019).

1.3.1 Antikörperbasierte Immuntherapie

Antikörper haben als humorale Komponente des adaptiven Immunsystems eine wichtige Funktion bei der Abwehr pathogener Organismen. Sie dienen zur Neutralisierung und Opsonisierung von Pathogenen, zur Komplementaktivierung (CDC) sowie zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) (Lu et al. 2017).

Antikörper sind Y-förmige Konstrukte. Die Schwanzregion, das kristallisierbare Fragment (Fc-Region), fungiert als Effektorregion. Sie bindet an verschiedene Rezeptoren wie den Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) auf diversen Immunzellen und aktivieren diese (Nimmerjahn & Ravetch 2008). Die Armregion besteht aus zwei identischen, antigenbindenden Fragmenten (F_{ab}-Region).

1.3.1.1 Monospezifische Antikörper

Monoklonale monospezifische Antikörper (mAk) sind die bislang am erfolgreichsten eingesetzten Elemente der Immuntherapie. Sie richten sich gegen tumorassoziierte Antigene (TAA), die sich spezifisch oder deutlich vermehrt auf Tumorzellen finden. Sie binden diese mit hoher Spezifität und führen sie dem Abbau durch das Immunsystem zu. mAk blockieren essenzielle Signalwege von Tumorzellen und der umliegenden Stromazellen (Shuptrine et al. 2012).

Erstmalig wurde 1998 mit Rituximab ein entsprechender mAk zugelassen. Er bindet an das Oberflächenprotein CD20, welches auf mutierten B-Zellen überexprimiert wird. Auf diese Weise wird die ADCC, CDC und durch eine Signalwegblockade die Apoptose induziert (Reff et al. 1994, Golay et al. 2000, Alas & Bonavida 2001). Durch Ergänzung der Therapie mit Rituximab konnte bei Patienten mit B-non-Hodgkin-Lymphom das Gesamtüberleben deutlich gesteigert werden (Marcus et al. 2008, Lee et al. 2018).

Ein weiterer Durchbruch gelang mit dem gegen *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichteten mAk Cetuximab (Bonner et al. 2006, Van Cutsem et al. 2015). EGFR wird auf kolorektalen Karzinomen sowie Karzinomen des Kopf-Halsbereiches überexprimiert und fördert deren Proliferation und Überleben (Grandis & Tweardy 1993, Wee & Wang 2017). Durch eine Blockade der Ligandenbindung und Dimerisierung des Rezeptors verhindert Cetuximab eine Zellaktivierung, die dann zur Apoptose führt (Li et al. 2005, de La Motte Rouge et al. 2007).

Das zunehmende Verständnis der Immunsystem-Tumor-Interaktion und der damit einhergehenden Immunsuppression hat zur Fokussierung auf immunmodulatorische Therapien geführt. Die Blockade immuninhibierender Signale entfesselt die Immunantwort gegenüber Tumorzellen. Zu den zugelassenen *check-point* Inhibitoren mit guter Wirkung gehören der gegen *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA 4) gerichtete Antikörper Ipilimumab und der gegen *programmed cell death protein 1* (PD-1) gerichtete Antikörper Nivolumab (Hodi et al. 2010, Ansell et al. 2015). Allerdings traten in Zusammenhang mit diesen mAk vermehrt Autoimmunreaktionen wie Diabetes mellitus auf (Godwin et al. 2017).

1.3.1.2 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper (BiAk) sind Hybride zweier monoklonaler Antikörper mit dualer Antigenspezifität, die in Struktur, Größe und Funktionalität variieren. Die bekanntesten Vertreter sind trifunktionale BiAk (TrAk) und *bispecific T-cell engager* (BiTE). TrAk sind IgG-ähnliche Antikörper, die eine intakte Fc-Region aufweisen und somit die Charakteristik klassischer mAk mit bispezifischen

Molekülen vereinen. BiTE sind nicht IgG-ähnliche Antikörper ohne Fc-Region (Kontermann 2012). Verschiedene Wirkmechanismen wie die Blockade zweier Oberflächenrezeptoren (Chen et al. 2014), das *cross-linking* zweier Rezeptoren oder die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen an die Tumorzelle wurden hierbei verfolgt.

Bei der Rekrutierung von Immunzellen an die Tumorzelle wirkt der BiAk als immunologisches Adaptermolekül. Das ubiquitär auf Immuneffektorzellen exprimierte aktivierende Molekül CD3 wird von einem Arm des BiAk gebunden, ein TAA auf Tumorzellen von dem anderen Arm des BiAk. Bei dualer Bindung soll die Immunzelle aktiviert werden (Schmitt et al. 2004). Bei IgG-ähnlichen BiAk kann zusätzlich über die Fc-Region eine weitere Fc γ R-exprimierende Immunzelle wie natürliche Killerzellen und Makrophagen aktiviert werden (Zeidler et al. 2000).

BiTE sind kleine Fusionsproteine ohne Fc-Region, die aus zwei Einzelkettenfragmenten (scFv) der jeweils variablen schweren und leichten Domäne zweier Antikörper bestehen (Huehls et al. 2015). Ein Zielantigen des BiTE ist ebenfalls CD3, das zweite ein TAA auf Tumorzellen. BiTE sind kleine Proteine, sodass T- und Tumorzelle räumlich eng aneinandergebunden werden. Nach dualer Bindung wird die T-Zelle MHC-unabhängig aktiviert (Wolf et al. 2005).

In der klinischen Anwendung bei der Behandlung der therapierefraktären B-ALL befindet sich Blinatumomab. Dieser BiTE hat eine hohe Spezifität gegen das B-Zellprotein CD19, welches auf mutierten B-Zellen überexprimiert wird (Loffler et al. 2000). In klinischen Studien erwies sich Blinatumomab einer Behandlung mit konventioneller Chemotherapie als deutlich überlegen und führte zu einem gebesserten Gesamtüberleben (Kantarjian et al. 2017, Martinelli et al. 2017).

1.3.1.3 Limitierungen und Vorteile mono- und bispezifischer Antikörper

Antikörper konnten sich aufgrund ihrer vielfältigen Wirkmechanismen und den bislang vielversprechenden klinischen Ergebnissen als vierte Säule der Krebstherapie etablieren. Dieser Therapieansatz zeigt jedoch mehrere Limitierungen auf.

Viele der bekannten therapeutischen Antikörper stammen von Tieren und sind daher im menschlichen Organismus immunogen. Dies kann eine überschießende Immunantwort des Empfängers hervorrufen. Häufig bildet der Organismus humane *antidrug*-Antikörper, was zum Abbau der Antikörper und Therapieversagen führen kann (Heiss et al. 2010). Interessanterweise profitierten die Patienten jedoch von diesen *antidrug*-Antikörper und zeigten ein besseres Therapieansprechen (Ott et al. 2012).

Tumorzellen sind mutierte Zellen, deren Repertoire an Oberflächenmolekülen häufig qualitativ den gesunden Ursprungszellen ähnlich ist und sich lediglich quantitativ unterscheidet. Dies hat zur Folge, dass Antikörper ebenfalls Strukturen im gesunden Gewebe binden und zerstören können (Kebenko et al. 2018). Durch hohe genetische Mutationsraten und Selektionsdruck kann es zum Verlust der TAA und Wirkverlust der Antikörper kommen (Davis et al. 1999). Die limitierte Anzahl an tumorspezifischen Antigenen erschwert zudem die zielgerichtete Immuntherapie.

In soliden Tumoren sind weitere entscheidende Faktoren die Gewebepenetranz der Antikörper sowie die Überwindung des immunsuppressiven Tumormilieus. Die Gewebepenetranz ist abhängig von Größe, Gewicht, Struktur und Affinität der Antikörper (Schmidt & Wittrup 2009). Antikörper mit hoher Affinität binden vor allem in der Tumorperipherie und dringen vermindert ins Zentrum solider Tumore ein (Adams et al. 2001). Insbesondere BiTE sind kleine Moleküle mit einer besseren Bioverfügbarkeit und Gewebepenetranz. Sie weisen jedoch eine geringe Halbwertszeit auf, sodass eine kontinuierliche Applikation zur Aufrechterhaltung einer Immunantwort erforderlich ist (Zhu et al. 2016). Zudem hängt die Effektivität der BiAk Therapie von einer zeitgleichen Tumordinfiltration durch Immuneffektorzellen ab (Marcucci et al. 2013).

Nicht zuletzt weisen Antikörper dosisabhängige Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen, Schüttelfrost, Fieber, Lymphopenie, Hypertension, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe auf, die eine Dosissteigerung unmöglich machen können. Daneben kann es durch eine massive Immunstimulation zur überschießenden Zytokinausschüttung bis zum lebensbedrohlichen Zytokinfreisetzungssyndrom (CRS) kommen (Mau-Sorensen et al. 2015).

Die Nebenwirkungen der Antikörpertherapie können durch Terminierung der Applikation oder Dosisanpassung meist zügig kontrolliert werden. In Abhängigkeit der Halbwertszeit lässt die immunmodulatorische Aktivität nach. Ein weiterer Vorteil der Antikörpertherapie ist die einfache Verfügbarkeit und patientennahe Anwendbarkeit.

1.3.2 Zellbasierte Immuntherapie

Die Behandlung mit Antikörpern basiert auf vielfältigen Mechanismen, von denen einige das Immunsystem aktivieren. Eine erfolgreiche Therapie setzt somit ein Mindestmaß an funktionalem Immunsystem voraus, was bei Krebspatienten häufig Chemotherapie bedingt nicht gegeben ist. Die zellbasierte Immuntherapie kommt dieser Limitierung entgegen, indem einzelne tumorspezifische oder genmodifizierte Immunzellen *in vitro* expandiert und Krebspatienten infundiert werden können (Dudley & Rosenberg 2003). In der Literatur werden diverse Ansätze des adoptiven Zelltransfers zur Krebstherapie beschrieben (Xue et al. 2005, Till et al. 2008, Karlsson et al. 2010).

1.3.2.1 Adoptiver T-Zelltransfer

Rosenberg et al. beschrieben einen AZT mit TAA spezifischen T-Zellen, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden (Rosenberg et al. 1994). Die Therapie mit diesen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zeigte bei 30 % der Patienten ein gutes Ansprechen. Jedoch sind TIL nicht in jedem Tumor zu finden, die Gewinnung und Expansion kompliziert und die T-Zellaktivität durch das immunsuppressive Tumormilieu limitiert (Spiess et al. 1987, Dudley et al. 2002).

Ein weiterer Ansatz ist der AZT mit T-Zellrezeptor (TZR)-modifizierten T-Zellen. Die T-Zellen werden genetisch modifiziert und mit hochaffinen tumorspezifischen TZR ausgestattet, die z. B. aus TIL kloniert werden können (Morgan et al. 2006). In einigen Studien zeigte sich dieser Ansatz als effektiv (Duval et al. 2006, Robbins et al. 2015). Jedoch kann es bei der TZR-Expression zu Fehlpaarungen der α und β Ketten des TZR mit konsekutiver Autoreaktivität und schweren *On-target-off-tumor*-Reaktionen kommen (Bendle et al. 2010).

TIL sowie die TZR-modifizierten T-Zellen werden MHC-abhängig über die klassische T-Zellaktivierungskaskade aktiviert. Wie im Konzept des *immunoediting* beschrieben, besitzen Tumore die Fähigkeit das MHC herunter zu regulieren und sich somit den TIL und TZR-modifizierten T-Zellen zu entziehen (Algarra et al. 2000, Marincola et al. 2000).

1.3.2.2 Chimärer-Antigen-Rezeptor-modifizierte T-Zellen

In Anlehnung an den TZR wurden Chimäre-Antigen-Rezeptoren (CAR) entwickelt. Diese Hybrid-Rezeptoren weisen als extrazelluläre Antigenbindungsdomäne einen antigenspezifischen Antikörper in Form eines scFv auf. Als Aktivierungsdomäne wird wie beim TZR zumeist CD3 ζ verwendet (Eshhar et al. 1993). Durch Bindung an ihre Zielantigene wie Proteine, Kohlenhydrate oder Fette werden die CAR-T-Zellen aktiviert (Gross et al. 1989, Davila et al. 2014). Für eine vollständige T-Zellaktivierung naiver T-Zellen ist jedoch ein zweites, ko-stimulierendes, Signal erforderlich. Aus diesem Grund wurden CAR der zweiten und dritten Generation um ein bzw. zwei ko-stimulierende Domänen wie CD28, OX40 oder 4-1BB ergänzt. Diese bewirken eine vollständige und länger anhaltende Aktivierung mit gesteigerter Proliferationskapazität und Vitalität der CAR-T-Zellen (Maher et al. 2002, Imai et al. 2004, Pule et al. 2005). Im Gegensatz zu TIL und TZR-modifizierten T-Zellen ist keine MHC-Antigenpräsentation erforderlich (Chmielewski et al. 2013). Durch Bindung des CAR an die Zielstrukturen werden die CAR-T-Zellen ohne zusätzliche Signale aktiviert, solange diese auf der Oberfläche exprimiert werden. Vor allem bei hämatologischen Malignomen wie der B-Zell Leukämie zeigte die Therapie mit einem CD19 spezifischen CAR sehr vielversprechende Erfolge (Lee et al. 2015).

Wie bei den BiAk beschrieben, können die CAR-T-Zellen zu einer überschießenden T-Zellaktivierung und CRS mit letalem Ausgang führen (Morgan et al. 2010). Weiterhin sind gravierende neurotoxische Nebenwirkungen sowie schwere *On-target-off-tumor*-Reaktionen beschrieben (Ramos et al. 2018). CD19-CAR-T-Zellen lysieren auch gesunde B-Zellen, was zu einer langanhaltenden B-Zelldepletion mit sekundärem Antikörpermangel führen kann (Grupp et al. 2013). Der Verlust entsprechender TAA ist ein weiterer limitierender Faktor der CAR-T-Zellen (Ruella & Maus 2016).

Sowohl der AZT als auch die Antikörpertherapie haben das Spektrum der Tumorthherapie deutlich erweitert. Bislang ist jedoch keine vollständige Tumoreradikation mit einer Mono-Immuntherapie gelungen. Die Kombination einzelner Ansätze könnte durch Schaffung synergistischer Effekte die Möglichkeiten der Immuntherapie erweitern.

1.4 Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zelltransfer mit synthetischen agonistischen Rezeptor modifizierten T-Zellen und bispezifischem Antikörper

Wie eingangs beschrieben, weisen Therapien mit Antikörpern und der AZT Limitierungen auf. Das immunsuppressive Tumormilieu, der Verlust von TAA, die Gewebepenetranz von Antikörpern, die Rekrutierung von Immunzellen, schwere Nebenwirkungen wie *On-target-off-tumor*-Reaktionen oder das lebensbedrohliche CRS schmälern das Potenzial dieser Therapien.

In dieser Arbeit wird, basierend auf präklinischen Studien unserer Arbeitsgruppe, ein neues Therapiekonzept vorgestellt. Es vereint die Vorzüge der bispezifischen Antikörper und des adoptiven Transfers modifizierter T-Zellen. TZR und Markerantigen-modifizierte T-Zellen konnten durch einen nicht aktivierenden BiAk an Tumorzellen rekrutiert werden. Dies führte zur Tumorlyse. Die Aktivierung setzte die Expression des tumorspezifischen TZR und des TAA voraus und konnte nicht allein durch duale BiAk Bindung ausgelöst werden. Dadurch sollte eine Aktivierung außerhalb des Tumors verhindert werden (Kobold et al. 2015). Dieses Konzept weist jedoch Limitierungen auf. Zum einen muss die Sequenz eines tumorspezifischen TZR bekannt sein, was nicht für jede Tumorentität möglich ist (Rosenberg et al. 1986). Dieser muss dann zusammen mit dem Markerantigen stabil auf den T-Zellen exprimiert werden. Zum anderen ist die Aktivierung abhängig von einer MHC-Antigenpräsentation. Die T-Zellrekrutierung korrelierte mit der BiAk-Konzentration – bei MHC- oder TAA-Verlust bleibt jedoch eine T-Zellaktivierung aus.

Das Konzept der Kombination aus AZT und Antikörpertherapie mittels bispezifischen Antikörpern wird in dem hier vorgestellten Therapiemodell aufgegriffen und erweitert. Für den AZT werden T-Zellen genetisch modifiziert und mit einem von uns neu entwickelten synthetischen agonistischen Rezeptor (SAR) genannten Fusionsprotein ausgestattet. Der SAR besteht aus einem Markerantigen,

welches mit dem ko-stimulierenden Protein CD28 und der aktivierenden CD3 ζ -Domäne fusioniert ist. Der BiAk, mit Spezifität gegen den SAR und ein TAA, soll die SAR-modifizierten T-Zellen an die TAA⁺ Tumorzelle binden und MHC-unabhängig zur Tumorlyse aktivieren. Der SAR fungiert hierbei als Marker- und Aktivierungsprotein. In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschiedene SAR-Konstrukte untersucht. Der erste SAR weist als Zielantigen *epidermal growth factor receptor variant III* (EGFRvIII) auf, der zweite das embryonale Antigen Cripto 1. Als TAA dient das auf vielen Tumoren überexprimierte *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM).

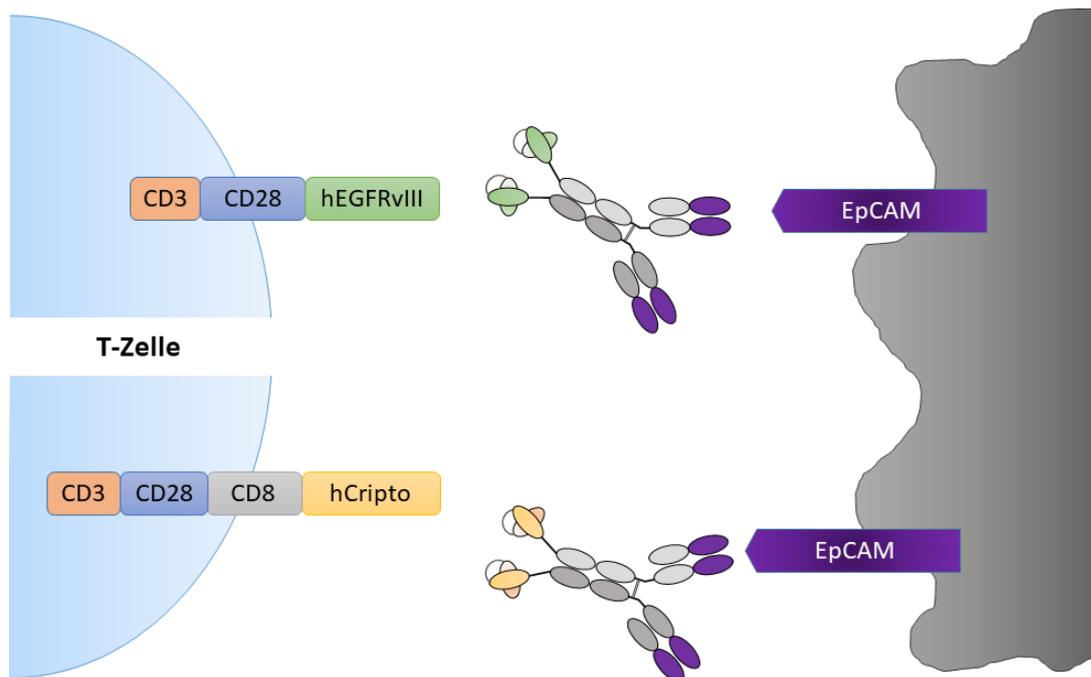


Abbildung 1: Therapiemodell SAR-T-Zellen mit BiAk, das in dieser Arbeit verfolgt wird.

SAR-T-Zellen werden durch den bispezifischen Antikörper im 2:2 Format räumlich an EpCAM⁺ Tumorzellen gebunden und aktiviert. Dargestellt sind der C3-SAR mit hCripto und der E3-SAR mit hEGFRvIII als Markerantigen. hCripto: humanes embryonales Antigen Cripto 1, hEGFRvIII: humanes *epidermal growth factor receptor variant III*, EpCAM: murines *epithelial cell adhesion molecule*, CD3, CD8 und CD28 sind murinen Ursprungs (eigene Abbildung).

1.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Generierung eines synthetischen agonistischen Rezeptors, der nach retroviraler Transduktion auf T-Zellen exprimiert wird. Durch Bindung des bispezifischen Antikörpers anti-Cripto 1 x anti-EpCAM bzw. anti-EGFRvIII x anti-EpCAM sollen die SAR-T-Zellen aktiviert werden und Tumorzellen lysieren. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Generierung von SAR-Konstrukten
- 2) Wird der SAR auf T-Zellen exprimiert?
- 3) Können SAR-T-Zellen durch Bindung von Antikörpern aktiviert werden?
- 4) Können SAR-T-Zellen EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen lysieren?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Hersteller
CO ₂ Brutschrank, BD6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCanto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Gefrierschrank, -80 °C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Konfokalmikroskop TCS SP5 II, Objektiv: HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV	Leica Microsystems, Wetzla, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke, 4 °C, -20 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Mithras LB940 ELISA Reader	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanodrop 2000c Spektrophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
RTCA iCELLigence, E Plate L8 PET	ACEA Biosciences, USA
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Waage CPA 1003S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
MEM Non-Essential Amino Acids, NEAA	Gibco Products, Grand Island, NY, USA
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Blasticidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin, BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, PBS	PAA, Pasching, Österreich
EcoRI, Restriktionsenzym	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ethanol 100 %	Apotheke, LMU München, Deutschland
FACS Flow, FACS Safe	BD Biosciences, New Jersey, USA
Fetales Kälberserum, FKS	Gibco Products, Grand Island, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure, HEPES 1M	Lonza, Basel, Schweiz
Isofluran	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol, 70 %, 100 %	Apotheke LMU, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, Österreich
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumchlorid 0,9 %	Apotheke LMU, München, Deutschland

Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
NotI, Restriktionsenzym	Thermo Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Retronectin	Takara, Kusatsu, Japan
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Roswell Park Memory Institute, RPMI	PAA, Pasching, Österreich
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin, 10x	Lonza, Basel, Schweiz
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rekombinantes EpCAM	R&D Systems, Minneapolis, USA
VLE DMEM	Biochrom, Berlin

2.3 Kommerzielle Kits

Tabelle 3: Kommerzielle Materialkits

Kit	Hersteller
Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA), Mouse Interferon γ	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zombie NIR Fixable Viability Kit	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pure Yield Plasmid Maxiprep System	Promega, Madison, USA
InviTrap Spin Cell RNA Mini Kits	Strattec Molecular GmbH, Berlin, Deutschland

2.4 Zellkulturmaterial

Für die Zellkultur verwendete Einmalmaterialien wurden von den Firmen BD Falcon (Franklin Lakes, USA), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning, USA), Greiner-Bio One (Kremsmünster, Deutschland), Millipore (Billerica, USA) und Sartorius (Göttingen, Deutschland) erworben.

2.4.1 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Herkunft
4T1	Murine Brustkrebszellen (Balb/c)	RPMI Vollmedium	Dr. med. M. Wartenberg, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland
Platinum E	Humane embryonale Nierenzelllinie (HEK 293T)	Plat E Medium	Dr. rer. nat. M. Leisegang, Charité Berlin, Deutschland

2.4.2 Zellkulturmedium

Tabelle 5: Zellkulturmedien

Name	Medium	Vol.	Zusätze					
			FKS	L-Glu	P/S	NaPy	NEAA	Sonstiges
DMEM VM	DMEM	500 ml	10 %	1 %	1 %		1 %	
Konservierung	FKS	500 µl	400 µl					100 µl DMSO
Plat E	DMEM	500 ml	10 %	1 %	1 %			0,1 % Puromycin (final 1 µg/ml), 0,1 % Blasticidin (final 10 µg/ml)
Transfektion	DMEM	500 ml	10 %	1 %	1 %			
Plat E Hunger	DMEM	500 ml	3 %	1 %	1 %			
RPMI VM	RPMI VLE	500 ml	10 %	1 %	1 %	1 mM		
T-Zell Medium	RPMI VLE	500 ml	10 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 mM HEPES, 50 µM beta Mercaptopurin
FACS Medium	PBS		2 %					
Cytotox Medium	RPMI ohne Phenolrot	500 ml	1 %	1 %	1 %	1 mM		1 mM HEPES

FKS – Fetales Kalbserum, L-Glu – L-Glutamin, P/S – Penicillin/Streptomycin, NEAA – Non Essential Amino Acids, NaPy – Natriumpyruvat, VM – Vollmedium

2.4.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Tabelle 6: Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktoren und Zytokine	Hersteller
Anti-Maus CD3ε (Klon 145-2C1)	eBioscience, Santa Clara, USA
Anti-Maus CD28 (Klon 37.51)	eBioscience, Santa Clara, USA
Rekombinantes Human IL-2	Pepro Tech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes Human IL-15	Pepro Tech, Rocky Hill, USA
Dynabeads Mouse T-Activator anti-CD3-anti-CD28	Life Technologies, München, Deutschland

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse	PharmaLyse (10 x) 10 % in PBS
Trypsin-Lösung	Trypsin 0,05 %, EDTA 0,02 %
Transfektionspuffer	Natriumchlorid 1.6 g, Kaliumchlorid 74 mg Na ₂ HPO ₄ 50 mg, HEPES 1 g ad 100 ml H ₂ O, pH Wert 6,76
FACS Blocking Puffer	BSA 2 % in PBS

2.6 Antikörper

2.6.1 Durchflusszytometrie

Tabelle 8: Unkonjugierte Primärantikörper

Primärantikörper	Isotyp	Endkonz.	Reaktivität	Hersteller
Anti-EGFR, Cetuximab	IgG1	10 µg/ml	Mensch	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-CD20, Rituximab	IgG1	10 µg/ml	Mensch	Roche, Basel, Schweiz
Anti-Cripto (LC7035 020 060427)		10 µg/ml	Mensch	Roche, Penzberg, Deutschland

Tabelle 9: Konjugierte Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Isotyp	Endkonz.	Hersteller
Alexa Fluor 488 Goat anti-Human IgG (H+L) Secondary Antibody	IgG	20 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FITC AffiniPure F(ab)2 Fragment Goat anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific	IgG	30 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
FITC AffiniPure Goat Anti-Rabbit (H+L)	IgG	20 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

2.6.2 Bispezifische Antikörper

Die Generierung der BiAk wurde in Karches et al. beschrieben (Karches et al. 2019). Die verwendeten Antikörperkonzentrationen sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Tabelle 10: Bispezifische Antikörper

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

2.7 Synthetische agonistische Rezeptoren

Tabelle 11: Domänen der synthetischen agonistischen Rezeptoren

SAR	Extrazellulärdomäne	Transmembrandomäne	Intrazellulärdomäne
E3	EGFRvIII (human, Uniprot P00533 AA 1-29, 298-645)	CD28 (murin, Uniprot P31041 AA 151-177)	CD28 (murin, Uniprot P31041 AA 178-218) CD3ζ (murin, Uniprot P24161 AA 52-164)
E3 ^{del}	EGFRvIII (human, Uniprot P00533 AA 1-29, 298-645)	EGFRvIII (human, Uniprot P00533 AA 646-677)	-
C3	Cripto-1 <i>growth factor</i> (human, Uniprot P13385 AA 31-150) CD8α (murin, Uniprot Eintrag P01731 AA 153- 196)	CD8α (murin, Uniprot Eintrag P01731 AA 197- 217)	CD28 (murin, Uniprot P31041 AA 178-218) CD3ζ (murin, Uniprot P24161 AA 52-164)
C3 ^{del}	Cripto-1 <i>growth factor</i> (human, Uniprot P13385 AA 31-150)	CD8α (murin, Uniprot Eintrag P01731 AA 197- 217)	-
C3 Igκ Leader (5' → 3')			
ATG GAA ACA GAT ACA CTG CTG CTG TGG GTG CTG CTG CTG TGG GTG CCA GGA TCT ACA GGG GAT GGC GCC CAG CCT GCT AGA AGC			

2.8 Primer

Tabelle 12: Overlap-PCR Primer

Domäne	Primer	Sequenz, 5' → 3'
C3-SAR		
Ig γ Leader	Leader Not1 fwd	ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG GAA ACA GAT ACAC
	LeaderCripto rev	AAA TTC CTG ATG GCC CAG GCT TCT AGC AGG CTG GGC
Cripto	LeaderCripto fwd	GCC CAG CCT GCT AGA AGC CTG GGC CAT CAG GAA TTT
	Cripto CD8aex rev	CAG CAC TGG CTT GGT AGT ATC ACA GCC GGG TAG AAA
CD8extm	CriptoCD8aex fwd	TTT CTA CCC GGC TGT GAT ACT ACC AAG CCA GTG CTG
	CD8tm-CD28iz rev	TCT GTT CCT TCT ACT ATT GAT GAG AGT GAT GAT CAA
CD28 iz	CD8tm-CD28iz fwd	TTG ATC ATC ACT CTC ATC AAT AGT AGA AGG AAC AGA
	CD28iz-CD3 ζ rev	CTG CTG AAT TTT GCT CTG GGG CGG TAC GCT GCA A
CD3 ζ	CD28-CD3 ζ fwd	TTG CAG CGT ACC GCC CCA GAG CAA AAT TCA GCA G
	CD3 ζ EcoR1 rev	TAA TGA ATT CTT AGC GAG GGG CCA GGG TC
C3^{del}-SAR		
	Leader Not1 fwd	ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG GAA ACA GAT ACA C
	CD8tm EcoR1 rev	TAA TGA ATT CTT ATC TAC TAT TGA TGA GAG TG
E3-SAR		
EGFRvIII _{ex}	EGFRvIII _{Not1} fwd	AGC TTG CTC GCG GCC GCG CCA CCA TGC GAC CCT CCG
	EGFRvIII _{ex} CD28tm rev	CAC GAC CAG TGC CCA AAA GGA CGG GAT CTT AGG CCC
CD28 tm iz	EGFRvIII _{ex} CD28tm fwd	GGG CCT AAG ATC CCG TCC TTT TGG GCA CTG GTC GTG
	CD28iz-CD3 ζ rev	CTG CTG AAT TTT GCT CTG GGG CGG TAC GCT GCA A
CD3 ζ	CD28-CD3 ζ fwd	TTG CAG CGT ACC GCC CCA GAG CAA AAT TCA GCA G
	CD3 ζ EcoR1 rev	TAA TGA ATT CTT AGC GAG GGG CCA GGG TC
E3^{del}-SAR		
	EGFRvIII Not1 fwd	AGC TTG CTC GCG GCC GCG CCA CCA TGC GAC CCT CCG
	EGFRvIII del EcoR1 rev	GGA CGA ATT CTC AGC GCT TCC GAA CGA TGT GGC

fwd – forward, rev – reverse, ex – extrazellulär, tm – transmembran, iz – intrazellulär

2.9 Software

Tabelle 13: Software

Programm	Firma
FlowJo 8.7	Treestar, Ashland, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Adobe Creative Suite	Adobe Systems, San Jose, USA
Lasergene Suite	DNASTAR, Madison, USA
T _M Rechner	http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/
Endnote X9	Thompson Reuter, Carlsbad, USA

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 RNA Isolation und Reverse Transkription

Aus murinen Splenozyten wurde mit Hilfe des InviTrap Spin Cell RNA Mini Kits nach Herstellerprotokoll RNA isoliert und im nächsten Schritt *complementary* DNA (cDNA) generiert. Die Arbeitsschritte erfolgten mit RNase freien Utensilien und unter ständiger Kühlung. Der Mastermix sowie das Thermocycler-Programm sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 14: RT-PCR Ansatz

Reagenzien	Volumen [μ l]
RNA	1-2
H ₂ O	11 - x
Oligo (dT) ₁₈ -Primer	1
RT-Puffer (5 x)	4
dNTP	2
RNAsin/Ribolock [40 U/ μ l]	1
Revert Acid H-minus M-MuLV (200 U/ μ l)	1
Gesamtvolumen	20

Tabelle 15: Thermocycler Programm RT-PCR

Phase	Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
Transkription	30	50
Termination	5	85
Abkühlung	<i>Hold</i>	4

2.10.2 *Overlap Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Die cDNA diente als Vorlage zur Klonierung der einzelnen SAR-Domänen. Diese wurden mittels *overlap* PCR zu den finalen SAR kloniert. Alle PCR erfolgten mit Polymerasen mit Korrekturlesefunktion. Die Anlagerungstemperatur und die Elongationszeit wurden den Primern und der Länge der DNA-Fragmente entsprechend angepasst. Die Primer wurden mit der Software Lasergene (DNASTAR) entworfen. Für die Fusion sind zwei Schritte notwendig:

1. Konventionelle PCR mit in 1.8 beschriebenen Verlängerungsprimern. Hierbei wird jeweils am 5'-Ende zweier zu fusionierender DNA-Fragmente die komplementäre Nukleotidsequenz des 3'-Endes des anderen DNA-Fragments angefügt.
2. *Overlap*-PCR. Die mit komplementären Basen verlängerten DNA-Fragmente werden in einem zweiten Reaktionsansatz gemischt. Die Verlängerungen dienen als Primer zur Elongation mit den komplementären DNA-Fragmenten. Durch Zugabe der jeweiligen endständigen Primer werden die fusionierten DNA-Fragmente amplifiziert.

Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Ansätze und Thermocyclerprogramme verwendet:

Tabelle 16: Reaktionsansatz konventionelle PCR

Reagenzien	Volumen [μ g]
cDNA	50 – 500 ng
Enhancer	10
5 x Q5 Puffer	10
dNTP [10 mM]	1
forward Primer, 10 μ M	1
reverse Primer, 10 μ M	1
Q5 high fidelity Polymerase, 2 U/ml	0,5
ddH ₂ O	ad 50
Gesamtvolumen	50

Tabelle 17: Thermocycler Programm konventionelle PCR

Phase	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	30 sek	98	1
Denaturierung	10 sek	98	34
Anlagerung	30 sek	55	
Elongation	13 sek	72	
Finale Elongation	2 min	72	1

Tabelle 18: Reaktionsansatz *overlap*-PCR

Reagenzien	Volumen [μ l]
DNA 1	50 – 500 ng
DNA 2	50 – 500 ng
Enhancer	10
5 x Q5 Puffer	10
dNTPs [10 mM]	1
forward Primer, 10 μ M	1
reverse Primer, 10 μ M	1
Q5 high fidelity Polymerase, 2 u/ ml	0,5
ddH ₂ O	ad 50
Gesamtvolumen	50

Tabelle 19: Thermocycler Programm *overlap*-PCR

Phase	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	30 sek	98	1
Denaturierung	10 sek	98	34
Anlagerung	30 sek	60	
Elongation	17 sek	72	
Finale Elongation	2 min	72	1

Nach der DNA-Amplifikation wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und mit dem JetQuick® Gel Extraction Spin Kit aufgereinigt.

2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

1,5 – 3 g Agarosepulver wurden in 150 ml TAE-Lösung gegeben, vermischt und bis zur vollständigen Lösung des Pulvers aufgeköcht. Die Suspension wurde mit 7 μ l Ethidiumbromid auf die Gelkammer gegeben und abgekühlt. Nach der Polymerisation des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x TAE-Lösung aufgefüllt und die mit Puffer verdünnten PCR-Produkte aufgetragen. Die Produkte wurden bei 90 – 110 V für 20 – 45 min aufgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem JetQuick® Gel Extraction Spin Kit nach Herstellerprotokoll. Die Quantität und Qualität der gewonnenen PCR-Produkte wurden im Nanophotometer bestimmt

2.10.4 Herstellung kompetenter DH5 α *E. coli* Bakterien

Die Bakterien wurden in 100 ml LB Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 – 0,55 expandiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C über 10 min bei 4000 rpm pelletiert und die Bakterienpellets in 30 ml Transformationspuffer I resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert. Aliquots mit 50 und 100 μ l wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert.

2.10.5 Plasmidgewinnung

2.10.5.1 Digestion

Den klonierten DNA-Fragmenten und dem pMP71 Vektor wurden endständige mittels Restriktionsendonukleasen komplementäre Schnittstellen eingefügt. Der folgende Ansatz wurde dafür für zwei Stunden bei 37 °C und 300 rpm inkubiert:

Tabelle 20: Digestionsansatz

Reagenzien	Menge
DNA oder Vektor	500 – 1500 ng
Puffer 10 x	2 μ l
Restriktionsenzym I	10 U
Restriktionsenzym II	10 U
ddH ₂ O	ad 20 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Der entsprechende Puffer wurde nach Empfehlung des Herstellers verwendet. Der geschnittene Vektor wurde per Gelelektrophorese separiert und anschließend mit dem JetQuick® Gel Extraction Spin Kit aufgereinigt. Das geschnittene DNA-Fragment wurde direkt mit dem JetQuick® DNA CleanUp Buffer aufgereinigt.

2.10.5.2 Ligation

Über die „sticky end“ Ligation wurden das einzufügende DNA-Fragment und der pMP71 Vektor verbunden. Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet und für 30 min bei RT inkubiert:

Tabelle 21: Ligationsansatz

Reagenzien	Menge
DNA, geschnitten	500 – 1500 ng
Vektor, geschnitten	50 – 150 ng
T4 DNA Ligase Puffer, 10 x	2 μ l
Ligase	1 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

10 µl des Ansatzes wurde für die Hitzeschock Transformation von 100 µl kompetenter DH5α *E. coli* Bakterien verwendet. Nach Selektion und Expansion der transformierten Bakterien wurden die Plasmide mit dem PureYield™ Plasmid Maxiprep System nach Herstellerprotokoll gewonnen.

2.10.6 Retrovirale Transduktion primärer muriner T-Zellen

Die retrovirale Transduktion muriner T-Zellen mit den SAR-Konstrukten erfolgte nach einer modifizierten Version bereits veröffentlichter Methoden (Leisegang et al. 2008).

2.10.6.1 Herstellung des Retrovirus

Für die Herstellung der rekombinanten Retroviren wurde neben dem pMP71 Vektor die Verpackungszelllinie Platinum E verwendet. Die Platinum E Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 % expandiert. Die Transfektion erfolgte mittels Kalzium Präzipitation.

Tabelle 22: Transfektionsansatz

	Volumen	Stock Konzentration	Konzentration in 300µl Mix
CaCl ₂	15 µl	2 M	100 mM
Chloroquin	0,38 µl	100 mM	126,7 µM
Plasmid DNA	18 µg	X ng/µl	18 µg
ddH ₂ O	ad 150µl		

Die Platinum E Zellen wurden mit dem Transfektionsansatz für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Nach 42 Stunden wurde der virushaltige Überstand entnommen, über einen 0,45 µm Filter von Zellresten gereinigt und neues Medium zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde der zweite virushaltige Überstand entnommen und gefiltert.

2.10.6.2 T-Zell-Transduktion

24-Well Platten wurden über Nacht mit Retronectin beladen. Nach Zugabe von 1 – 2 ml virushaltigem Überstand wurden die Platten für 2 Stunden bei 4 °C mit 3000 g zentrifugiert. Vor Zugabe von 10⁶ T-Zellen in 1 ml T-Zellmedium (TCM) mit 10 IU/ml IL-2 und anti-CD3-anti-CD28 Dynabeads (10 µl/10⁶ T-Zellen) wurde der Virusüberstand verworfen. Die T-Zellen wurden für 30 min bei 32 °C und 800 g auf die virusbeladenen Platten zentrifugiert. Nach 24 Stunden wurde die Zentrifugation mit dem zweiten virushaltigen Medium wiederholt. Nach sechs Stunden wurde das Medium gegen frisches TCM mit 15 ng/ml IL-15 und 50 µM β-Mercaptoethanol ersetzt und alle 48 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 10⁶/ml eingestellt. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte am achten Tag mittels Durchflusszytometrie.

2.11 Immunologische Methoden

2.11.1 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden 6×10^5 T-Zellen in 100 μg PBS mit 2 % FBS gelöst und 5 – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eines unkonjugierten oder konjugierten Antikörpers hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50 μl FACS Medium resuspendiert. Bei unkonjugiertem Primärantikörper wurde 20 – 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben und wie zuvor beschrieben verfahren. Für die Durchflusszytometrie mit dem FACS Canto II von BD Biosciences wurden die gefärbten T-Zellen in 1 ml PBS mit 2 % FBS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 8.7.

2.11.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Bestimmung der Zytokine erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die photometrische Analyse wurde mit dem Mithras Platten-Leser bei 450 nm durchgeführt. Die Berechnung der Absolutwerte erfolgte mit *Microsoft Excel*.

2.12 Zellkultur

2.12.1 Zellkulturarbeiten

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter laminarem Luftfluss durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen bzw. -platten. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 48 – 72 Stunden gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst und passagiert. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, die maximal acht Wochen in Kultur waren. Die Zellen wurden mit 400 g für 5 min bei RT zentrifugiert, außer anders angegeben.

2.12.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurden 10 μl der Suspension mit 90 μl Trypanblau verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Blau gefärbte Zellen wurden als tote Zellen nicht mitgezählt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen/Sektor x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.12.3 Isolation muriner Splenozyten

Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde von dorsal entnommen und anschließend über ein 40 µm Zellsieb zerrieben. Das Sieb wurde mehrmals mit TCM gespült. Die Zellsuspension wurde mit 400 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und nach 90 sek mit 35 ml TCM zur Terminierung der Lysereaktion verdünnt. Daraufhin wurden die Zellen erneut durch ein 40 µm Sieb filtriert, zentrifugiert und mit einer Konzentration von 2×10^6 /ml in TCM resuspendiert. Das TCM war mit 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 IU/ml IL-2, 1 µg/ml anti-Maus-CD3 und 1 µg/ml anti-Maus-CD28-Antikörper angereichert. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert.

2.13 Experimente

2.13.1 SAR-T-Zellstimulation und Bestimmung der IFN-γ-Konzentration

$2,5 - 5 \times 10^5$ SAR-T-Zellen wurden mit Cetuximab (anti-EGFR), anti-Cripto-mAk, anti-Cripto x anti-EpCAM- oder anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-BiAk für 24 bzw. 48 Stunden stimuliert. Hierfür wurden unterschiedliche Antikörperkonzentrationen (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10 µg/ml) verwendet. Die folgenden Konditionen wurden analysiert: Stimulation der SAR-T-Zellen durch (I) Antikörper alleine, (II) in Kokultur mit rekombinantem EpCAM (rEpCAM), (III) in Kokultur mit EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen. Die SAR-T-Zellen wurden für 30 min bei 37 °C mit dem Antikörper inkubiert und anschließend den Versuchsbedingungen hinzugegeben. Alternativ wurde der Antikörper für 30 – 90 min in TCM auf die Platte oder auf rEpCAM beladenen Platten gecoatet und anschließend die naiven SAR-T-Zellen hinzugegeben. Für die Konditionen mit rEpCAM wurden die Platten bei 4 °C über Nacht mit 0,1 µg rEpCAM in 100 µl PBS gecoatet und anschließend mit reinem PBS gewaschen. Für die Konditionen mit 4T1 Brustkrebszellen wurden 3×10^4 4T1 Brustkrebszellen in 100 µl DMEM bis zur vollständigen Adhärenz über Nacht inkubiert. Das Medium wurde verworfen und mit BiAk stimulierte SAR-T-Zellen in 200 µl reinem TCM hinzugegeben. Die Bestimmung der IFN-γ-Konzentration erfolgte im zellfreien Überstand. Hierfür wurde das IFN-γ-ELISA Kit der Firma BD Biosciences Pharmingen verwendet.

2.13.2 Konfokalmikroskopie zur Bestimmung von Zellclustern

5×10^3 4T1 Brustkrebszellen wurden in 100 µl TCM auf 96-Flachbodenplatten aufgebracht und für zwei Stunden bei Zellkulturbedingungen inkubiert. Für den Versuch wurden E3-T-Zellen und untransduzierte T-Zellen verwendet. Diese wurden mit den fluoreszierenden Zellmembranfarbstoffen PKH 26 (rot, E3) und PKH 67 (grün, untransduzierte T-Zellen) der Firma Sigma-Aldrich gefärbt. Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 10^6 /ml

in TCM eingestellt und anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt. Dies wurde durchflusszytometrisch verifiziert. Die Hälfte der gemischten Zellsuspension wurde mit dem BiAk anti-EGFRvIII x anti-EpCAM (1 µg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die BiAk stimulierten und die naiven Zellen zu den Tumorzellen gegeben. Untersucht wurden dementsprechend zwei Konditionen in je 200 µl TCM:

I) 5×10^3 4T1 Brustkrebszellen + 5×10^4 E3-T-Zellen + 5×10^4 untransduzierte T-Zellen + BiAk.

II) 5×10^3 4T1 Brustkrebszellen + 5×10^4 E3-T-Zellen + 5×10^4 untransduzierte T-Zellen.

Nach einer Inkubationszeit von sieben bis neun Stunden wurden die Konditionen unter dem Konfokalmikroskop TCS SP5 II der Firma Leica auf Zellcluster untersucht. Ein Zellcluster wurde definiert als eine Ansammlung von \geq neun T-Zellen um eine Tumorzelle.

2.13.3 Tumorlyse in Echtzeit mittels Impedanzmessung

Das RTCA iCELLigence™ von ACEA Bioscience ist ein Instrument zur nichtinvasiven Bestimmung von Zellproliferation und Zellvitalität in Echtzeit. Der Boden der Kulturplatten ist mit Sensoren überzogen. Darüber kann die elektrische Impedanz der Platte gemessen werden. Zellen, die auf der Platte wachsen, beeinflussen die Impedanz, sodass anhand von Impedanzveränderung Rückschlüsse auf Zellwachstum oder Zelluntergang einer Zellpopulation gezogen werden kann. Die Impedanz wird als Zellindex ausgedrückt, welcher zum Zeitpunkt x als $ZI(x) = (R_n - R_b)/R_b$ definiert ist. Hierbei ist R_n die Impedanz des mit Zellen bewachsenen Wells und R_b die Impedanz des Wells mit reinem Medium (ACEA Biosciences 2013, ACEA Biosciences 2016). Die Zytotoxizität berechnet sich aus dem ZI nach folgender Formel:

$$\% \text{ Zytolyse} = (ZI_{\text{kein Effektor}} - ZI_{\text{Effektor}}) / ZI_{\text{kein Effektor}} \times 100.$$

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität wurden E3-T-Zellen mit EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen kokultiviert und mit dem iCELLigence die Zytolyse in Echtzeit detektiert. Hierfür wurden pro well einer 8-well E-Platte 4×10^4 4T1 Zellen in 100 µl Cytotoxmedium aufgetragen und für 8 – 20 Stunden bis zur fast vollständigen Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden mit BiAk (1 µg/ml) stimulierte und unstimulierte E3-T-Zellen in einer Effektor:Target-Ratio 10:1 hinzugegeben. Die Impedanzmessung erfolgte kontinuierlich über 65 Stunden.

2.14 Tierhaltung

Weibliche Mäuse der Linie Balb/c wurden von der Firma Javier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) im Alter von sechs bis acht Wochen gekauft. Die Tiere wurden nach Anlieferung erst nach mindestens sieben Tagen für die Organentnahme herangezogen. Die Haltung erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Klinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle

gängigen Hygienevorschriften wurden eingehalten und die Tiere von examinierten Tierpflegern versorgt. Die Versuche wurden durch die entsprechende Behörde der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.15 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Mittelwerte und die Fehlerbalken als Standardfehler des Mittelwerts (*stand error of the mean*, SEM) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism Version 5.0 verwendet. Die statistische Signifikanz wurde durch den zweiseitigen Student's t-Test für ungepaarte Stichproben berechnet. Die Ergebnisse wurden ab einem Signifikanzniveau für $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 SAR-Konstruktion

3.1.1 Klonierung

Für die Klonierung des EGFRvIII-SAR (E3) wurde humanes EGFRvIII als Extrazellulärdomäne sowie murines CD28 und CD3 ζ als Transmembran- bzw. Intrazellulärdomäne verwendet. Für den Cripto-SAR (C3) wurde humanes Cripto Antigen 1 als Extrazellulärdomäne, murines CD8 als *Non-signaling-hinge*-Region und Transmembrandomäne sowie ebenfalls murines CD28 und CD3 ζ als Intrazellulärdomäne verwendet. Der C3-SAR wurde zusätzlich mit einer Ig κ -Leader-Sequenz für eine bessere Translation und Expression versehen. Die einzelnen Domänen wurden mittels *overlap*-PCR fusioniert, gelelektrophoretisch aufgereinigt und die entsprechenden Banden sequenziert (Abbildung 2).

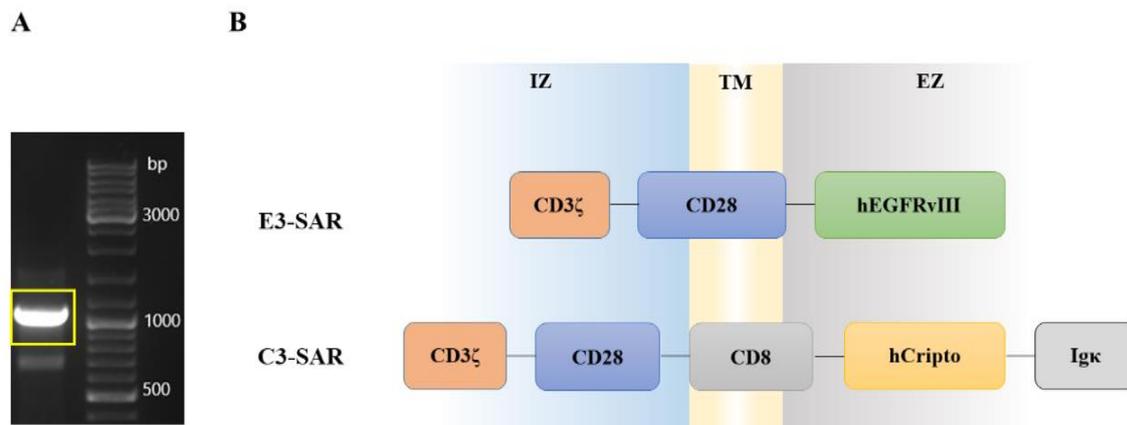


Abbildung 2: SAR-Konstrukte. (A) Gelelektrophorese des C3-SAR. (B) Schematische Darstellung der E3 und C3 synthetischen agonistischen Rezeptoren (SAR). IZ – Intrazellulärdomäne, TM – Transmembrandomäne, EZ – Extrazellulärdomäne. hCripto: humanes embryonales Antigen Cripto 1, hEGFRvIII: humanes *epidermal growth factor receptor variant III*, CD3, CD8 und CD28 sind murinen Ursprungs (eigene Abbildung).

3.1.2 Expression des SAR auf T-Zellen

Nach Klonierung des SAR sollte untersucht werden, ob dieser von T-Zellen exprimiert wird. Hierfür wurden primäre T-Zellen aus Balb/c-Mäusen isoliert und retroviral mit dem SAR transduziert. In der Durchflusszytometrie konnte eine Bindung der epitopspezifischen Antikörper anti-EGFRvIII bzw. anti-Cripto und somit die SAR-Expression nachgewiesen werden. In der untransduzierten Kontrolle zeigte sich keine unspezifische Antikörperbindung. Die Transduktionseffizienz des C3- bzw. E3-SAR lag bei 30 – 55 % bzw. 40 – 60 % (Abbildung 3).

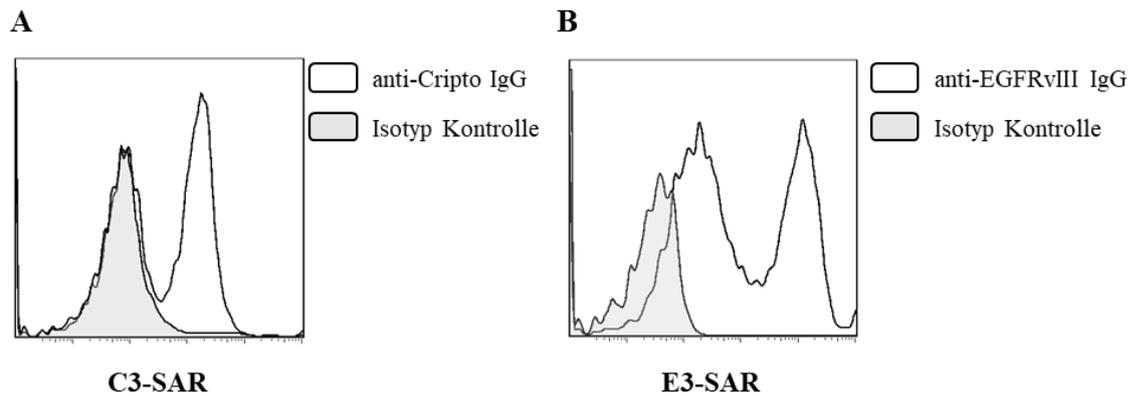


Abbildung 3: Expression des SAR auf T-Zellen

Durchflusszytometrie. (A) C3-SAR-Expression auf primären murinen T-Zellen. Primärantikörper anti-Cripto mAk. Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat anti human IgG. Isotyp Kontrolle Bcl 2-Antikörper (N19) polyclonal rabbit IgG. (B) E3-SAR-Expression auf primären murinen T-Zellen. Primärantikörper Cetuximab (anti-EGFR). Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat anti human IgG. Isotyp Kontrolle Rituximab. Dargestellt ist eine repräsentative Durchflusszytometrie SAR-transduzierter primärer T-Zellen für $n > 3$ unabhängige Transduktionen.

3.2 SAR-T-Zellstimulation

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass der SAR auf T-Zellen exprimiert wird. Im folgenden Versuch sollte die Funktionalität bzw. die Fähigkeit zur Aktivierung der SAR-T-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden SAR-T-Zellen in verschiedenen Kombinationen mit monospezifischem Antikörper, bispezifischem Antikörper, rekombinantem EpCAM und EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen kokultiviert. IFN- γ wird von aktivierten T-Zellen sezerniert (Ghanekar et al. 2001) und diente als Maß der T-Zellaktivierung. Die IFN- γ -Quantifizierung erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Für die C3- bzw. E3-SAR-T-Zellen wurde der monospezifische anti-Cripto- und der bispezifische anti-Cripto x anti-EpCAM-Antikörper bzw. der monospezifische anti-EGFR-Antikörper Cetuximab und der bispezifische anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle dienten untransduzierte, grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder E3^{del}- bzw. C3^{del}-transduzierte T-Zellen. E3^{del} bzw. C3^{del} sind Deletionsmutanten des SAR ohne aktivierende intrazelluläre Domäne.

3.2.1 Stimulation mit monospezifischem Antikörper

In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass Cetuximab und der anti-Cripto-Antikörper an die SAR-T-Zellen binden. Um zu untersuchen, ob die T-Zellen durch die mAk aktiviert werden können, wurden die Kulturplatten für 90 min mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen mAk inkubiert und anschließend die SAR-T-Zellen hinzugegeben. Die IFN- γ -Konzentration wurde nach 24 und 48 Stunden im zellfreien Überstände ermittelt.

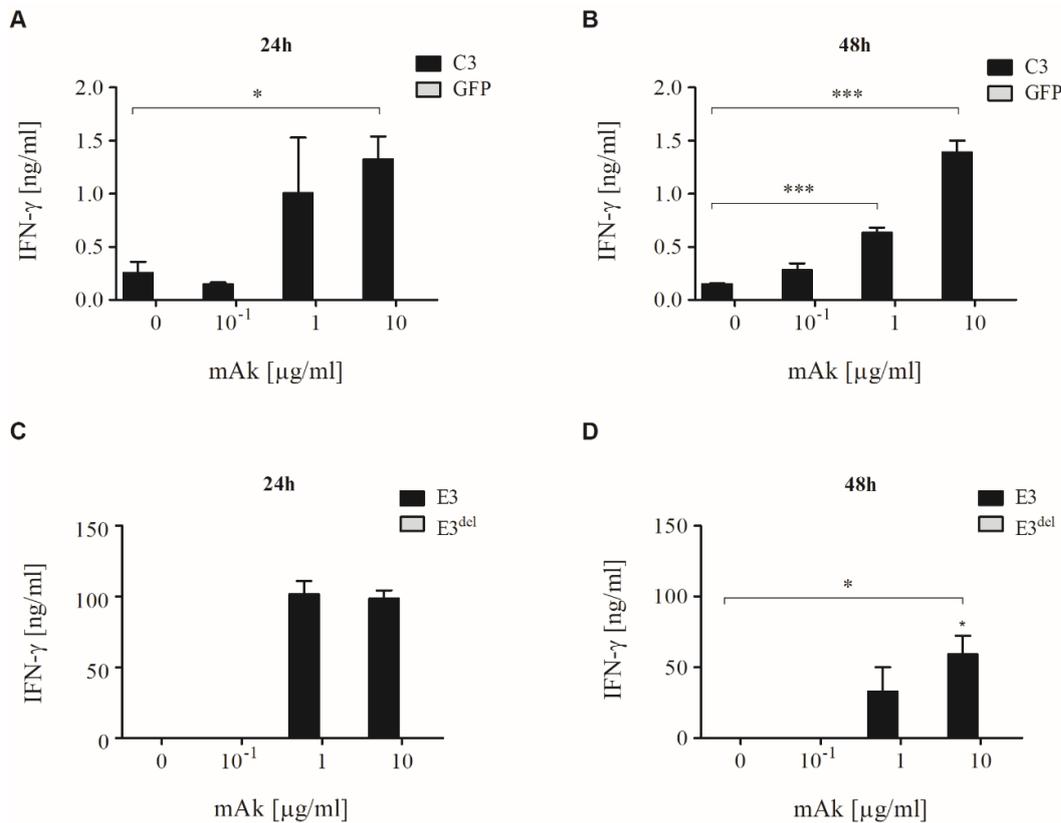


Abbildung 4: Zeitabhängige IFN- γ -Sekretion der SAR-T-Zellen nach Stimulation mit monospezifischem Antikörper.

96-well Platten wurden für 90 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen Cetuximab oder anti-Cripto mAk in 100 μ l PBS beladen und danach einmalig mit reinem PBS gewaschen. Anschließend wurden die SAR-T-Zellen in 100 μ l TCM hinzugegeben. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die IFN- γ -Sekretion im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. (A,B) $3,5 \times 10^5$ C3- bzw. GFP-T-Zellen (C,D) 5×10^5 E3-T-Zellen. Die Werte zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für $n = 3$ unabhängige Versuche. * zeigen das Signifikanzniveau zwischen SAR- und SAR^{del}- bzw. GFP-T-Zellen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ab einer Stimulation mit 0,1 μ g/ml mAk war bei C3-T-Zellen nach 24 Stunden IFN- γ nachweisbar, jedoch zeigten auch die unstimulierten C3-T-Zellen eine IFN- γ -Sekretion. Ab einer Stimulation mit 10 μ g/ml mAk war eine erhöhte IFN- γ -Sekretion messbar (Abbildung 4, A). Nach 48 Stunden Kokultur konnte bereits ab einer Stimulation mit 1 μ g/ml eine erhöhte IFN- γ -Sekretion im Vergleich zu den unstimulierten SAR-T-Zellen gemessen werden (Abbildung 4, B). Die Menge an sezerniertem IFN- γ korrelierte mit der eingesetzten Antikörperkonzentration. In den Negativkontrollen war zu keinem der beiden Zeitpunkte IFN- γ nachweisbar.

Die E3-T-Zellen sezernierten ab einer Stimulation mit 1 μ g/ml mAk sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden IFN- γ . Nach 24 Stunden konnte die IFN- γ -Sekretion nicht durch eine höhere mAk-Konzentration gesteigert werden. Nach 48 Stunden korrelierte die IFN- γ -Sekretion mit der mAk-Konzentration. Eine unspezifische IFN- γ -Sekretion der unstimulierten E3-T-Zellen fand nicht statt. Die E3^{del}-T-Zellen sezernierten kein IFN- γ (Abbildung 4, C+D).

Es konnte gezeigt werden, dass die SAR-T-Zellen über eine Antikörperbindung aktiviert werden. Für die Wirksamkeit der SAR-T-Zellen im Tumor sollte jedoch die Aktivierung durch den BiAk erfolgen. Dies wurde in den weiteren Versuchen untersucht.

3.2.2 Stimulation mit bispezifischem Antikörper

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob der bispezifische tetravalente anti-Cripto x anti-EpCAM- bzw. anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-Antikörper ebenfalls zur Aktivierung der SAR-T-Zellen führt und diese mit der eingesetzten Antikörpermenge korreliert. Für den Versuch wurden C3- bzw. E3-T-Zellen mit unterschiedlichen BiAk-Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert und anschließend die zellfreien Überstände auf IFN- γ analysiert.

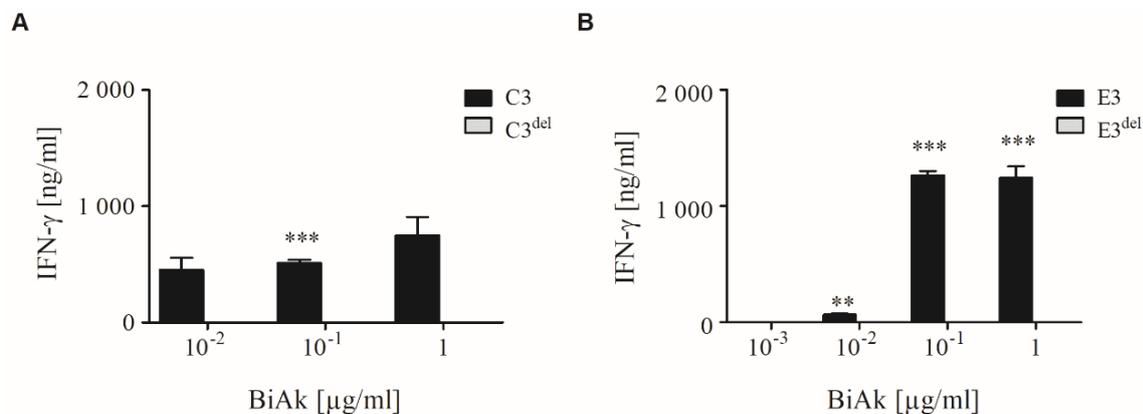


Abbildung 5: IFN- γ -Sekretion nach Stimulation mit bispezifischem Antikörper

2,5 x 10⁵ T-Zellen wurden in 100 μ l TCM mit aufsteigenden BiAk-Konzentrationen für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zu weiteren 100 μ l TCM auf 96-well Platten gegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die zellfreien Überstände mittels ELISA auf IFN- γ analysiert. (A) C3-T-Zellen (B) E3-T-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für n = 2 (A) bzw. n = 3 (B) unabhängige Versuche. * ohne Klammern zeigen das Signifikanzniveau zwischen SAR- und SAR^{del}-T-Zellen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

Sowohl bei den C3- als auch bei den E3-T-Zellen konnte bereits ab einer BiAk-Konzentration von 10⁻² μ g/ml eine IFN- γ -Sekretion und somit eine Aktivierung der SAR-T-Zellen durch den BiAk nachgewiesen werden. Eine Steigerung der IFN- γ -Konzentration war bei C3-T-Zellen begrenzt nachweisbar. Bei E3-T-Zellen stellte sich ab einer BiAk-Konzentration von 10⁻¹ μ g/ml ein Niveau ein, ab dem die IFN- γ -Sekretion nicht weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 5).

3.2.3 Simulation mit bispezifischem Antikörper und EpCAM

Im vorangegangenen Versuch wurden die SAR-T-Zellen durch eine einseitige Bindung des BiAk an den C3- bzw. E3-SAR aktiviert. In dem vorgestellten Therapiekonzept sollen die SAR-T-Zellen vor allem durch eine duale Bindung des BiAk im Sinne der SAR-BiAk-EpCAM-Interaktion direkt an die

Tumorzelle gebunden und über diese Bindung aktiviert werden. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, inwiefern sich eine duale Bindung des BiAk sowohl an den SAR als auch an das TAA EpCAM auf die Aktivität der SAR-T-Zellen auswirkt.

Es wurden zwei verschiedene Stimulationsverfahren mit rekombinantem EpCAM (rEpCAM) untersucht. Zunächst wurde rEpCAM auf einer Zellkulturplatte fixiert. Im ersten Stimulationsverfahren wurden die SAR-T-Zellen für 30 min mit BiAk beladen und dann der Platte mit rEpCAM zugegeben. In einem zweiten Stimulationsverfahren wurde der BiAk direkt auf die Platte mit dem fixierten rEpCAM gegeben und für 30 min inkubiert und anschließend die unstimulierten SAR-T-Zellen hinzugegeben. Beide Konditionen wurden für 48 Stunden kokultiviert und die Überstände auf IFN- γ analysiert.

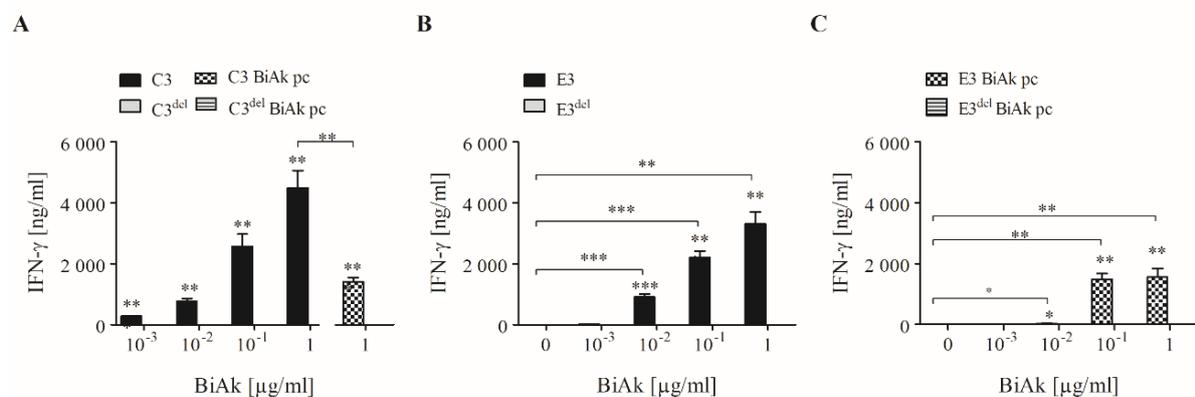


Abbildung 6: IFN- γ -Sekretion nach dualer BiAk-Bindung an SAR-T-Zellen und rEpCAM

96-well Platten wurden über Nacht mit 100 μ l (1 μ g/ml) rEpCAM beladen. Es wurden je $2,5 \times 10^5$ T-Zellen verwendet. Die T-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen BiAk in 200 μ l TCM stimuliert. Balken ohne Muster zeigen Daten für Konditionen, in denen SAR-T-Zellen für 30 min mit BiAk stimuliert und dann den Platten mit rEpCAM zugegeben wurden. Balken mit Muster zeigen Daten für Konditionen, in denen BiAk auf den Platten mit rEpCAM fixiert und erst im Anschluss die unstimulierten SAR-T-Zellen zugegeben wurden. Alle Konditionen wurden für 48 Stunden kokultiviert. Die zellfreien Überstände wurden mittels ELISA auf IFN- γ analysiert. (A) C3-T-Zellen, (B, C) E3-T-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sind repräsentativ für $n = 2$ (A, C) bzw. $n = 3$ (B) unabhängige Versuche. * ohne Klammern zeigen das Signifikanzniveau zwischen SAR- und SAR^{del}-T-Zellen. BiAk pc – BiAk precoated. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In beiden Stimulationsverfahren war sowohl bei C3- also auch bei E3-T-Zellen bereits bei geringer BiAk-Konzentration IFN- γ nachweisbar. Mit steigender BiAk-Konzentration konnte die IFN- γ -Sekretion gesteigert werden. Im Vergleich beider Stimulationsverfahren profitierten die SAR-T-Zellen davon, wenn der BiAk zuerst an die T-Zellen band und dann an rEpCAM (Abbildung 6). Bei E3-T-Zellen war dieser Effekt bei einer BiAk-Konzentration von 10^{-2} μ g/ml am stärksten ausgeprägt. Bei höheren BiAk-Konzentrationen war dieser Effekt nicht mehr so ausgeprägt zu sehen (Vergleich graphisch nicht dargestellt). Im Vergleich zu SAR-T-Zellen, die nur durch den BiAk alleine stimuliert wurden, war bei dualer Bindung des BiAk an den SAR sowie rEpCAM die IFN- γ -Sekretion deutlich höher.

3.2.4 Stimulation mit bispezifischem Antikörper in Kokultur mit EpCAM⁺ Brustkrebszellen

Die Aktivierung der SAR-T-Zellen durch mAk und BiAk konnte gezeigt werden. Als Nächstes wurde untersucht, ob die SAR-T-Zellen in Kokultur mit EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen aktiviert werden können.

4T1 Brustkrebszellen auf Balb/c-Maus Hintergrund dienen als geeignetes Tumormodell. Diese Zellen stellen ein relativ physiologisches Tumormodell dar. Sie exprimieren murines EpCAM auf ihrer Oberfläche (Shi et al. 2013). Für den Versuch wurden 4T1 Brustkrebszellen für 12 Stunden auf 96-well Platten bis zur Adhärenz inkubiert. Anschließend wurden mit BiAk stimulierte SAR-T-Zellen zugegeben und für 48 Stunden kokultiviert.

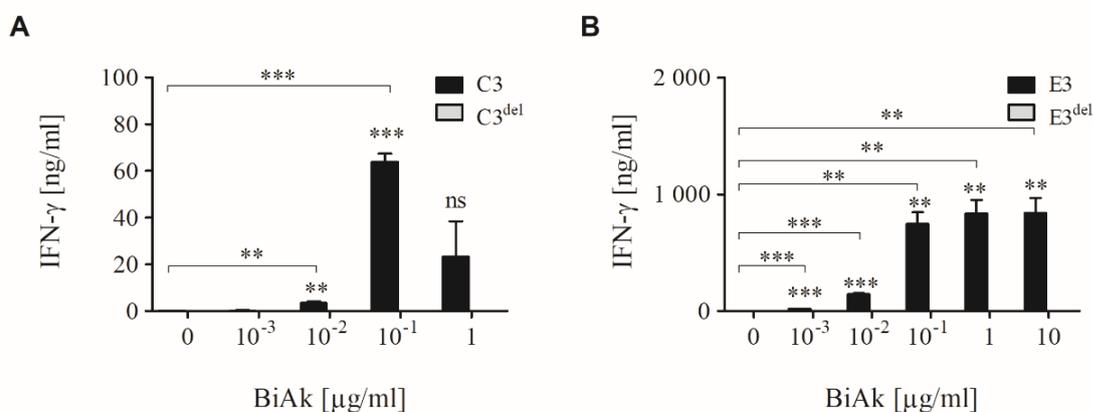


Abbildung 7: IFN- γ -Sekretion nach Kokultur von SAR-T-Zellen und EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen

3×10^4 4T1 Brustkrebszellen wurden für 12 Stunden bis zur Adhärenz inkubiert. $2,5 \times 10^5$ SAR-T-Zellen wurden in $200 \mu\text{l}$ TCM mit verschiedenen BiAk-Konzentrationen für 30 min stimuliert und anschließend den Tumorzellen zugegeben und für 48 Stunden kokultiviert. Die zellfreien Überstände wurden mittels ELISA auf IFN- γ analysiert. (A) C3-T-Zellen.

(B) E3-T-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM und sie repräsentativ für einen Einzelversuch (A) bzw. $n = 3$ (B) unabhängige Versuche. * ohne Klammern zeigen das Signifikanzniveau zwischen SAR- und SAR^{del}-T-Zellen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die SAR-T-Zellen konnten in Kokultur mit 4T1 Brustkrebszellen durch den BiAk aktiviert werden. Geringe BiAk-Konzentrationen waren für eine Aktivierung ausreichend. Bei C3-T-Zellen zeigte sich die maximale IFN- γ -Sekretion bei einer Stimulation mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ BiAk. Bei höherer BiAk-Konzentration war die IFN- γ -Sekretion rückläufig (Abbildung 7, A). Bei E3-T-Zellen korrelierte die IFN- γ -Sekretion mit der BiAk-Konzentration bis $10^{-1} \mu\text{g/ml}$, danach stellte sich ein Sekretionsplateau ein (Abbildung 7, B). Die E3-T-Zellen sezernierten in Kokultur mit 4T1 Brustkrebszellen ca. 15-fach mehr IFN- γ als C3-T-Zellen.

3.3 Clusterbildung aktivierter SAR-T-Zellen

Im Auflichtmikroskop wurde beobachtet, dass SAR-T-Zellen, anders als SAR^{del}-T-Zellen, unter Antikörperstimulation große Zellcluster bilden. Die Bildung von Zellclustern ist ein charakteristisches Kennzeichen aktivierter T-Zellen (Zumwalde et al. 2013). Die Bildung von Zellclustern wäre eine weitere Bestätigung, dass SAR-T-Zellen durch den BiAk aktiviert werden.

Zur Analyse und Quantifizierung der Zellcluster wurden diese anhand einer Kokultur aus E3-transduzierten und untransduzierten T-Zellen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Hierfür wurden E3-transduzierte und untransduzierte T-Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, im Verhältnis 1:1 gemischt und mit BiAk stimuliert (+ BiAk). Die stimulierten E3- bzw. untransduzierten T-Zellen wurden mit 4T1 Brustkrebszellen im Verhältnis 20:1 kokultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte E3- bzw. untransduzierte T-Zellen (- BiAk). Die Konditionen wurden anschließend unter dem Konfokalmikroskop hinsichtlich der Anzahl von Zellclustern, deren Größe und Zusammensetzung aus E3-transduzierten und untransduzierten T-Zellen untersucht. Als Zellcluster wurde eine Ansammlung \geq neun T-Zellen an einer Tumorzelle gewertet.

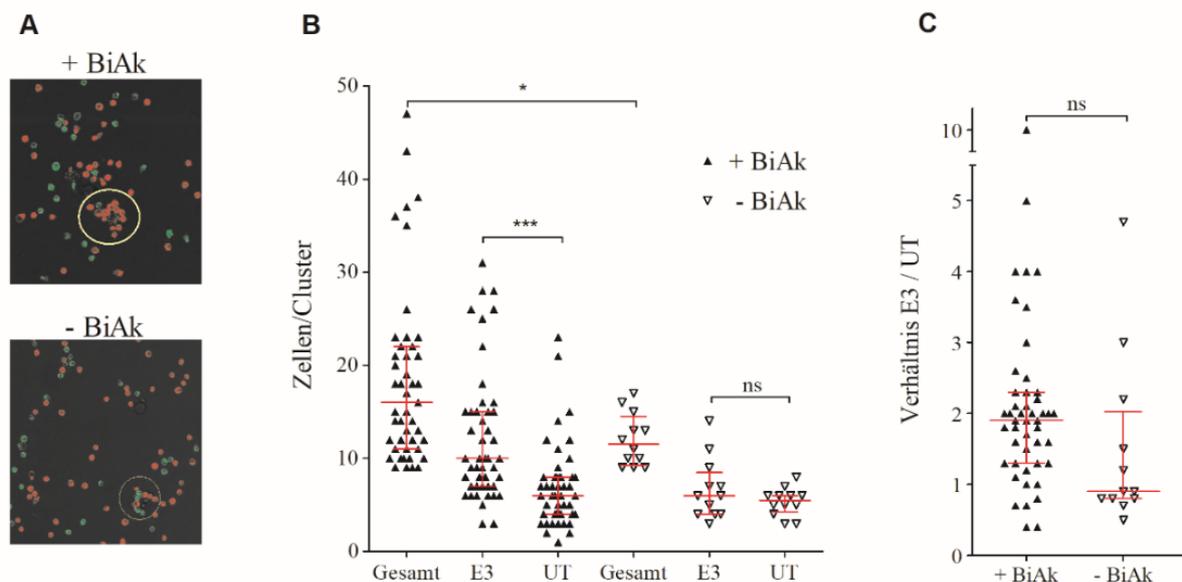


Abbildung 8: Clusterbildung aktivierter SAR-T-Zellen

E3-T-Zellen (rot) wurden mit untransduzierten T-Zellen (grün, UT) im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach 30 min Stimulation mit 1 μ g/ml BiAk (+ BiAk) bzw. ohne Stimulation (- BiAk) wurden diese mit 4T1 Brustkrebszellen im Verhältnis 20:1 für sieben bis neun Stunden kokultiviert. Die Kokulturen wurden mittels Konfokalmikroskopie auf Zellcluster analysiert. Ein Cluster wurde definiert als Ansammlung von \geq neun T-Zellen an einer Tumorzelle. Die Cluster wurden unter einem Konfokalmikroskop (Leica tcs sp5 confocal system) in 40 x Vergrößerung untersucht. Die Transduktionseffizienz für die E3-T-Zellen war 50 %. (A) Repräsentative Zellcluster. (B) Gesamtzellzahl pro Cluster. Anteil von E3-transduzierten und untransduzierten T-Zellen in Zellclustern + und - BiAk. (C) Verhältnis E3-transduzierte zu untransduzierten T-Zellen pro Cluster. Legende wie in (B). Angegeben ist der Median mit Interquartilsabstand. Gezeigt sind gepoolte Daten aus n = 3 unabhängigen Versuchen mit Unikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Signifikanzniveau * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Konditionen waren Zellcluster zu finden. In den + BiAk Konditionen waren diese deutlich zahlreicher und größer (Abbildung 8, B). Die Zellcluster in den + BiAk Konditionen bestanden im Median aus zwei Dritteln E3-transduzierten und einem Drittel untransduzierten T-Zellen, wohingegen in den - BiAk Konditionen die Zellcluster im Median zu gleichen Teilen aus E3-transduzierten und untransduzierten T-Zellen bestanden (Abbildung 8, C). Diese Werte sind statistisch nicht signifikant, beschreiben aber einen Trend.

3.4 Tumorlyse

Im nächsten Versuch wurden die SAR-T-Zellen auf ihre Fähigkeit zur Tumorlyse untersucht. Diese konnte mittels Impedanzmessung in Echtzeit verfolgt werden. 4T1 Brustkrebszellen wurden für 8 – 20 Stunden bis zum Erreichen einer ca. 95 %igen Konfluenz inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden mit BiAk stimulierte E3-T-Zellen im E3-T-Zell/Tumorzell-Verhältnis 10:1 hinzugegeben.

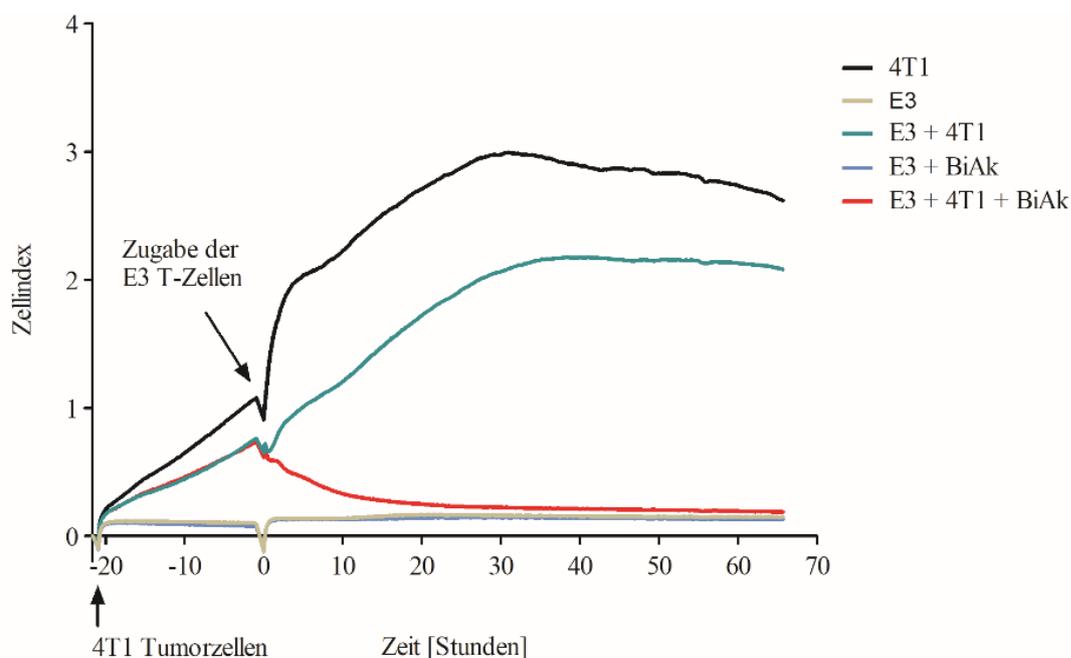


Abbildung 9: SAR-T-Zell-BiAk vermittelte Tumorlyse in Echtzeit.

4×10^4 4T1 Brustkrebszellen wurden für 20 Stunden auf 8-Well E-Platten inkubiert. Zu den Tumorzellen wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-BiAk stimulierte E3-T-Zellen im Verhältnis 10:1 zugegeben. Zeitpunkt „0“ entspricht dem Beginn der Kokultur. Das Tumorwachstum im zeitlichen Verlauf wurde mittels Impedanzmessung gemessen. Der Graph zeigt Mittelwerte von Duplikaten und ist repräsentativ für $n = 2$ unabhängige Versuche.

Der Versuch zeigt, dass der Zellindex der 4T1 Brustkrebszellen nach Beginn der Kokultur mit E3-T-Zellen und BiAk abfiel und die Tumorzellen vollständig lysiert wurden (Abbildung 9, rote Linie). Die Tumorzellen alleine zeigten einen Anstieg des Zellindexes und somit ein konstantes Wachstum. Die 4T1 Brustkrebszellen in Kokultur mit E3-T-Zellen ohne BiAk zeigten ebenfalls ein konstantes Wachstum, welches vergleichbar mit dem der 4T1 Brustkrebszellen war.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht Grundlagen für die Tumorimmuntherapie durch Kombination von synthetischem agonistischen Rezeptor (SAR)-modifizierter T-Zelle mit einem tetravalenten bispezifischen Antikörper. Die Klonierung und Oberflächenexpression der SAR Cripto 1 (C3) und EGFRvIII (E3) auf primären murinen T-Zellen konnte gezeigt und deren Funktionalität *in vitro* nachgewiesen werden. Die Aktivierung der SAR-T-Zellen war MHC-unabhängig und sowohl durch entsprechende mono- als auch bispezifische Antikörper möglich. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen eingesetzter Antikörperkonzentration und Ausmaß der SAR-T-Zellaktivierung. Diese unterschied sich hinsichtlich der Bindungsart des Antikörpers und war zwischen mono- und bispezifischen Antikörpern verschieden stark ausgeprägt. Durch BiAk aktivierte SAR-T-Zellen bildeten Zellcluster an EpCAM⁺ Tumorzellen und lysierten diese schnell und vollständig.

4.1 EpCAM als Zielantigen in der Immuntherapie

Der sichere und effiziente Einsatz einer Immuntherapie setzt geeignete Zielstrukturen auf Tumoren voraus. Für das vorgestellte Konzept sollte diese Zielstruktur spezifisch auf Tumorzellen exprimiert werden und für den BiAk zugänglich sein. Bislang konnten nur vereinzelt Strukturen identifiziert werden, die diesen Anforderungen gerecht werden.

Das *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) kommt zwar nicht exklusiv auf Tumorzellen vor, wird jedoch in vielen Tumoren überexprimiert (Went et al. 2006). Interessanterweise weist das ursprünglich gesunde Gewebe in Tumoren kein EpCAM auf, sondern exprimiert es erst im Laufe der Karzinogenese (Zorzos et al. 1995, Litvinov et al. 1996). Im gesunden Gewebe kommt EpCAM vor allem im Pankreas, Darm, Gallengängen und dem Brustgewebe vor (Lordick et al. 2008).

EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein, das als wichtiges interzelluläres Adhäsionsmolekül vor allem an der basolateralen Zellwand in Proteinkomplexen vorkommt (Ladwein et al. 2005). In dieser Form kann es nur begrenzt von Antikörpern erreicht werden (Balzar et al. 1999), weswegen Therapienebenwirkungen gering ausfallen sollten. In Tumoren liegt EpCAM als uniformes, membrangebundenes Protein und selten in Proteinkomplexen vor. In dieser Form ist es für therapeutische Antikörper zugänglich (Went et al. 2006, Amann et al. 2008). Allerdings zeigt EpCAM eine rasche Internalisierung nach Ligandenbindung von Aptameren (Shigdar et al. 2011). Inwiefern das bei gebundenen Antikörpern auftritt und deren Wirkmechanismen beeinflusst, muss weiter exploriert werden. Hinzu kommt, dass antigenpräsentierende Zellen durch EpCAM blockiert werden, was einer Erkennung durch das Immunsystem entgegenwirkt (Gutzmer et al. 2004).

In vielen Studien wurde EpCAM als Zielantigen für die Immuntherapie erprobt. Der hochaffine humanisierte anti-EpCAM-mAk ING-1 zeigte ein gutes klinisches Ansprechen bei Patienten mit fortgeschrittenen EpCAM-positiven Adenokarzinomen. Jedoch trat bei mehreren Patienten eine schwere akute Pankreatitis als dosislimitierende Nebenwirkung auf (de Bono et al. 2004). Es wird vermutet, dass der mAk aufgrund der hohen Affinität ebenfalls EpCAM im Pankreas bindet und dort zu Immunreaktionen und Gewebeschäden führt. Der humane mAk Adecatumumab, mit moderater EpCAM-Affinität, zeigte eine gute Verträglichkeit ohne dosislimitierende Nebenwirkung. Bei Patienten mit metastasiertem Brustkrebs zeigten sich rückläufige Metastasen und ein verzögertes Tumorwachstum. Allerdings profitierten lediglich die Patienten von Adecatumumab, deren Tumore eine hohe EpCAM-Expression aufwiesen, nicht jedoch die mit geringer EpCAM-Expression (Schmidt et al. 2010). In präklinischen Studien zeigte der anti-EpCAM-anti-CD3 BiTE Solitomab (MT110) bzw. dessen muriner Surrogat muS110 ein gutes Ansprechen ohne Nebenwirkungen (Amann et al. 2008). In einer Phase 1 Studie mit Solitomab kam es jedoch bei vielen Patienten zu ausgeprägter Diarrhoe und erhöhten Leberparametern. Aufgrund der starken Nebenwirkungen konnten im Serum keine therapeutische Antikörperlevel erreicht werden, weswegen eine antitumorale Wirkung ausblieb (Kebenko et al. 2018).

Die Studien zeigen, dass EpCAM aufgrund der starken Expression auf Tumorzellen einen vielversprechenden Biomarker für die Immuntherapie darstellt. Viele Antikörper binden jedoch EpCAM im gesunden Gewebe, was zu schweren Nebenwirkungen führt und den klinischen Einsatz aktueller anti-EpCAM-Therapieansätze stark limitiert. In der vorliegenden Arbeit dient EpCAM lediglich als Modellantigen und sollte in weiteren BiAk-Konstruktionen gegen geeignetere Zielantigene ersetzt werden.

4.2 SAR-Design

4.2.1 EGFRvIII und Cripto 1 als geeignete SAR-Markerantigene

Die Herausforderung unseres Konzeptes lag unter anderem in der Wahl eines geeigneten Markerproteins für den SAR. Dieses sollte physiologisch nicht im gesunden Gewebe exprimiert werden, um Fehlbindungen des BiAk zu verhindern. Zudem sollte es eine geringe Immunogenität aufweisen, um eine vorzeitige Eliminierung der SAR-T-Zellen durch das Immunsystem zu vermeiden. Mit dem humanen *epidermal growth factor receptor variant III* (EGFRvIII) und dem embryonalen Antigen Cripto 1 standen zwei geeignete Proteine zur Verfügung.

EGFRvIII ist eine Mutation von EGFR und konnte bislang nur auf Glioblastomzellen nachgewiesen werden. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine *in-frame*-Deletion der terminalen Exone 2 – 7 und umfasst die Aminosäuren von Position 6 – 273 nach dem Signalpeptid (Gan et al. 2013).

EGFRvIII weist keine Bindungsstelle für natürlich vorkommende Liganden auf, da sich diese in der deletierten Region befinden (Yamazaki et al. 1990). Jedoch führt die Mutation zu einer ligandenunabhängigen transienten Homodimerisierung des EGFRvIII und so zu einer konstitutiven Aktivierung der Tumorzellen (Luwor et al. 2004). Die Homodimere werden durch eine Disulfidbindung stabilisiert, welche außerhalb der BiAk-Bindungsstelle liegt (Ymer et al. 2011). Bei unseren Versuchen war keine E3-T-Zellaktivität ohne BiAk messbar. Sollte diese infolge einer spontanen SAR-Dimerisierung auftreten, könnte die Disulfidbindungsstelle zur Vermeidung einer Dimerisierung modifiziert werden. Des Weiteren zeigt EGFRvIII eine verminderte physiologische Internalisierung. Die Tumorzelle erhält so konstant Aktivierungs- und Proliferationssignale (Huang et al. 1997). Die verminderte Internalisierung wird durch eine Hypophosphorylierung eines Tyrosins an Position 1045 vermittelt (Han et al. 2006), welche bei dem E3-SAR nicht vorhanden ist. Die Internalisierungsdynamik des SAR sollte dennoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

Cripto 1 ist ein onkofetales GPI-verankertes Membranprotein, das zur Familie der EGF-CFC Proteine gehört und dem eine wichtige Rolle in der embryonalen Zelldifferenzierung und -migration zukommt (de Castro et al. 2010). Nach der Embryonalentwicklung wird Cripto 1 nicht oder nur noch in sehr geringem Maße im gesunden Gewebe exprimiert. Dagegen zeigen sich in vielen Tumoren hohe Expressionsraten (Bianco et al. 2005). Eine Bindung des anti-Cripto x anti-EpCAM-BiAk an von Tumoren exprimiertes Cripto könnte bei Patienten die BiAk-Serumkonzentration verringern. Dem könnte mit einer höheren BiAk-Dosierung begegnet werden.

Cripto fungiert als Kolligand und als Korezeptor für Peptide wie Nodal aus der *transforming growth factor* β (TGF β) Superfamilie (Watanabe et al. 2007). Nodal kommt wie Cripto nur während der Embryogenese vor, kann aber im Rahmen der Karzinogenese wieder exprimiert werden (Lawrence et al. 2011). Eine vollständige Aktivierung der Cripto-Nodal-Signalkaskade setzt voraus, dass Cripto als am Serin161 GPI-verankertes Protein vorliegt. Bei dem C3-SAR ist Cripto an eine Transmembrandomäne (TM) gebunden und das Serin161 ist nicht vorhanden. Eine C3-SAR-Nodal-Interaktion mit SAR-T-Zellaktivierung als unerwünschte Nebenwirkung wäre zwar möglich, sollte aber gering ausfallen. Weiterhin kann Cripto TGF- β binden und dessen Signalwege hemmen (Gray et al. 2006). Die C3-T-Zellen zeigten ohne Antikörperstimulation eine geringe IFN- γ -Sekretion. Ob diese durch Nodal, TGF- β oder einen anderen Liganden vermittelt wurde, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Naheliegender wäre jedoch, dass diese durch eine Dimerisierung der CD8 *Hinge*-Region vermittelt wird, wie es bei CAR beschrieben ist (Rodgers et al. 2016).

4.2.2 Ko-Stimulatoren im SAR-Design

Naive T-Zellen benötigen neben dem TZR-Signal ein zusätzliches ko-stimulierendes Signal für eine vollständige Aktivierung. Ohne dieses Signal können T-Zellen nicht ausreichend IL-2 produzieren, was folglich zur einer verminderten Proliferation, Anergie und Apoptose führt (Harding et al. 1992). Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurden unsere SAR, analog einem CAR der zweiten Generation, neben der aktivierenden CD3 ζ -Domäne mit einer ko-stimulierenden CD28-Domäne ausgestattet.

CD28 vermittelt das wichtigste ko-stimulierende Signal der frühen T-Zellaktivierung. Über einen Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-Grb-2-Signalweg wird die IL-2-Sekretion induziert, die für die T-Zellproliferation und -differenzierung zu T-Effektorzellen erforderlich ist (Esensten et al. 2016). Zudem vermittelt CD28 die Expression antiapoptotischer Proteine, die die T-Zellen vor dem *activation-induced T cell death* (AICD) schützen (Mueller et al. 1996). Dementsprechend zeigen CD28-CAR eine frühe und schnelle T-Zellaktivierung mit Bildung von Effektor-Gedächtniszellen (Salter et al. 2018). CD28-CD3 ζ -CAR-T-Zellen zeigten im Vergleich zu CD3 ζ -CAR-T-Zellen eine vergleichbare Tumorlyse, jedoch eine deutlich gesteigerte IFN- γ - und IL-2-Sekretion (Hombach et al. 2001) sowie eine längere Persistenz und gute anti-tumorale Wirkung (Kowolik et al. 2006). Im Vergleich zu einem 4-1BB-CAR zeigte ein CD28-CAR eine schnellere Aktivierung und Tumorlyse bei weit niedrigerer Effektor:Target-Ratio (E:T)(Zhao et al. 2015). In klinischen Studien befinden sich mehrere CD28-CAR, von denen einer bereits für die Behandlung von B-Zell-Lymphomen zugelassen ist und eine gute Wirkung zeigt (Locke et al. 2019).

Alternative Proteine wie *inducible T cell costimulator* (ICOS), 4-1BB oder OX40 werden ebenfalls als potenzielle und effiziente Ko-Stimulatoren in CAR erforscht, unterscheiden sich aber hinsichtlich der vermittelten Effektorfunktionen von CD28.

ICOS ist ein Protein der CD28-Familie und induziert ebenfalls einen PI3K/Akt-Signalweg. Die ICOS vermittelte PI3K-Signalwegaktivierung fällt stärker aus als bei CD28. Jedoch kann aufgrund einer fehlenden Grb-2 Bindung keine IL-2-Sekretion induziert werden, sodass ICOS bei der Aktivierung naiver T-Zellen CD28 nicht ersetzen kann (Harada et al. 2003). ICOS-CAR zeigten zwar in diversen T-Zellsubpopulationen eine effiziente Tumorlyse, sind jedoch aufgrund der fehlenden IL-2-Sekretion CD28-CAR unterlegen (Guedan et al. 2014).

4-1BB gehört zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie und wird auf ruhenden CD8⁺ und aktivierten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Nach 4-1BB-Ko-Stimulation wird überwiegend die Expansion CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen vermittelt (Zhang et al. 2007). 4-1BB induziert nur

geringfügig die IL-2-Sekretion, potenziert aber die CD28 vermittelte IL-2-Sekretion (Wen et al. 2002). Somit ist 4-1BB wichtig für die Aufrechterhaltung der T-Zellaktivität und -expansion, nicht aber für die initiale T-Zellaktivierung. Zudem triggert 4-1BB die Expression antiapoptotischer Proteine und prolongiert das Überleben der T-Zellen (Lee et al. 2002). 4-1BB-CAR führen über ein umfangreiches proinflammatorisches Zytokinprofil zu einer guten anti-tumoralen Wirkung (Song et al. 2011). Im Vergleich zu CD28-CAR-T-Zellen zeigten die 4-1BB-CAR-T-Zellen eine längere Persistenz *in vivo* und eine vermehrte Bildung von CD8⁺ zentralen Gedächtniszellen (Kawalekar et al. 2016). Mehrere 4-1BB-CAR befinden sich in klinischen Studien mit bislang vielversprechenden Ergebnissen bei Patienten mit refraktärer B-ALL (Maude et al. 2014).

OX40 ist ein weiteres Mitglied der TNFR-Superfamilie und wird ebenfalls erst auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Es ist für die Aufrechterhaltung der T-Zellaktivität, die klonale Expansion von Gedächtnis- und Effektorzellen und deren Überleben wichtig, nicht aber für die initiale T-Zellaktivierung (Croft et al. 2009). OX40 wirkt im Gegensatz zu 4-1BB überwiegend in CD4⁺ T-Zellen. Ein OX40-CAR konnte keine IL-2-Sekretion induzieren, aber in Kombination mit CD28 die Sekretion deutlich steigern (Hombach et al. 2001). Darüber hinaus reduzierte OX40 in einem CD28-CD3 ζ -OX40-CAR die CD28 vermittelte Sekretion des immuninhibierenden IL-10 (Hombach et al. 2012). Allerdings zeigte OX40 in Kombination mit CD28 ein deutlich reduziertes Zytokinprofil und eine schlechtere anti-tumorale Wirkung im Vergleich zu einem CD28-4-1BB-CD3 ζ -CAR (Quintarelli et al. 2018).

Die Ko-Stimulatoren ergänzen die CAR mit bestimmten, aber diversen Effektoreigenschaften, führen jedoch auch zu Komplikationen. In der Literatur wird beschrieben, dass CAR-T-Zellen mit Ko-Stimulatoren zu starker Neurotoxizität oder auch antigenunabhängig zu dem lebensbedrohlichen CRS führen können (Neelapu et al. 2017, Park et al. 2018). Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass sich CAR-T-Zellen aufgrund einer anhaltenden Aktivierung erschöpfen und wirkungslos werden (Long et al. 2015). Dennoch scheinen sich die CAR mit Ko-Stimulatoren denen ohne Ko-Stimulatoren als überlegen zu erweisen. Die verschiedenen Effektoreigenschaften sind nicht gleichermaßen erforderlich, sondern können den Tumorentitäten entsprechend eingesetzt werden. Die zuvor erwähnten klinischen Studien legen nahe, dass Patienten mit aggressivem B-NHL eher von einem CD28-CAR mit starker früher T-Zellaktivität profitieren, wohingegen Patienten mit B-ALL eher von einer langanhaltenden CAR-T-Zellpersistenz durch einen 4-1BB-CAR profitieren.

Unsere CD28-SAR vermittelten MHC-unabhängig eine SAR-T-Zellaktivität mit hoher IFN- γ -Sekretion, Bildung von Zellclustern und rascher Tumorlyse. Inwiefern die SAR von den verschiedenen ko-stimulierenden Domänen profitieren, sollte eingehender untersucht werden.

4.2.3 Die *Non-signaling-hinge*-Region im SAR-Design

Neben den diversen ko-stimulierenden Domänen erlangt das Design der extrazellulären *Non-signaling-hinge*-Region zunehmend eine wichtige Rolle hinsichtlich der Funktionalität der CAR-T-Zellen (Moritz & Groner 1995). Eine *Hinge*-Region besteht aus einer kurzen Aminosäuresequenz und verbindet die scFv Region mit der TM eines CAR. Häufig besteht sie aus Domänen von Immunglobulinen, CD4 oder CD8 (Guest et al. 2005). Guest et al. beschreiben einen Einfluss der *Hinge*-Region, der sich sowohl positiv als auch negativ auf die Zytokinsekretion und die anti-tumorale Zytotoxizität auswirken kann. Vermutet wird, dass Antigene, deren Zielepitope nah an der Plasmamembran liegen, für die scFv-Domäne der CAR eingeschränkt zugänglich sind. Dadurch können die CAR-T-Zellen nicht optimal an ihr Zielantigen binden und werden nur vermindert aktiviert. Das Zielantigen soll durch eine höhere Flexibilität der scFv-Domäne durch die *Hinge*-Region besser adressierbar sein. CAR, deren Zielepitop fern von der Plasmamembran liegt, scheinen nicht von einer *Hinge*-Region zu profitieren (Guest et al. 2005).

Im Gegensatz zu den CAR-T-Zellen findet bei dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten SAR-Konzept keine direkte Bindung der T-Zellen an die Tumorzellen statt. Die Bindung erfolgt durch einen BiAk als Adaptermolekül im Sinne einer immunologischen Koppelung. Zur Gewährleistung einer guten Zugänglichkeit des BiAk zur entsprechenden SAR-Bindungsstelle wurde, analog des zuvor diskutierten Einflusses einer *Hinge*-Region, die mögliche Antikörperbindungsstelle berücksichtigt. Bei dem E3-SAR dient EGFRvIII als Zielstruktur des BiAk. Im Vergleich zu EGFR weist EGFRvIII eine *in-frame*-Deletion der Exone 2 – 7 auf (Gan et al. 2013). Die dadurch entstandene Verbindung der Exone 1 und 8 beinhaltet die Antikörperbindungsstelle für den anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-BiAk. Diese liegt in der Nähe des N-Terminus, ca. 350 Aminosäuren von der Plasmamembran entfernt (Landry et al. 2001). Der parentale anti-EGFRvIII-Antikörper des BiAk, MR1.1, weist eine gute Zugänglichkeit und Affinität gegenüber der Bindungsstelle auf (Kuan et al. 2000). Aus diesem Grund wurde bei dem E3-SAR auf eine *Hinge*-Region verzichtet.

Im Vergleich dazu weist der C3-SAR Cripto 1 als Zielstruktur des anti-Cripto x anti-EpCAM-Antikörpers auf. Die exakte Bindungsstelle des parentalen anti-Cripto-Antikörpers (LC020 H3L2D1, Fa. Roche, Penzberg) ist bislang unbekannt. Cripto besteht aus ca. 120 Aminosäuren. Daraus resultiert eine deutlich geringere Distanz der möglichen Bindungsstelle zur Plasmamembran im Vergleich zu dem E3-SAR. Um diesen Unterschied teilweise auszugleichen und eine gute räumliche Voraussetzung für die Antikörperbindung zu schaffen, wurde der C3-SAR zusätzlich mit einer 44 Aminosäuren großen CD8 α *Hinge*-Region versehen. Diese befindet sich zwischen Cripto und der TM.

In weiteren Experimenten sollten SAR mit alternativen ko-stimulierenden Domänen, *Hinge*-Regionen und Transmembrandomänen untersucht und diese, wie bei CAR der dritten Generation, kombiniert werden. Dadurch könnten synergistische Effekte der jeweiligen ko-stimulierenden Domänen erzeugt und die anti-tumorale Potenz der SAR-T-Zellen gesteigert werden.

4.3 Aktivierung der SAR-T-Zellen durch monospezifische Antikörper

Voraussetzung für die Bindung des BiAk und die Aktivierung der T-Zellen ist die Expression der SAR. Sowohl der C3- als auch der E3-SAR konnten nach retroviraler Transduktion mit einer Expressionsrate von 30 – 55 % (C3) bzw. 40 – 60 % (E3) auf murinen T-Zellen nachgewiesen werden. Diese sind vergleichbar mit Expressionsraten bei CAR-T-Zellen (Sun et al. 2015).

Der für die Krebstherapie zugelassene monospezifische anti-EGFR-Antikörper Cetuximab bindet kompetitiv an die Domäne III des EGFR. Dadurch wird die Dimerisierung, Phosphorylierung und folglich die Aktivierung der entsprechenden Zelle verhindert (Li et al. 2005). Patel et al. konnten zeigen, dass Cetuximab ebenfalls das auf Glioblastomzellen exprimierte EGFRvIII in Domäne III bindet. Dies führte innerhalb kurzer Zeit zu einer Internalisierung des EGFRvIII-Cetuximab-Komplexes, reduzierter Phosphorylierung bzw. Aktivität von EGFRvIII und schließlich zu einer verminderten Proliferation der Tumorzellen (Patel et al. 2007). Demgegenüber hatte Cetuximab interessanterweise einen aktivierenden Einfluss auf die E3-T-Zellen. Inwiefern Cetuximab die Struktur des E3-SAR modifiziert und über welchen Signalweg die Aktivierung eingeleitet wird, ist bislang nicht bekannt.

Jutten et al. zeigten, dass durch Cetuximab EGFRvIII auf Tumorzellen herunter reguliert wird (Jutten et al. 2009). Gleiche Effekte konnten bei Antikörperbindung an humanes EGFR beobachtet werden (Sunada et al. 1986, Perera et al. 2007). Die im zeitlichen Verlauf verminderte IFN- γ -Sekretion bei stimulierten E3-T-Zellen könnte ebenfalls durch eine Internalisierung des E3-Cetuximab-Komplexes verursacht sein. Cetuximab persistiert im Blut über Tage, sodass nicht mit einer Abdiffundierung innerhalb von 48 Stunden zu rechnen und die verminderte IFN- γ -Sekretion nicht erklärbar ist (Tan et al. 2006). Für Cripto ist in der Literatur bislang kein solcher Internalisierungseffekt beschrieben.

Im direkten Vergleich scheinen die E3- den C3-T-Zellen nach Stimulation mit mAk überlegen zu sein. Die IFN- γ -Sekretion ist um das 50- bis 100-fache erhöht. Mehrere kleine Unterschiede im Design der SAR könnten diesen Effekt erklären. Die Expressionsraten des C3-SAR lagen im Mittel unter denen des E3-SAR. Zur Steigerung der Synthese, und folglich der Expression, wurde der C3-SAR zusätzlich mit einer Igk *Leader*-Sequenz versehen (Ramezani et al. 2017). Dadurch konnte die Expressionsrate jedoch nicht gesteigert werden. Des Weiteren weisen der C3-SAR mit CD8 und der E3-SAR mit

CD28 unterschiedliche TM auf, die ebenfalls einen Einfluss auf die Expression und Signalweiterleitung haben. Zhang et al. zeigten, dass CAR sowohl mit CD8 als auch CD28 als TM auf T-Zellen exprimiert werden, die Expression mit CD28 TM jedoch deutlich höher ausfällt (Zhang et al. 2012). Dem gegenüber steht eine Studie von Zhao et al. die zeigte, dass eine stabile Oberflächenexpression überwiegend von der Intrazellulärdomäne und nicht von der TM vermittelt wird (Zhao et al. 2006). Diese ist bei dem C3- und E3-SAR mit CD28 jedoch identisch. Finney et al. zeigten, dass CAR am besten auf der Oberfläche exprimiert werden, wenn sowohl die Transmembran- als auch die Intrazellulärdomäne von einem Protein stammen (Finney et al. 1998), was bei dem E3-SAR mit CD28 der Fall ist. Ein weiterer Grund für die unterschiedliche IFN- γ -Sekretion könnte die Bindungsstelle des anti-Cripto-mAk sein. Diese ist bislang unbekannt, weswegen keine Aussage über die Zugänglichkeit des anti-Cripto-mAk getroffen werden kann. In weiteren Versuchen wäre diese zu identifizieren, um die Bindungseigenschaften und die *Hinge*-Region zu optimieren. In den Stimulationsversuchen mit dem BiAk näherten sich die durch den C3- und E3-SAR induzierten IFN- γ -Sekretionen an, sodass ebenfalls das Format der mAk für die unterschiedliche IFN- γ -Sekretion ursächlich sein könnte.

4.4 Aktivierung der SAR-T-Zellen durch bispezifische Antikörper

Die C3- und E3-T-Zellen konnten durch die BiAk MHC-unabhängig aktiviert werden. Es zeigte sich, dass die IFN- γ -Sekretion höher ausfiel, wenn der BiAk an den SAR sowie EpCAM band und die T-Zellen dadurch immobilisiert wurden. Diese Daten decken sich mit einer Studie von Geppert und Lipsky, die zeigte, dass immobilisierte im Vergleich zu löslichen Antikörpern das Liganden *cross-linking* und die T-Zellaktivierung verstärken (Geppert & Lipsky 1988).

Des Weiteren zeigten Schmitt et al., dass die Reihenfolge der BiAk Bindung einen Einfluss auf die T-Zellaktivität hat. Catumaxomab, ein trifunktionaler BiAk (anti- α CD3 x anti- α EpCAM), konnte mononukleäre Zellen (PBMC) an EpCAM⁺ Tumorzellen rekrutieren und aktivieren. Hierbei war die initiale Aktivierung gleichwertig, unabhängig ob zuerst die PBMC mit dem BiAk beladen und dann den Tumorzellen hinzugegeben wurden oder in umgekehrter Reihenfolge. Jedoch waren PBMC deutlich länger aktiv, wenn sie vor den Tumorzellen mit BiAk beladen wurden (Schmitt et al. 2004). Die SAR-T-Zellen wurden ebenfalls stärker aktiviert, wenn der BiAk zuerst an den SAR und dann an rEpCAM band. Die durch Catumaxomab aktivierten PBMC sezernierten im Vergleich zu den SAR-T-Zellen weniger IFN- γ . Jedoch fand nur eine Aktivierung der PBMC in Kokultur mit EpCAM⁺ Tumorzellen und Catumaxomab statt. PBMC konnten nicht allein durch Catumaxomab aktiviert werden. In Studien mit den *bispecific T-cell engager* (BiTE) Solitomab (anti-CD3 x anti-EpCAM) und Blinatumomab (anti-CD3 x anti-CD19) waren ebenfalls die drei Komponenten BiTE, Tumorzelle und T-Zelle für eine T-Zellaktivierung erforderlich (Brischwein et al. 2007). Die Autoren vermuten, dass

die T-Zellen nicht primär durch den BiTE aktiviert, sondern primär in räumliche Nähe zur Tumorzelle gebracht und dadurch immunologische Synapsen gebildet werden. Diese führen zur Aktivierung der T-Zellen (Brischwein et al. 2006, Offner et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnten die SAR-T-Zellen allein durch den gebundenen mAk oder löslichen BiAk, ohne EpCAM, aktiviert werden. Der BiAk diente somit nicht nur einer mechanischen Kopplung, sondern war für die Aktivierung essenziell. In Kokultur mit Tumorzellen fiel die IFN- γ -Sekretion sogar geringer aus als mit rEpCAM. Inwiefern die immunologischen Synapsen einen Einfluss auf die SAR-T-Zell-Tumor-Interaktion haben, muss weiter exploriert werden.

Eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen ohne Bindung des Tumorantigens trat bei den erwähnten BiAk Studien von Schmitt et al. und Brischwein et al. nicht auf. Die EpCAM-unabhängige BiAk vermittelte SAR-T-Zellaktivierung ist ein Nachteil des Konzeptes und birgt die Gefahr einer T-Zellaktivierung außerhalb des Tumors. Dem liegt das tetravalente 2 + 2 Format des BiAk, mit zwei Bindungsarmen für den SAR, zugrunde. Dieses begünstigt das *cross-linking* der SAR (Karches et al. 2019). Karches et al. konnten zeigen, dass ein neues 2 + 1 BiAk-Format, mit einem Bindungsarm für den SAR, keine unspezifische SAR-T-Zellaktivierung induzierte. Brischwein et al. beschreiben ein vergleichbares Phänomen. T-Zellen konnten nicht durch das monomere Solitomab, jedoch durch eine dimere Variante mit zwei Bindungsarmen für CD3 aktiviert werden. Diese begünstigt das *cross-linking* und die Signalweiterleitung von CD3 (Brischwein et al. 2007).

Ein Nachteil der BiTE und anderer rekrutierender BiAk ist die Bindung und Aktivierung aller CD3⁺ T-Zellsubpopulationen. Die aktuelle Datenlage, inwiefern z. B. regulatorische T-Zellen durch anti-CD3-BiAk rekrutiert werden und ob deren Einfluss auf die Therapie dann positiv oder negativ ausfällt, ist sehr konträr (Choi et al. 2013, Koristka et al. 2014). Ein Vorteil des SAR-Konzeptes ist die spezifische Aktivierung der SAR-T-Zellen. Hierbei können verschiedene T-Zellsubpopulationen SAR modifiziert und über den gleichen BiAk aktiviert werden.

4.5 SAR-T-Zell-Tumor-Interaktion

SAR-T-Zellen in Kokultur mit EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen sezernierten weniger IFN- γ als in Kokultur mit rekombinantem EpCAM. Dennoch zeigten E3-T-Zellen eine effiziente Tumorlyse.

Ein wichtiger *Immunescape*-Mechanismus von Tumorzellen ist die Suppression des Immunsystems. Zur physiologischen Regulation des Immunsystems exprimieren T-Zellen nach Aktivierung inhibitorische Rezeptoren wie PD-1, LAG 3 (*lymphozyten-activation gene 3*), TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) oder CTLA 4 (Legat et al. 2013, Hahn et al. 2017). Tumorzellen exprimieren die entsprechenden Rezeptorliganden auf ihrer Oberfläche und supprimieren

auf diesem Weg das Immunsystem. In der Literatur wird eine Überexpression des PD-1 Liganden auf Tumorzellen, die IFN- γ ausgesetzt sind, beschrieben (Dong et al. 2002). Diese Mechanismen könnten einer verminderten IFN- γ -Sekretion der SAR-T-Zellen in Kokultur mit 4T1 Brustkrebszellen zugrunde liegen. Wie zuvor erwähnt, sind für EGFRvIII-Cetuximab-Komplexe Internalisierungsprozesse beschrieben. Denkbar wäre, dass diese ebenfalls bei EGFRvIII-BiAk-Komplexen stattfinden und bei SAR-T-Zellen in Kokultur mit Tumorzellen stärker ausgeprägt sind als in Kokultur mit rEpCAM oder BiAk allein. Zum Verständnis dieser Effekte sollte der Phänotyp der Tumor- und T-Zellen eingehender analysiert werden.

Einen weiteren Einfluss auf die T-Zellaktivität haben die Antigendichte und Antigenexpression. Oberst et al. konnten in einer Studie mit dem BiTE MEDI-565 (anti-CEA x anti-CD3) zeigen, dass mit steigender Antigendichte die Effizienz des BiTE abnahm bzw. eine höhere BiTE-Konzentration für eine Tumorlyse erforderlich war. Durch die hohe Antigendichte können die Antikörper ihr Ziel nur bedingt binden und die Ausbildung immunologischer Synapsen zwischen T- und Tumorzelle wird blockiert (Oberst et al. 2014). Analog zu diesen Daten ist für die T-Zellaktivierung über den TZR eine geringe Antigendichte ausreichend. Vermutet wird eine serielle Aktivierung vieler hochsensitiver TZR durch ein einzelnes Antigen. Ermöglicht wird das durch eine niedrige Affinität des TZR gegenüber dem Antigen und eine damit verbundene schnelle Lösung des TZR. Das Antigen ist dadurch wieder zugänglich für eine weitere TZR-Bindung (Valitutti et al. 1995).

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen scheint bei CAR-T-Zellen die Aktivität mit der Antigendichte zu korrelieren. Eine höhere Antigendichte bewirkt eine gesteigerte Aktivität und effizientere Tumorlyse der CAR-T-Zellen (Chmielewski et al. 2011). In der Literatur ist die EpCAM-Expression auf 4T1 Brustkrebszellen als sehr hoch, aber heterogen beschrieben (Shi et al. 2013). Bei unseren Versuchen wurde sie nicht explizit analysiert, sodass keine Aussage bzgl. einer Korrelation zwischen Antigendichte und SAR-T-Zellaktivität getroffen werden kann.

Des Weiteren bedingt eine höhere CAR-Affinität eine gesteigerte T-Zellaktivität (Chmielewski et al. 2011). Die von Chmielewski et al. untersuchten CAR-T-Zellen zeigten ab einer Affinität von $10^{-8} - 10^{-11}$ M eine maximale CAR-T-Zellaktivität bei Bindung an rekombinantes Antigen. Bei Bindung an Tumorzellen war die maximale CAR-T-Zellaktivität bei einer Affinität von 10^{-8} M erreicht. BiTE weisen mit einer Affinität von $10^{-7} - 10^{-9}$ M eine vergleichbare Affinität gegenüber CD3 auf (Dreier et al. 2002). Die Affinität des anti-Cripto x anti-EpCAM- und des anti-EGFRvIII x anti-EpCAM-BiAk sind bislang unbekannt. Die parentalen Antikörper des BiAk weisen mit einer Affinität des MR1.1 (anti-hEGFRvIII) von $1,5 \times 10^{-9}$ (Kuan et al. 2000) und des G8.8 (anti-muEpCAM) von $6,1 \times 10^{-8}$ (Kobold et al. 2015) vergleichbare Affinitäten wie die BiTE und die beschriebenen CAR auf. Zur weiteren Optimierung unseres Therapiekonzeptes aus AZT und BiAk

wäre sowohl die Kenntnis der Affinität des BiAk als auch der Einfluss der Tumorantigendichte auf die Aktivität der SAR-T-Zellen hilfreich und soll in weiteren Experimenten untersucht werden.

Neben der Zytokinsekretion ist die Bildung von Zellclustern ein Merkmal der T-Zellaktivierung (Zumwalde et al. 2013). In Kokultur mit 4T1 Brustkrebszellen und BiAk bildeten E3-T-Zellen Zellcluster. Ohne BiAk bildeten sich ebenfalls Cluster, die jedoch weniger und deutlich kleiner waren. Riesenberg et al. zeigten die Bildung von visuell größeren Zellclustern nach Kokultur von PBMC, Tumorzellen und BiAk. Essenziell für die Zellcluster waren die PBMC und der BiAk, jedoch nicht die Tumorzellen (Riesenberg et al. 2001). Im Unterschied zu unserem Versuch, wurden die PBMC in der Studie mit einer höheren E:T-Ratio (25:1) und deutlich länger kokultiviert. Zudem lag die Transduktionseffizienz des E3-SAR bei ca. 50 %, sodass insgesamt mehr untransduzierte T-Zellen als E3-T-Zellen vorhanden waren. Dieser technisch bedingte Unterschied führt zu einer Unterschätzung des Clustereffekts. Zudem scheinen die untransduzierten T-Zellen parakrin durch die stimulierten E3-T-Zellen mitaktiviert zu werden (Sabatos et al. 2008).

Unabhängig von der BiAk-Affinität, der EpCAM-Dichte und möglichen immunsuppressiven Einflussfaktoren konnten die BiAk-aktivierten SAR-T-Zellen Tumorzellen lysieren. In Kokultur mit 4T1 Brustkrebszellen und BiAk beladenen E3-T-Zellen setzte umgehend die Tumorlyse ein, welche innerhalb weniger Stunden vollständig war. Karches et al. konnten vergleichbare Tumorlyseeigenschaften gegenüber EpCAM-transduzierten Pankreaskarzinom- und Melanomzellen zeigen (Karches et al. 2019). In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, dass durch BiAk in Kombination mit PBMC oder durch CAR-T-Zellen eine vollständige Tumorlyse induziert werden kann (Loffler et al. 2000, Kowolik et al. 2006, Oberst et al. 2014).

Mit Blinatumomab aktivierte PBMC führten innerhalb weniger Stunden zur Tumorlyse. Hierfür waren geringe E:T-Ratios und niedrige BiTE-Konzentrationen ausreichend. Die Tumorlyse lag nach vier Stunden bei 30 – 45 % im Vergleich zu 75 % bei den SAR-T-Zellen (Loffler et al. 2000). Catumaxomab induzierte ebenfalls eine Tumorlyse, die ihr Maximum mit 30 % erst nach 24 Stunden erreichte (Schmitt et al. 2004). Die SAR-T-Zellen zeigten bei niedriger E:T-Ratio eine gute Tumorlyse und Überwindung der Tumormmunsuppression *in vitro*, jedoch war eine höhere BiAk-Konzentration erforderlich.

In Studien mit einem modularen CAR, der als Extrazellulärdomäne einen Fcγ-Rezeptor III anstelle eines scFv aufweist, konnte eine Differenzierung der CAR-T-Zellen zu Gedächtniszellen beobachtet werden (Ochi et al. 2014). Gleiche Eigenschaften werden Catumaxomab zugeschrieben. Die durch Catumaxomab induzierte Bildung von Gedächtniszellen verhinderte eine Tumorprogression bei Mäusen, die eine zweite Tumoringektion erhielten (Ruf & Lindhofer 2001). Der in der vorliegenden

Arbeit verwendete BiAk weist keine Fc-Region auf, weswegen keine Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen erfolgen kann und somit die Bildung von Gedächtniszellen über diesen Weg ausbleibt. Inwiefern SAR-T-Zellen *in vivo* persistieren und durch zeitlich versetzte erneute BiAk-Gaben reaktiviert werden können bzw. welcher Phänotyp ausgebildet wird, sollte weitergehend untersucht werden.

4.6 Steuerung der zellbasierten Immuntherapie mittels modularen Adaptermolekülen

Neben der antikörperbasierten erzielt die zellbasierte Immuntherapie vielversprechende präklinische und klinische Ergebnisse. Der KTE-C19-CAR (anti-CD19-CD28-CD3 ζ) zeigte in präklinischen Versuchen schon bei geringer E:T-Ratio eine rasche Tumorlyse. Die Tumorlyse ist vergleichbar mit den E3-T-Zellen, bei geringerer IFN- γ -Sekretion (Kochenderfer et al. 2009). In klinischen Studien zeigte der KTE-C19 ein gutes Ansprechen bei Patienten mit therapierefraktären aggressiven B-non-Hodgkin-Lymphomen (Locke et al. 2019).

Bei Patienten mit soliden Tumoren ist die CAR-T-Zelltherapie allerdings bislang limitiert (Ahmed et al. 2015, Feng et al. 2016). Den Erfolgen stehen zudem gravierende Nebenwirkungen wie das lebensbedrohliche CRS gegenüber (Locke et al. 2019). Aktivierte CAR-T-Zellen sind nicht mehr deaktivierbar, wodurch die Kontrolle der Nebenwirkungen erschwert ist. Hinzu kommen *On-target-off-tumor*-Toxizitäten mit schweren Schäden im gesunden Gewebe (Morgan et al. 2010). CAR-T-Zellen mit verschiedenen *Switch-off*-Modalitäten sind deswegen in Entwicklung (Mestermann 2019). Hierbei werden die CAR-T-Zellen dauerhaft eliminiert, was allerdings nicht immer zur Kontrolle der Nebenwirkungen führt, aber das Risiko eines Rezidivs erhöht. Darüber hinaus binden CAR-T-Zellen lediglich ein Tumorantigen, welches häufig heterogen exprimiert wird. Tumoren mit Antigenverlust, -mutation oder geringer -expression sind dann nicht mehr für die CAR-T-Zellen adressierbar (Sotillo et al. 2015). Bispezifische CAR mit zwei scFv kommen einigen Limitierungen entgegen und werden derzeit in Studien getestet (Zah et al. 2016).

Im Gegensatz dazu weist unser SAR-T-Zell-Konzept ein deutlich höheres Sicherheitspotential auf. Prinzipiell können die SAR-T-Zellen als immunologisches Korrelat zu CAR-T-Zellen gleiche unerwünschte und potenziell lebensbedrohliche Ereignisse induzieren. Die SAR-T-Zellen werden jedoch nur unter Zugabe des BiAk als immunologisches Adaptermolekül aktiviert. Der BiAk unterliegt einer natürlichen Halbwertszeit, sodass die SAR-T-Zellaktivität im Verlauf abnimmt. Ist dieser natürliche Aktivitätsverlust nicht ausreichend für eine Kontrolle der Nebenwirkungen, könnten die SAR-T-Zellen gezielt eliminiert werden (Paszkiwicz et al. 2016). Nach erfolgreicher Behandlung der Nebenwirkungen könnten die SAR-T-Zellen durch Zugabe des BiAk erneut aktiviert und der Tumor wieder adressiert werden (Karches et al. 2019). Ein weiterer Vorteil des SAR-Konzeptes

besteht in der einfachen Verfügbarkeit des BiAk. Zudem können BiAk mit Spezifität gegen mehrere TAA generiert und simultan eingesetzt werden.

Neben unserem SAR-Konzept finden sich in der Literatur weitere Therapieansätze, die Adaptermoleküle in zahlreichen Formaten wie Nanobody, scFv oder Fab als immunologische Synapse zwischen Tumor- und modifizierter T-Zelle heranziehen (Darowski et al. 2019). Diese bieten ein vergleichbares Sicherheitspotential und ermöglichen ebenfalls die Steuerung der T-Zellaktivität über die Dosierung der Adaptermoleküle. Je nach Format weisen sie vorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich einer raschen Bioverfügbarkeit, Verteilung, Gewebepenetration, Affinität und Halbwertszeit auf. Zudem können mehrere TAA adressiert und auf deren heterogene Expressionsmuster reagiert werden. Bei Verwendung mehrerer Adaptermoleküle kann mit einem CAR eine Vielzahl an TAA gebunden und die Tumorzellen attackiert werden (Lee et al. 2019).

Zumeist basieren die modularen Konzepte auf modifizierten CAR. Hierbei sind die CAR nicht gegen ein Tumorantigen gerichtet, sondern adressieren Markerstrukturen wie E5B9 (Koristka et al. 2013), Biotin (Urbanska et al. 2012), FITC oder ein Peptid (Cao et al. 2016), die an ein gegen Tumorantigen gerichtetes Adaptermolekül gebunden sind. Darüber hinaus wurden CAR mit einer alternativen Extrazellulärdomäne wie CD16 (Fc γ RIII) oder biotinbindendes Avidin (Urbanska et al. 2012) anstelle eines scFv entwickelt. CD16-CAR-T-Zellen binden die Fc-Region therapeutischer mAk wie Rituximab oder Trastuzumab und werden darüber aktiviert (Ochi et al. 2014). Allerdings können sie körpereigene Antikörper an der Fc-Region binden und Autoimmunreaktionen hervorrufen. Zudem sind nicht alle therapeutischen mAk mit den CD16-CAR kompatibel. Des Weiteren weisen heterologe Substanzen wie Avidin und E5B9 oder künstliche Substanzen wie FITC eine hohe Immunogenität auf und provozieren ihren vorzeitigen Abbau durch das Immunsystem.

Unser SAR-Konzept sowie die modularen Konzepte bieten die Möglichkeit, die Immuntherapie besser zu steuern und die Patientensicherheit deutlich zu erhöhen. Durch Kombination oder Austausch von Adaptermolekülen mit unterschiedlicher Spezifität und biologischen Eigenschaften könnte die Immuntherapie rasch für Patienten individuell angepasst und auf die jeweiligen Anforderungen reagiert werden.

4.7 Ausblick

Zellbasierte Immuntherapien haben die Behandlungsmöglichkeiten und Heilungschancen für Krebspatienten in den letzten Jahren verbessert (Kruger et al. 2019). Das Nebenwirkungsprofil dieser Therapien stellt jedoch einen limitierenden Faktor dar (Kroschinsky et al. 2017). Unser SAR-Konzept bietet die Möglichkeit, die T-Zellaktivität über die BiAk-Dosierung zu steuern und Nebenwirkungen

zu reduzieren. Hierfür macht man sich die natürliche Halbwertszeit oder die Möglichkeit zur induzierten BiAk-Eliminierung zu Nutzen (Paszkiwicz et al. 2016). Die einseitige Bindung des BiAk an den SAR führte zu einer unspezifischen T-Zellaktivierung. Als Weiterentwicklung des Konzeptes sollte das BiAk-Format optimiert werden. Hierfür könnte die bivalente zugunsten einer monovalenten SAR-Bindung des BiAk ersetzt und so eine unspezifische Dimerisierung und Aktivierung der SAR-T-Zellen vermieden werden. Zudem zeigten diverse Studien, dass BiTE und CAR-T-Zellen unterschiedlich von Antigenaffinitäten hinsichtlich der T-Zellaktivierung profitierten (Dreier et al. 2002, Chmielewski et al. 2011). Der Einfluss der BiAk-Affinität auf die SAR-T-Zellaktivierung sollte deshalb untersucht und bei einem neuen BiAk-Format berücksichtigt werden.

Vor dem Risiko einer *Graft-versus-host*-Reaktion können für die Herstellung von CAR-T-Zellen bislang nur empfängereigene T-Zellen verwendet werden. Gleiches gilt für die SAR-T-Zellen. Die Herstellung der CAR und SAR-T-Zellen erfolgt somit individuell und erfordert eine patientennahe und geeignete Infrastruktur, wodurch diese Therapie sehr zeit- und kostenintensiv ist (Graham et al. 2018). Durch neue molekularbiologische Methoden wie CRISPR-Cas wäre es möglich, SAR-T-Zellen ohne endogenen TZR herzustellen (Ren et al. 2017). Dies hätte den Vorteil, dass SAR-T-Zellen von T-Zellen eines beliebigen Spenders hergestellt, vermehrt und mehreren Patienten infundiert werden könnten, ohne eine *Graft-versus-host*-Reaktion zu riskieren.

Krebsimmuntherapien zeigen vor allem bei hämatologischen Malignomen eine gute Wirksamkeit, wohingegen diese in soliden Tumoren bislang begrenzt ist. Die Aktivierung der SAR-T-Zellen ist Grundvoraussetzung für eine effektive anti-tumorale Therapie. *In vitro* konnten die SAR-T-Zellen an Tumorzellen gebunden werden und diese lysieren. Daneben ist die Penetration, vor allem solider Tumore, eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Krebstherapie (D'Aloia et al. 2018). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass verschiedene Tumorentitäten diverse Chemokine überproportional sezernieren und T-Zellen, die mit Chemokinrezeptoren transduziert wurden, vermehrt in Tumore rekrutiert werden konnten (Rapp et al. 2016). Die Expression zusätzlicher Chemokinrezeptoren auf SAR-T-Zellen könnte die Rekrutierung in solide Tumore begünstigen und die anti-tumorale Wirksamkeit steigern. Zudem könnte durch die Verwendung mehrerer gegen verschiedene Tumorantigene gerichteten BiAk die Effizienz des Konzeptes trotz Verlust einzelner TAA aufrechterhalten und gesteigert werden.

5 Zusammenfassung

Antikörperbasierte Immuntherapien sind ein fester Bestandteil der Behandlung von Krebspatienten. Daneben ist der adoptive T-Zelltransfer ein weiterer vielversprechender Therapieansatz. Die Effizienz der Immuntherapie und die Sicherheit der Patienten könnte durch die Kombination aus antikörper- und zellbasierter Therapie verbessert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung der Grundlagen für eine solche Kombinationstherapie. Hierfür wurde ein Konzept etabliert, bei dem von uns neu entwickelte synthetische agonistische Rezeptor (SAR)-modifizierte T-Zellen mittels eines bispezifischen Antikörpers (BiAk) an EpCAM⁺ Tumorzellen rekrutiert werden. Durch Bindung des BiAk an den synthetischen agonistischen Rezeptor werden die T-Zellen MHC-unabhängig zur spezifischen Tumorlyse aktiviert. Die SAR-T-Zellaktivität lässt sich in Abhängigkeit der eingesetzten Antikörperdosis steuern. Nebenwirkungen könnten so durch selektive Eliminierung des Antikörpers kontrolliert werden.

Die Generierung von zwei synthetischen agonistischen Rezeptoren und der Nachweis der Funktionalität des Therapiekonzeptes war wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die synthetischen agonistischen Rezeptoren, bestehend aus einer Extrazellulär- bzw. Markerdomäne (EGFRvIII oder Cripto) und einer (ko-) stimulierenden Intrazellulärdomäne, wurden mittels *overlap*-PCR kloniert. Die primären T-Zellen zeigten nach retroviraler Transduktion eine stabile Oberflächenexpression des synthetischen agonistischen Rezeptors. Durch Stimulation mit monospezifischem Antikörper konnten die transduzierten T-Zellen zur Zytokinsekretion angeregt werden. Diese war durch Stimulation mit dem bispezifischen Antikörper deutlich gesteigert und zeigte bei Kokultur der drei immunologisch wichtigen Komponenten SAR-T-Zelle, BiAk und EpCAM ein Maximum. Die Zytokinsekretion war bei beiden SAR-Konstrukten hoch, beim EGFRvIII-SAR jedoch höher als beim Cripto-SAR. Zudem bildeten sich, als weiterer Nachweis einer SAR-T-Zellaktivierung, Zellcluster. In Kombination mit dem BiAk führten die SAR-T-Zellen *in vitro* zu einer raschen Tumorlyse von EpCAM⁺ 4T1 Brustkrebszellen. Die beobachtete SAR-T-Zellaktivierung durch den BiAk ohne Anwesenheit von EpCAM ist am ehesten dem tetravalenten BiAk-Format geschuldet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die prinzipielle Funktionalität der synthetischen agonistischen Rezeptoren durch Bindung eines bispezifischen Antikörpers. In weiteren Forschungsprojekten könnte durch Optimierung der SAR-Struktur und des Antikörperformats die Grundlage für eine gesteigerte Sicherheit und effektivere Wirksamkeit der Kombination von adoptiv transferierten T-Zellen und bispezifischen Antikörpern erreicht werden.

6 Literaturverzeichnis

ACEA Biosciences, Inc. (2013). "Label-free-assay-for-NK-Cell-mediated-cytolysis."
Retrieved 27-08.2016, 2016, from <http://aceabio.com/wp-content/uploads/Label-Free-Assay-for-NK-Cell-Mediated-Cytolysis.pdf>.

ACEA Biosciences, Inc. (2016). "RTCA iCELLigence."
Retrieved 03/08/2016, from <http://www.aceabio.com/product/icelligence/>.

Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, et al. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules.
Cancer Res 2001; 61:4750-4755.

Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma.
J Clin Oncol 2015; 33:1688-1696.

Alas S & Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs.
Cancer Res 2001; 61:5137-5144.

Algarra I, Cabrera T & Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology.
Hum Immunol 2000; 61:65-73.

Amann M, Brischwein K, Lutterbuese P, Parr L, Petersen L, et al. Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3.
Cancer Res 2008; 68:143-151.

Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, et al. PD-1 blockade with Nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma.
N Engl J Med 2015; 372:311-319.

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ & Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).
J Mol Med (Berl) 1999; 77:699-712.

Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy.
Nat Med 2010; 16:565-570.

Bianco C, Strizzi L, Normanno N, Khan N & Salomon DS. Cripto-1: an oncofetal gene with many faces.
Curr Top Dev Biol 2005; 67:85-133.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck.
N Engl J Med 2006; 354:567-578.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J & Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study.
Lancet Oncol 2012; 13:790-801.

Brischwein K, Parr L, Pflanz S, Volkland J, Lumsden J, et al. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class.
J Immunother 2007; 30:798-807.

Brischwein K, Schlereth B, Guller B, Steiger C, Wolf A, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors.
Mol Immunol 2006; 43:1129-1143.

Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications.
Br Med J 1957; 1:841-847.

Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, et al. Design of switchable chimeric antigen receptor T cells targeting breast cancer.
Angew Chem Int Ed Engl 2016; 55:7520-7524.

Chen C, Zhang Y, Zhang Y, Li J, Tsao SW, et al. Superior antitumor activity of a novel bispecific antibody cotargeting human epidermal growth factor receptor 2 and type I insulin-like growth factor receptor.
Mol Cancer Ther 2014; 13:90-100.

Chmielewski M, Hombach AA & Abken H. CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T cell attack.
Gene Ther 2011; 18:62-72.

Chmielewski M, Hombach AA & Abken H. Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: Chimeric antigen receptor-redirectioned T cells.
Front Immunol 2013; 4:371.

Choi BD, Gedeon PC, Herndon JE, 2nd, Archer GE, Reap EA, et al. Human regulatory T cells kill tumor cells through granzyme-dependent cytotoxicity upon retargeting with a bispecific antibody.
Cancer Immunol Res 2013; 1:163.

Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy.
Science 2013; 342:1432-1433.

Croft M, So T, Duan W & Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease.
Immunol Rev 2009; 229:173-191.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.
Nat Med 2004; 10:942-949.

D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L & Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors.
Cell Death Dis 2018; 9:282.

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 ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia.
Sci Transl Med 2014; 6:224-225.

Davis TA, Czerwinski DK & Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression.
Clin Cancer Res 1999; 5:611.

- de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, et al. ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas.
Clin Cancer Res 2004; 10:7555-7565.
- de Castro NP, Rangel MC, Nagaoka T, Salomon DS & Bianco C. Cripto-1: an embryonic gene that promotes tumorigenesis.
Future Oncol 2010; 6:1127-1142.
- de La Motte Rouge T, Galluzzi L, Olaussen KA, Zermati Y, Tasmir E, et al. A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to Erlotinib.
Cancer Res 2007; 67:6253-6262.
- Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.
Nat Med 2002; 8:793-800.
- Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody.
Int J Cancer 2002; 100:690-697.
- Dudley ME & Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer.
Nat Rev Cancer 2003; 3:666-675.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science 2002; 298:850-854.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.
Nat Immunol 2002; 3:991-998.
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
Immunity 2004a; 21:137-148.
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting.
Annu Rev Immunol 2004b; 22:329-360.
- Duval L, Schmidt H, Kaltoft K, Fode K, Jensen JJ, et al. Adoptive transfer of allogeneic cytotoxic T lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma.
Clin Cancer Res 2006; 12:1229-1236.
- Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A & Bluestone JA. CD28 costimulation: From mechanism to therapy.
Immunity 2016; 44:973-988.
- Eshhar Z, Waks T, Gross G & Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:720-724.

Feng K, Guo Y, Dai H, Wang Y, Li X, et al. 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.

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture.

Cancer Res 1990; 50:6130-6138.

Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR & Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product.

J Immunol 1998; 161:2791-2797.

Gan HK, Cvrljevic AN & Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered.

Febs j 2013; 280:5350-5370.

Geppert TD & Lipsky PE. Activation of T lymphocytes by immobilized monoclonal antibodies to CD3. Regulatory influences of monoclonal antibodies to additional T cell surface determinants.

J Clin Invest 1988; 81:1497-1505.

Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N, et al. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions.

Am J Pathol 2004; 165:1853-1863.

Ghanekar SA, Nomura LE, Suni MA, Picker LJ, Maecker HT, et al. Gamma interferon expression in CD8(+) T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65.

Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:628-631.

Godwin JL, Jaggi S, Sirisena I, Sharda P, Rao AD, et al. Nivolumab-induced autoimmune diabetes mellitus presenting as diabetic ketoacidosis in a patient with metastatic lung cancer.

J Immunother Cancer 2017; 5:40.

Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis.

Blood 2000; 95:3900-3908.

Graham C, Jozwik A, Pepper A & Benjamin R. Allogeneic CAR-T Cells: more than ease of access?

Cells 2018; 7:155.

Grandis JR & Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer.

Cancer Res 1993; 53:3579-3584.

Gray PC, Shani G, Aung K, Kelber J & Vale W. Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGF-beta signaling.

Mol Cell Biol 2006; 26:9268-9278.

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 SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.

N Engl J Med 2013; 368:1509-1518.

- Guedan S, Chen X, Madar A, Carpenito C, McGettigan SE, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells.
Blood 2014; 124:1070-1080.
- Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens.
J Immunother 2005; 28:203-211.
- Gutzmer R, Li W, Sutterwala S, Lemos MP, Elizalde JI, et al. A tumor-associated glycoprotein that blocks MHC class II-dependent antigen presentation by dendritic cells.
J Immunol 2004; 173:1023-1032.
- Hahn AW, Gill DM, Pal SK & Agarwal N. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4.
Immunotherapy 2017; 9:681-692.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape.
Science 1996; 274:1363-1366.
- Han W, Zhang T, Yu H, Foulke JG & Tang CK. Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII.
Cancer Biol Ther 2006; 5:1361-1368.
- Harada Y, Ohgai D, Watanabe R, Okano K, Koiwai O, et al. A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but not inducible costimulator (ICOS).
J Exp Med 2003; 197:257-262.
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH & Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones.
Nature 1992; 356:607-609.
- Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, et al. The trifunctional antibody Catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial.
Int J Cancer 2010; 127:2209-2221.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, et al. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma.
N Engl J Med 2010; 363:711-723.
- Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 ζ signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 ζ signaling receptor molecule.
J Immunol 2001; 167:6123-6131.
- Hombach AA, Heiders J, Foppe M, Chmielewski M & Abken H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells.
Oncoimmunology 2012; 1:458-466.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling.
J Biol Chem 1997; 272:2927-2935.

Huehls AM, Coupet TA & Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy.
Immunol Cell Biol 2015; 93:290-296.

Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui CH, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia.
Leukemia 2004; 18:676-684.

Joyce JA & Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment.
Science 2015; 348:74.

Jutten B, Dubois L, Li Y, Aerts H, Wouters BG, et al. Binding of Cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells.
Radiother Oncol 2009; 92:393-398.

Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia.
N Engl J Med 2017; 376:836-847.

Karches CH, Benmeharek M-R, Schmidbauer ML, Kurzay M, Klaus R, et al. Bispecific antibodies enable synthetic agonistic receptor-transduced T cells for tumor immunotherapy.
Clin Cancer Res 2019; 25:5890-5900.

Karlsson M, Marits P, Dahl K, Dagoo T, Enerback S, et al. Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer.
Ann Surg Oncol 2010; 17:1747-1757.

Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells.
Immunity 2016; 44:380-390.

Kebenko M, Goebeler M-E, Wolf M, Hasenburg A, Seggewiss-Bernhardt R, et al. A multicenter phase 1 study of Solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE®) antibody construct, in patients with refractory solid tumors.
Oncoimmunology 2018; 7:e1450710.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance.
J Exp Med 2006; 203:883-895.

Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, Grassmann S, Henkel J, et al. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer.
J Natl Cancer Inst 2015; 107:364.

Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, Xu H, Black MA, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor.
J Immunother 2009; 32:689-702.

Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies.
MAbs 2012; 4:182-197.

- Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Bippes CC, Feldmann A, et al. Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B.
J Autoimmun 2013; 42:105-116.
- Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Feldmann A, Töpfer K, et al. Cytotoxic response of human regulatory T cells upon T-cell receptor-mediated activation: a matter of purity.
Blood Cancer J 2014; 4:e199-e199.
- Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, et al. 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.
- Kroschinsky F, Stölzel F, von Bonin S, Beutel G, Kochanek M, et al. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management.
Crit Care 2017; 21:89.
- Kruger S, Ilmer M, Kobold S, Cadilha BL, Endres S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends.
J Exp Clin Cancer Res 2019; 38:268.
- Kuan CT, Wikstrand CJ, Archer G, Beers R, Pastan I, et al. Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvIII-specific scFv.
Int J Cancer 2000; 88:962-969.
- Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, et al. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7.
Exp Cell Res 2005; 309:345-357.
- Landry RC, Klimowicz AC, Lavictoire SJ, Borisova S, Kottachchi DT, et al. Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen: Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor, EGFRvIII.
J Mol Biol 2001; 308:883-893.
- Langley RR & Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis.
Endocr Rev 2007; 28:297-321.
- Lawrence MG, Margaryan NV, Loessner D, Collins A, Kerr KM, et al. Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells.
Prostate 2011; 71:1198-1209.
- Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, et al. 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.
- Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, et al. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1.
J Immunol 2002; 169:4882-4888.
- Lee LJ, Toze CL, Huang SJT, Gillan TL, Connors JM, et al. Improved survival outcomes with the addition of rituximab to initial therapy for chronic lymphocytic leukemia: a comparative effectiveness analysis in the province of British Columbia, Canada.
Leuk Lymphoma 2018; 59:1356-1363.

Lee YG, Marks I, Srinivasarao M, Kanduluru AK, Mahalingam SM, et al. Use of a single CAR T Cell and several bispecific adapters facilitates eradication of multiple antigenically different solid tumors. *Cancer Res* 2019; 79:387-396.

Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D & Fuertes Marraco SA. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than "exhaustion" of human CD8 T cells. *Front Immunol* 2013; 4:455.

Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, et al. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86:573-583.

Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL & Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:99-146.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, et al. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by Cetuximab. *Cancer Cell* 2005; 7:301-311.

Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 1996; 148:865-875.

Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, et al. Long-term safety and activity of Axicabtagene Ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:31-42.

Loffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000; 95:2098-2103.

Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015; 21:581.

Lordick F, Ott K, Weitz J & Jäger D. The evolving role of Catumaxomab in gastric cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8:1407-1415.

Lowe SW, Cepero E & Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307-315.

Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM & Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 2017; 18:46.

Luwor RB, Zhu HJ, Walker F, Vitali AA, Perera RM, et al. The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene* 2004; 23:6095-6104.

- Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I & Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002; 20:70-75.
- Marcucci F, Bellone M, Rumio C & Corti A. Approaches to improve tumor accumulation and interactions between monoclonal antibodies and immune cells. *MAbs* 2013; 5:34-46.
- Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, Catalano JV, Dmoszynska A, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:4579-4586.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ & Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74:181-273.
- Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gokbuget N, et al. Complete hematologic and molecular response in adult patients with relapsed/refractory Philadelphia Chromosome-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia following treatment with Blinatumomab: Results from a phase II, single-arm, multicenter study. *J Clin Oncol* 2017; 35:1795-1802.
- Mau-Sorensen M, Dittrich C, Dienstmann R, Lassen U, Buchler W, et al. A phase I trial of intravenous catumaxomab: a bispecific monoclonal antibody targeting EpCAM and the T cell coreceptor CD3. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 75:1065-1073.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371:1507-1517.
- Mestermann K. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci. Transl Med.* 2019; 11.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314:126-129.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, et al. 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.
- Moritz D & Groner B. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* 1995; 2:539-546.
- Mueller DL, Seiffert S, Fang W & Behrens TW. Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells. *J Immunol* 1996; 156:1764-1771.

- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377:2531-2544.
- Nimmerjahn F & Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:34-47.
- Oberst MD, Fuhrmann S, Mulgrew K, Amann M, Cheng L, et al. CEA/CD3 bispecific antibody MEDI-565/AMG 211 activation of T cells and subsequent killing of human tumors is independent of mutations commonly found in colorectal adenocarcinomas. *MAbs* 2014; 6:1571-1584.
- Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, et al. Gene-modified human α/β-T cells expressing a chimeric CD16-CD3ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:249-262.
- Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P & Baeuerle PA. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol* 2006; 43:763-771.
- Ott MG, Marmé F, Moldenhauer G, Lindhofer H, Hennig M, et al. Humoral response to Catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int J Cancer* 2012; 130:2195-2203.
- Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378:449-459.
- Paszkiwicz PJ, Frassle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, et al. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest* 2016; 126:4262-4272.
- Patel D, Lahiji A, Patel S, Franklin M, Jimenez X, et al. Monoclonal antibody Cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor vIII on the cell surface. *Anticancer Res* 2007; 27:3355-3366.
- Perera RM, Zoncu R, Johns TG, Pypaert M, Lee FT, et al. Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Neoplasia* 2007; 9:1099-1110.
- Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, et al. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997; 6:411-417.
- Pule MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 2005; 12:933-941.
- Quintarelli C, Orlando D, Boffa I, Guercio M, Polito VA, et al. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology* 2018; 7:e1433518.
- Ramezani A, Mahmoudi Maymand E, Yazdanpanah-Samani M, Hosseini A, Toghraie FS, et al. Improving Pertuzumab production by gene optimization and proper signal peptide selection. *Protein Expr Purif* 2017; 135:24-32.

- Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, Reyna A, Narala N, et al. In vivo fate and activity of second- versus third-generation CD19-specific CAR-T cells in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Mol Ther* 2018; 26:2727-2737.
- Rapp M, Grassmann S, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, et al. 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.
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83:435-445.
- Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 2017; 8:17002-17011.
- Riesenberg R, Buchner A, Pohla H & Lindhofer H. Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (α EpCAM \times α CD3). *J Histochem Cytochem* 2001; 49:911-917.
- Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 2015; 21:1019-1027.
- Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E459-E468.
- Rosenberg SA, Spiess P & Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233:1318-1321.
- Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1159-1166.
- Ruella M & Maus MV. Catch me if you can: Leukemia escape after CD19-directed T cell immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J* 2016; 14:357-362.
- Ruf P & Lindhofer H. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 2001; 98:2526-2534.
- Sabatos CA, Doh J, Chakravarti S, Friedman RS, Pandurangi PG, et al. A synaptic basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity* 2008; 29:238-248.
- Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* 2018; 11:6753.

Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C, Obrist P, Marschner N, et al. An open-label, randomized phase II study of adegatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer.
Ann Oncol 2010; 21:275-282.

Schmidt MM & Wittrup KD. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting.
Mol Cancer Ther 2009; 8:2861-2871.

Schmitt M, Schmitt A, Reinhardt P, Thess B, Manfras B, et al. Opsonization with a trifunctional bispecific (alphaCD3 x alphaEpCAM) antibody results in efficient lysis in vitro and in vivo of EpCAM positive tumor cells by cytotoxic T lymphocytes.
Int J Oncol 2004; 25:841-848.

Shi G, Cui W, Benchimol M, Liu YT, Mattrey RF, et al. Isolation of rare tumor cells from blood cells with buoyant immuno-microbubbles.
PLoS One 2013; 8:e58017.

Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M, et al. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule.
Cancer Sci 2011; 102:991-998.

Shuptrine CW, Surana R & Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer.
Semin Cancer Biol 2012; 22:3-13.

Song DG, Ye Q, Carpenito C, Poussin M, Wang LP, et al. In vivo persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB).
Cancer Res 2011; 71:4617-4627.

Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy.
Cancer Discov 2015; 5:1282.

Sotomayor EM, Borrello I & Levitsky HI. Tolerance and cancer: a critical issue in tumor immunology.
Crit Rev Oncog 1996; 7:433-456.

Spiess PJ, Yang JC & Rosenberg SA. In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2.
J Natl Cancer Inst 1987; 79:1067-1075.

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. (2017, 2019). "Staat & Gesellschaft - Todesursachen." Retrieved 28.11.2019, from https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html.

Stewart BW & Wild CP. World Cancer Report 2014.
IARC 2014.

Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans.
Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110:17945-17950.

Sun J, Huye LE, Lapteva N, Mamonkin M, Hiregange M, et al. Early transduction produces highly functional chimeric antigen receptor-modified virus-specific T-cells with central memory markers: a Production Assistant for Cell Therapy (PACT) translational application.
J Immunother Cancer 2015; 3:5-5.

Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J & MacLeod CL. Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation.
Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83:3825-3829.

Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, Doroshow JH, Poplin EA, et al. Pharmacokinetics of Cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors.
Clin Cancer Res 2006; 12:6517.

Thomas DA & Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance.
Cancer Cell 2005; 8:369-380.

Thomas L & Lawrence H. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States: A Symposium at the New York Academy of Medicine.
J Am Med Assoc 1959; 170:883-883.

Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells.
Blood 2008; 112:2261-2271.

Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor.
Cancer Res 2012; 72:1844-1852.

Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E & Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.
Nature 1995; 375:148-151.

Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus Cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer.
J Clin Oncol 2015; 33:692-700.

Vanneman M & Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment.
Nat Rev Cancer 2012; 12:237-251.

Watanabe K, Hamada S, Bianco C, Mancino M, Nagaoka T, et al. Requirement of glycosylphosphatidylinositol anchor of Cripto-1 for trans activity as a Nodal co-receptor.
J Biol Chem 2007; 282:35772-35786.

Wee P & Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways.
Cancers (Basel) 2017; 9:52.

Wen T, Bukczynski J & Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function.
J Immunol 2002; 168:4897.

Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers.
Br J Cancer 2006; 94:128-135.

Wolf E, Hofmeister R, Kufer P, Schlereth B & Baeuerle PA. BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity.
Drug Discov Today 2005; 10:1237-1244.

- Xue SA, Gao L, Hart D, Gillmore R, Qasim W, et al. Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. *Blood* 2005; 106:3062-3067.
- Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N & Shibuya M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:773-779.
- Ymer SI, Greenall SA, Cvrljevic A, Cao DX, Donoghue JF, et al. Glioma specific extracellular missense mutations in the first cysteine rich region of epidermal growth factor receptor (EGFR) initiate ligand independent activation. *Cancers (Basel)* 2011; 3:2032-2049.
- Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC & Chen YY. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res* 2016; 4:498-508.
- Zeidler R, Mysliwicz J, Csanady M, Walz A, Ziegler I, et al. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer* 2000; 83:261-266.
- Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, Maus MV, Kapoor V, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2007; 179:4910-4918.
- Zhang T, Wu M-R & Sentman CL. An NKp30-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy in vivo. *J Immunol* 2012; 189:2290.
- Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, Gattinoni L, Palmer DC, et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther* 2006; 13:151-159.
- Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell* 2015; 28:415-428.
- Zhu M, Wu B, Brandl C, Johnson J, Wolf A, et al. Blinatumomab, a bispecific T-cell engager (BiTE®) for CD-19 targeted cancer immunotherapy: Clinical pharmacology and its implications. *Clin Pharmacokinet* 2016; 55:1271-1288.
- Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, et al. Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: An immunohistochemical study. *Eur Urol* 1995; 28:251-254.
- Zumwalde NA, Domae E, Mescher MF & Shimizu Y. ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation. *J Immunol* 2013; 191:3681-3693.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AZT	Adoptiver T-Zell-Transfer
BiAk	Bispezifischer Antikörper
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
C3	C3-SAR
CAR	Chimärer-Antigen-Rezeptor
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CRS	<i>Cyokine release syndrom</i>
CTLA 4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated-antigen 4</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E3	EGFRvIII 3-SAR
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGF-CFC	<i>Epidermal growth factor/cripto/FRL-1/cryptic</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>Epidermal growth factor receptor variant III</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
E:T	Effektor:Target
Fab	<i>Antigen-binding fragment</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FcγR	<i>Fragment crystallisable receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
fwd	<i>Forward</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN-γ	Interferon-γ

Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
LB Medium	Luria-Bertani-Medium
mAk	Monoklonaler monospezifischer Antikörper
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
rEpCAM	Rekombinantes <i>epithelial cell adhesion molecule</i>
rev	<i>Reverse</i>
rIL-2	Rekombinantes Interleukin-2
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAR	Synthetischer agonistischer Rezeptor
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
sek	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TCM	T-Zell-Medium
tEGFR	Trunkiertes EGFR
TCM	T-Zellmedium
TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor- α
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyten
Treg	Regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor

7.2 Publikationen

7.2.1 Originalpublikationen

1. Karches CH, Benmebarek M-R, Schmidbauer ML, **Kurzay M**, Klaus R, Geiger M, Rataj F, Cadilha BL, Lesch S, Heise C, Murr R, vom Berg J, Jastroch M, Lamp D, Ding J, Duewell P, Niederfellner G, Sustmann C, Endres S, Klein C & Kobold S.

Bispecific antibodies enable synthetic agonistic receptor-transduced T cells for tumor immunotherapy.
Clinical Cancer Research 2019; 25: 5890-5900.

2. **Kurzay M**, Hauck F, Schmid I, Wiebking V, Eichinger A, Jung E, Boekstegers A, Feuchtinger T, Klein C & Albert MH.

T-cell replete haploidentical bone marrow transplantation and post-transplant cyclophosphamide for patients with inborn errors.

Haematologica 2019; 104: 478-482.

3. Lesch S, Blumenberg V, Stoiber S, Ogonek J, Cadilha B, Dantes Z, Rataj F, Dorman K, Lutz J, Karches CH, Heise C, **Kurzay M**, Larimer BM, Grassmann S, Rapp M, Nottebrock A, Gottschlich A, Kruger S, Tokarew N, Metzger P, Hoerth C, Benmebarek M-R, Dhoqina D, Hank T, Baba T, Oener A, Huynh D, Megens RTA, Janssen K-P, Jastroch M, Lamp D, Ruehland S, Di Pilato M, Pruessmann JN, Ormanns S, Reischer A, Hristov M, Rothenfusser S, Duewell P, König L, Schnurr M, Subklewe M, Liss A, Halama N, Reichert M, Mempel TR, Endres S & Kobold S.

T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours.

Nat Biomed Eng. 2021; 5: 1246-1260.

7.2.2 Poster-Präsentationen

Kurzay M, Hauck F, Feuchtinger T, Klein C & Albert MH.

T-cell replete haploidentical bone marrow transplantation, myeloablative conditioning and post-transplant cyclophosphamide for pediatric patients with non-malignant disorders.

44th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, Lissabon, Portugal, 2018

7.3 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die konstruktiven Gespräche, seine Motivation und Unterstützung bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die vielfältige Förderung durch das DFG-Graduiertenkolleg bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Sebastian Kobold, der mir dieses spannende Thema überlassen und mich durch sein großes persönliches Engagement für die Wissenschaft begeistert hat. Seine fortwährende Leidenschaft für die Forschung und die Ausbildung junger Forschender, sein großes thematisches Interesse und seine Inspiration haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für deine geduldige Unterstützung und die vielen bereichernden Gespräche auf fachlicher sowie persönlicher Ebene.

Des Weiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern der Firma Roche – Dr. Claudio Sustmann, Dr. Gerhard Niederfellner und Dr. Christian Klein – für ihre fachliche Begleitung, die Überlassung des Antikörpers und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team der Klinischen Pharmakologie. Die gegenseitige Unterstützung und Motivation, das gemeinsame tatkräftige Weiterforschen trotz misslungener Versuche, der kompetente fachliche und freundschaftlich persönliche Austausch haben eine konstruktive, besondere und herzliche Arbeitsatmosphäre geschaffen. Mein spezieller Dank geht an Simon, der mich an die Forschung herangeführt hat und von dem ich viel lernen durfte.

Ein riesiger Dank geht an meine Eltern und Familie, die mich mein Leben lang in allem unterstützt und gefördert haben. Durch euren Rückhalt, Rat und eure bedingungslose Liebe war es möglich, die Herausforderungen der letzten Jahre zu meistern. Danke!

Weiter möchte ich meinen Freunden danken, die mich während meines Studiums, insbesondere während der Promotion, begleitet und motiviert haben. Es gibt kein Problem, das nicht mit guten Freunden zu lösen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Ann bedanken, die mich während des Verfassens meiner Promotion unermüdlich unterstützt hat. Danke, dass du meinen Launen mit einem Lächeln begegnet bist und mir mit Inspiration, konstruktive Kritik und unendlicher Geduld zur Seite standst.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Mathias Kurzay, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Generierung eines synthetischen agonistischen Rezeptors für die Transduktion muriner T-Zellen zur Kombination mit tetraivalenten bispezifischen Antikörpern im Zellkulturmodell einer Brustkrebs-Zelllinie

selbstständig verfasst, mich außer der angegeben keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 04. Januar 2022

Mathias Kurzay

.....

Mathias Kurzay