

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Proof-of-Concept-Studien zu PD-1-CD28-Fusionsrezeptoren und C-C-Motiv-Chemokinrezeptor Typ 4 (CCR4) zur Verbesserung der Effizienz des adoptiven T-Zell-Transfers in einem murinen Pankreaskarzinommodell

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Simon Andreas Graßmann

aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Stefan Böck
Dr. Thomas Grünewald
Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Sebastian Kobold

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2018

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern und
Antonia Lang.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Notwendigkeit der Entwicklung neuer Ansätze für die systemische Tumorthherapie	1
1.2 Interaktionen des Immunsystems mit Tumoren führen gleichzeitig zur Elimination von Tumorzellen und zur Selektion von Tumorzellvarianten, welche der Kontrolle des Immunsystems entgehen	2
1.3 Mechanismen der Immunsuppression im Tumorgewebe	4
1.3.1 Spezifische Rekrutierung immunsuppressiver Immunzellen	4
1.3.2 Aufbau eines immunsuppressiven Milieus durch das Tumorstroma	4
1.3.3 Direkte Interaktionen der Tumorzelle mit Immun-Effektorzellen	5
1.4 Strategien der Immuntherapie in der klinischen Anwendung	6
1.4.1 Immuncheckpoint-Blockade	6
1.4.2 Adoptive T-Zell Therapie als Möglichkeit der individualisierten Tumorimmuntherapie	7
1.4.2.1 Zelltherapie mit TILs	8
1.4.2.2 Adoptiver Transfer von TZR-modifizierten T-Zellen	9
1.4.2.3 Adoptiver Transfer von CAR-modifizierten T-Zellen	9
1.5 Experimentelle Ansätze zur Verbesserung von Effizienz und Sicherheit des adoptiven T-Zelltransfers	10
1.5.1 Überexpression von Genen zur Verbesserung der T-Zellfunktion	10
1.5.2 Suppression und Deletion von Genen	11
1.5.3 Strategien zur Verbesserung der Sicherheit adoptiver Zelltransfers	12
1.6 Fragestellungen der Promotionsarbeit	13
2. Zusammenfassung der präsentierten Publikationen	15
3. Summary of the presented publications	18
4. Abkürzungsverzeichnis mit Glossar	21
5. Referenzen	25
6. Der kumulativen Dissertation zugrunde liegende Publikationen	41
7. Publikationsliste	43
8. Danksagung	44

1. Einleitung

1.1 Notwendigkeit der Entwicklung neuer Ansätze für die systemische Tumorthherapie

Die meisten Malignom-bedingten Todesfälle sind durch Tumorerkrankungen in fortgeschrittenen Stadien bedingt (O'Connell et al. 2004, Parish et al. 2003). Viele solide Tumorerkrankungen, welche in frühen Stadien diagnostiziert werden, können kurativ mittels chirurgischer Resektion oder einer Kombination aus Radio- und Chemotherapie behandelt werden. In fortgeschrittenen Stadien, charakterisiert durch eine vorhandene oder wahrscheinliche Metastasierung, ist eine solche Therapie nicht ausreichend.

In fortgeschrittenen Stadien können nur systemische Therapien einen Überlebensvorteil für die betroffenen Patienten bewirken. Die ersten Medikamente welche zur Behandlung von soliden Tumorerkrankungen in fortgeschrittenen Stadien eingesetzt wurden, sind Chemotherapeutika (Jaffe et al. 1974, Li et al. 1958). Diese Medikamente entfalten ihre Wirkung präferentiell in Zellen, welche sich schnell teilen. Obwohl in der Behandlung vieler Tumorerkrankungen stark wirksam, ist es mit diesen Medikamenten vor allem bei soliden Tumorerkrankungen meist nicht möglich, mit einer kurativen Zielsetzung zu therapieren. Grund hierfür sind sowohl Resistenzentwicklungen als auch Dosis-limitierende Toxizitäten.

Dieser Mangel an Spezifität ist bei neueren Ansätzen weitaus geringer ausgeprägt, welche unter dem Begriff „zielgerichtete Therapien“ zusammengefasst werden. Durch die Entwicklung von therapeutischen Antikörpern oder sogenannten *small molecule inhibitors* war es möglich, spezifischere Zielstrukturen im Tumor zu nutzen (Cunningham et al. 2004, Hurwitz et al. 2004, Slamon et al. 2001). Die bislang bekannten Zielstrukturen sind zwar in malignen Zellen überexprimiert, aber nicht exklusiv in Tumorzellen vorhanden. Weiterhin sind auch die zielgerichteten Therapien nicht vollständig spezifisch für ihre Zielstruktur (Kamba et al. 2007, Keefe et al. 2002). Für alle bislang entwickelten Therapeutika gilt, dass sich nach längerer Therapie Resistenzen in den behandelten Tumoren ausbilden können (Nagata et al. 2004, Roninson et al. 1986).

Trotz der hier genannten therapeutischen Fortschritte werden dringend neue therapeutische Strategien benötigt um die Prognose für diese Patienten zu verbessern. Hier könnten sich insbesondere Immuntherapien als vielversprechend erweisen.

1.2 Interaktionen des Immunsystems mit Tumoren führen gleichzeitig zur Elimination von Tumorzellen und zur Selektion von Tumorzellvarianten, welche der Kontrolle des Immunsystems entgehen

Bereits im 19ten Jahrhundert hatten verschiedene Beobachtungen zur Annahme geführt, dass dem Immunsystem eine wichtige Rolle in der Kontrolle maligner Läsionen zukommt (Parish et al. 2003). Während gezielte Untersuchungen dies zunächst in Frage stellten (Stutman et al. 1974), mehrte sich nach und nach die Evidenz für Interaktionen des Immunsystems mit Tumoren. Heutzutage geht man davon aus, dass CD8⁺ T-Zellen mit syngenem Tumoren interagieren und diese in den meisten Fällen kontrollieren und abstoßen können (*immunosurveillance*). Jedoch konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Tumore dieser Kontrolle entgehen können (*escape*).

Diese Wechselwirkungen von Tumoren mit dem Immunsystem werden in einem Konzept von Gavin Dunn, Lloyd Old und Robert Schreiber zusammengefasst, welches als zentrales Dogma anerkannt wird (das Konzept des *immunoediting*). In diesem Konzept durchläuft der entstehende Tumor drei Stadien der Interaktion mit dem Immunsystem des Patienten, welche zu einer Entwicklung von Mechanismen zur Immunsuppression sowie einer Induktion von Immuntoleranz führen (Dunn et al. 2004, Smyth et al. 2006). Im Anschluss an die maligne Transformation einer somatischen Zelle häufen sich in deren Tochterzellen weitere Mutationen an. Hierdurch entstehen unterschiedlich immunogene Subklone, die durch eine Immunantwort gegen den Tumor zunächst vollständig erkannt und eliminiert werden können (1. Phase, *elimination bzw. immunosurveillance*). Scheitert die vollständige Eliminierung, entstehen Subklone, welche nicht vom Immunsystem erkannt werden können. Jedoch kann das Immunsystem, durch seine zahlreichen Erkennungs- und Lysemechanismen solche Subklone soweit kontrollieren, dass es zunächst zu keiner manifesten Tumorerkrankung kommt (2. Phase, die Gleichgewichtsphase, *equilibrium*). Die Dauer dieser Phase kann auch in Abhängigkeit der jeweiligen Tumorentität sehr variabel sein. Schließlich kann es durch die weitere Selektion der Tumorzellen dazu kommen, dass der Tumor immer schlechter von den Effektoren des Immunsystems erkannt werden kann und die Erkrankung fortschreitet (3. Phase, *escape*).

In unserem Verständnis ist die Entwicklung dieser immunsuppressiver Mechanismen nicht als Nebenprodukt der Tumorgenese, sondern als verbindliche Voraussetzung für die Entwicklung einer malignen Erkrankung zu verstehen. Eine Aufhebung dieser induzierten

Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumorgewebe könnte daher eine erfolgreiche Strategie zur Behandlung von malignen Erkrankungen darstellen.

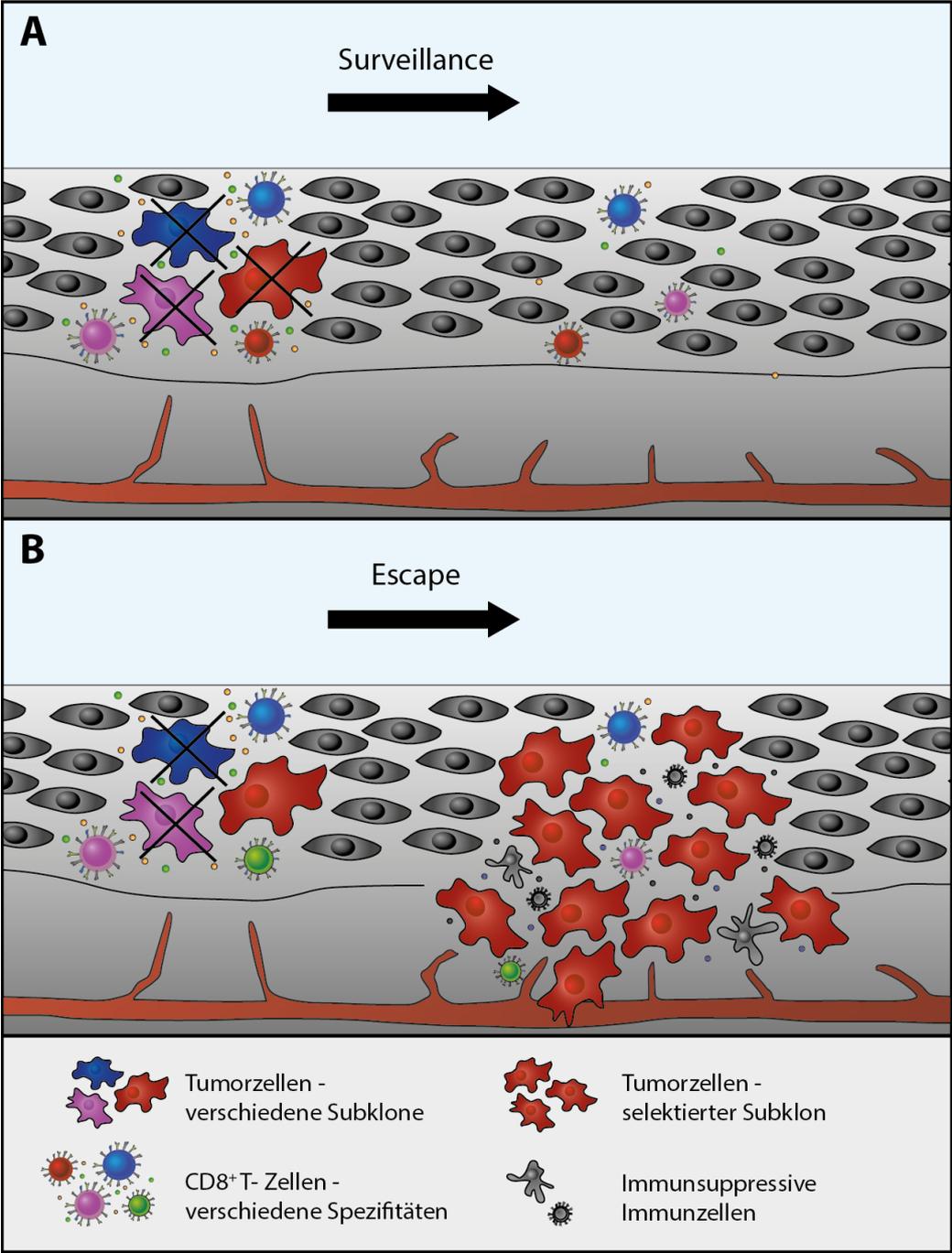


Abbildung 1: Immunoeediting: A) Effektorzellen des Immunsystems können in der Regel die entstehenden Subklone eines Tumors erkennen und lysieren (*surveillance*). B) Hierbei übt das Immunsystem einen Selektionsdruck aus: Tumorzell-Subklone, welche nicht ausreichend durch das Immunsystem erkannt werden, können auswachsen (*escape*). Auf ähnliche Weise werden Tumore selektiert, welche erfolgreiche Immunsuppressionsstrategien, zum Beispiel über die Rekrutierung von immunsuppressiven Immunzellen, entwickelt haben. Eigene Abbildung, basierend auf (Dunn et al. 2004).

1.3 Mechanismen der Immunsuppression im Tumorgewebe

1.3.1 Spezifische Rekrutierung immunsuppressiver Immunzellen

Die Mechanismen der Immunsuppression, welche in soliden Tumoren beobachtet werden können, greifen an unterschiedlichen Angriffspunkten der Immunantwort des Patienten an. Das maligne Gewebe kann durch die Sekretion von bestimmten Chemokinen partiell kontrollieren, welche Immunzellen in das Tumorstroma rekrutiert werden. Im Verlauf der Tumorprogression akquiriert der Tumor hierbei ein Chemokinprofil, welches immunsuppressive Immunzellen wie immature myeloide Zellen und Treg gezielt rekrutiert (Chiu et al. 2016, Ding et al. 2015, Haas et al. 2008, Sawanobori et al. 2008, Yan et al. 2011), während Effektorzellen des Immunsystems wie CD8⁺ T-Zellen an der Immigration gehindert werden (Molon et al. 2011, Proost et al. 2007).

1.3.2 Aufbau eines immunsuppressiven Milieus durch das Tumorstroma

Die durch den Tumor rekrutierten, immunsuppressiven Zellen sind in der Folge maßgeblich dafür verantwortlich, ein immuntolerantes Milieu aufzubauen und aufrechtzuerhalten. Die Abschwächung der anti-tumoralen Immunantwort durch diese Zellen kann über verschiedene Mechanismen erreicht werden, von denen hier nur einige genannt werden sollen.

Für myeloide Zellpopulationen konnte unter anderem gezeigt werden, dass sie direkt die Erkennung von Tumor-assoziierten Antigenen durch T-Zellen verhindern können (Nagaraj et al. 2007). Des Weiteren wird angenommen, dass myeloide Zellen im Wesentlichen dafür verantwortlich sind regulatorische T-Zellen zu rekrutieren oder *de novo* im Tumorstroma zu polarisieren (Huang et al. 2006).

Für Treg konnte gezeigt werden, dass sie über lösliche Faktoren wie IL-10 oder TGF- β die T-Zell Aktivierung negativ beeinflussen (Jarnicki et al. 2006), mit dem für die Funktion von Effektorzellen notwendigen Tryptophanmetabolismus interferieren (Fallarino et al. 2006) oder die Kostimulation von Effektor-T-Zellen verhindern (Misra et al. 2004).

1.3.3 Direkte Interaktionen der Tumorzelle mit Immun-Effektorzellen

Tumorzellen können auch über direkte Interaktionen die Effektorzellen des Immunsystems behindern. Eine wesentliche Strategie ist in diesem Zusammenhang die Minderung der suffizienten Erkennung von tumorspezifischen Epitopen durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. Dies kann von Tumorzellen auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. So können einerseits Tumorzellen die Expression von funktionellen MHC-I-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche reduzieren und somit die Bindung von CD8⁺ T-Zellen direkt reduzieren (Inhibierung des ersten Signals der T-Zell Aktivierung) (Giorda et al. 2003, Hicklin et al. 1998, Restifo et al. 1993).

Andererseits können T-Zellen direkt von Tumorzellen in ihrer Funktion gestört werden. Dies wird im Tumor vor allem über PD-L1 - PD-1 Interaktionen erreicht. PD-1 ist ein Rezeptor der CD28-Proteinfamilie, welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird und mit dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 verwandt ist (Agata et al. 1996, Ishida et al. 1992). Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten dieser zwei Rezeptoren, führen sie zu gegensätzlichen Effekten in den T-Zellen. Während CD28 T-Zellantworten stimuliert, inhibiert der PD-1-Rezeptor T-Zellen nach Bindung seiner Liganden PD-L1 und PD-L2 (Freeman et al. 2000, Iwai et al. 2002, Latchman et al. 2001). In vielen Tumorentitäten konnte eine Überexpression von PD-L1 nicht nur nachgewiesen, sondern auch mit einer deutlich ungünstigeren Prognose assoziiert werden (Gevensleben et al. 2016, Jung et al. 2017, Thompson et al. 2006).

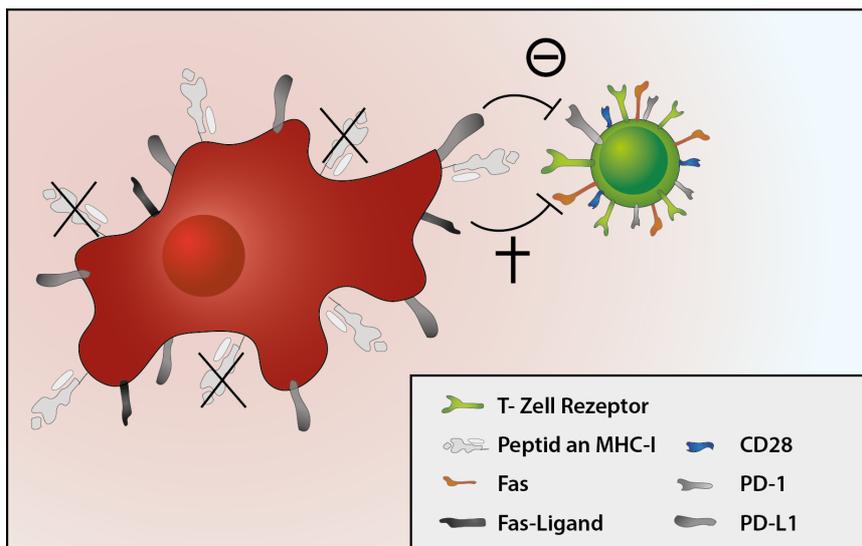


Abbildung 2: Direkte Interaktionen von Tumorzellen mit CD8⁺ T-Zellen: CD8⁺ T-Zellen können an MHC-I-präsentierten Tumorantigen-Epitopen erkennen. Die Tumorzelle kann die effiziente Erkennung jedoch hemmen über die Expression von PD-L1, welches nach Bindung an PD-1 auf T-Zellen zu Koinhibition führt. Eigene Abbildung, basierend auf (Ott et al. 2013).

1.4 Strategien der Immuntherapie in der klinischen Anwendung

1.4.1 Immuncheckpoint-Blockade

Unser Verständnis darüber, wie Tumore die Erkennung und Abstoßung durch das Immunsystem verhindern können, hat zu vielversprechenden Ansätzen der Tumorimmuntherapie geführt.

Die Zellen der adaptiven Immunität werden durch sogenannte Checkpoint-Rezeptoren reguliert, welche diese Zellen stimulieren oder inhibieren können (Chen et al. 2013). Die physiologische Rolle der inhibitorischen Checkpoint-Rezeptoren ist es dabei, überschießende Immunreaktionen und Autoimmunität zu verhindern (Nishimura et al. 1999, Probst et al. 2005). Wie beschrieben werden jedoch vor allem Liganden für PD-1 auch von Tumorzellen präsentiert, welche hierdurch diese immunsuppressiven Achsen ausnutzen. Aus diesen Beobachtungen entstand die Vorstellung, dass die Antikörper-vermittelte Blockade solcher T-Zell-inhibitorischen Rezeptoren therapeutisch genutzt werden könnte.

Verschiedene Antikörper gegen diese Moleküle (Ipilimumab gegen CTLA-1 und Nivolumab oder Pembrolizumab gegen PD-1) wurden daher entwickelt und klinisch getestet. Während die CTLA-4 Blockade vor allem in Melanompatienten klinische Wirksamkeit zeigt (Hodi et al. 2010, Leach et al. 1996, Weber et al. 2008), konnte eine PD-1-Blockade auch bei Lungenkrebspatienten, Patienten mit therapierefraktären Hodgkin-Lymphomen, klarzelligem Nierenzellkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren erfolgreich eingesetzt werden und wurde für diese Indikationen zugelassen (Ansell et al. 2015, Borghaei et al. 2015, Ferris et al. 2016, Motzer et al. 2015, Topalian et al. 2012, Wolchok et al. 2013). In den genannten Studien ist es dabei besonders bemerkenswert, dass auch solche Patienten, welche von einer Chemotherapie nicht mehr profitieren oder bei denen kein Überlebensvorteil durch eine Chemotherapie zu erwarten war, ein Ansprechen auf die Checkpoint-Blockade zeigten.

Die beeindruckenden Ansprechraten auf die Immuncheckpoint-Blockade in verschiedenen Tumorentitäten machen deutlich, wie potent T-Zellen als therapeutische Agenzien sein können. Gleichzeitig weisen die im Rahmen der beschriebenen Studien aufgetretenen teils starken Nebenwirkungen auf die Gefahren einer solchen ungesteuerten Immunaktivierung hin. Weiterhin wird deutlich, dass auch Checkpoint-blockierende Antikörper zumindest als

Monotherapie in vielen Tumorentitäten keine ausreichende Wirkung haben (Koyama et al. 2016, Zaretsky et al. 2016).

Die weitere Optimierung der Immuntherapie stellt deshalb für die Onkologie die vielleicht wesentliche Herausforderung für die kommenden Jahrzehnte dar. Ein Grund für den begrenzten Erfolg der bisherigen Therapien liegt darin, dass Tumorzellen nur abgestoßen werden können, wenn diese prinzipiell vom Immunsystem des Patienten selbst erkannt werden. Passend zu dieser Hypothese haben Tumore, welche bekanntermaßen eine hohe Mutationslast haben, bessere Ansprechraten auf eine Immuncheckpoint-Therapie gezeigt (Borghaei et al. 2015, Le et al. 2015). Es ist anzunehmen, dass Tumorzellen, welche keine mutationsbedingte Neoantigene exprimieren, nicht oder wenig auf diese Therapie ansprechen (Rizvi et al. 2015). Ein MHC-I Verlust des Tumors, einhergehend mit einer verminderten Präsentation Tumor-spezifischer Antigene, konnte ebenfalls mit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber der Immuncheckpoint-Blockadetherapie in Verbindung gebracht werden (Zaretsky et al. 2016).

Weiterhin kann keine Abstoßung des Tumors erfolgen, wenn die dafür notwendigen Effektor-T-Zellen den Tumor nicht erreichen. Strategien des Tumors, die Migration von CD8⁺ T-Zellen zu verhindern, führen zu einer verminderten Effizienz der Checkpoint-Blockadetherapie (Tumeh et al. 2014). Auf dieser Basis ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Verbesserung der Migration der tumorspezifischen T-Zellen die therapeutische Effizienz steigern könnte (Tang et al. 2016).

1.4.2 Adoptive T-Zell Therapie als Möglichkeit der individualisierten Tumorimmuntherapie

Um diesen Limitationen zu begegnen, ist eine Immuntherapie nötig, welche spezifischer auf die jeweiligen Anforderungen angepasst werden kann. Im Rahmen von adoptiven Zelltherapien werden spezifische Immunzellen in den Patienten transferiert, welche Tumorzellen erkennen und bekämpfen können. Die klinisch angewandten adoptiven Zelltherapien werden in zwei wesentliche Kategorien unterteilt. Zum Einen können autologe, Tumor-reaktive T-Zellen therapeutisch verwendet werden (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs). Zum Anderen können zuvor nicht Tumor-reaktive T-Zellen mit spezifischen T-Zellrezeptoren (TZR) oder chimären Antigenrezeptoren (*chimeric antigen receptor*, CARs) ausgestattet und zur Therapie von Tumorerkrankungen verwendet werden.

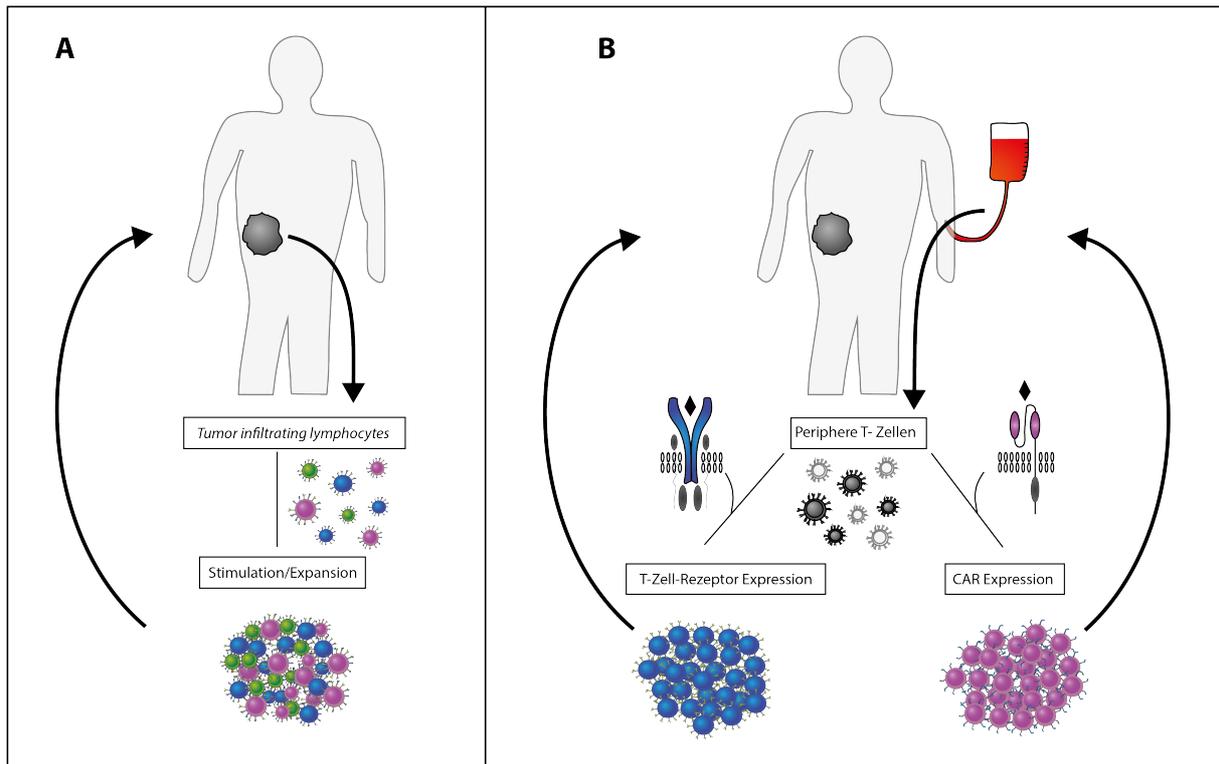


Abbildung 3: Strategien des adoptiven T-Zell-Transfers: A) Tumor infiltrating lymphocytes: Im Rahmen der Therapie mit *tumor infiltrating lymphocytes* werden tumorreaktive T-Zellen aus dem Tumor selbst aufgereinigt und expandiert. Anschließend werden die gewonnenen Zellen im selben Patienten therapeutisch angewandt. Hierbei handelt es sich um ein polyklonales T-Zellprodukt mit in der Regel unbekannter Spezifität. **B) Genetisch modifizierte T-Zellen:** Die heutigen Methoden der Molekularbiologie ermöglichen eine Einbringung der erblichen Information zur Expression von T-Zellrezeptoren bekannter Spezifität oder artifiziellen *chimeric antigen receptors*. Diese Methoden benötigen als Ausgangsmaterial keine *tumor infiltrating lymphocytes* sondern können auch unter Verwendung von peripheren T-Zellen erfolgreich eingesetzt werden. Eigene Abbildung, basierend auf (Fesnak et al. 2016, Rosenberg et al. 2008).

1.4.2.1 Zelltherapie mit TILs

Bereits in den 1980er Jahren wurden erste Studien zur Behandlung von Melanompatienten mittels adoptiv transferierter, autologer T-Zellen (TILs) veröffentlicht, die zuvor aus einem resezierten Tumor der Patienten isoliert worden waren (Rosenberg et al. 1985, Rosenberg et al. 1988). Während diese ursprüngliche Art der Zelltherapie im Wesentlichen den selben Limitationen unterliegt wie die Immuncheckpoint-Blockade, diente sie dennoch als Basis für neue Ansätze, welche diese Grenzen überwinden könnten.

Durch die heutzutage etablierten Anwendungen der Molekularbiologie wie Transfektionen (Dembic et al. 1986), viralen Transduktionen (Cooper et al. 2000), Transposon (Huang et al.

2008)- oder CRISPR/Cas9 (Schumann et al. 2015)-basierten genetischen Modifikationen wird es möglich, Immunzellen genetisch zu modifizieren - eine Entwicklung die der zellulären Immuntherapie zahlreiche neue Möglichkeiten verschafft.

1.4.2.2 Adoptiver Transfer von TZR-modifizierten T-Zellen

T-Zellen können gezielt mit TZR's ausgestattet werden, welche eine Affinität für bekannte Tumorantigenepitope besitzen, um Tumorspezifität zu generieren (Duval et al. 2006, Johnson et al. 2009, Morgan et al. 2013, Robbins et al. 2011). Tumorepitope, die als Zielstruktur im Tumorgewebe in Frage kommen, lassen sich teilweise vorhersagen (Bui et al. 2005). Nach Isolation von T-Zellen mit der erwünschten Spezifität lassen sich die DNA-Sequenzen beider T-Zellrezeptorketten aus einzelnen T-Zellen isolieren und in anderen T-Zellen exprimieren (Doessinger et al. 2013, Knabel et al. 2002).

Auch diese Strategie kann durch den Tumor durch einen Verlust der MHC-I-Expression umgangen werden (Klippel et al. 2014). Weiterhin können die eingebrachten T-Zell-Rezeptorketten nicht nur miteinander, sondern auch mit den endogenen T-Zell-Rezeptorketten paaren (Shao et al. 2010). Dies reduziert zum einen die Zahl funktioneller T-Zellrezeptoren auf der Oberfläche, wodurch eine Funktionsminderung bewirkt werden kann. Zum anderen ist es denkbar, dass T-Zell-Rezeptor-modifizierte T-Zellen weitere Antigene erkennen können. Auch wenn bislang in keiner klinischen Studie nachgewiesen, ist somit theoretisch die Gefahr von Autoimmunphänomenen erhöht. Schließlich haben nicht alle isolierten T-Zell-Rezeptoren eine ausreichende Affinität gegenüber der Zielstruktur. Dies liegt vor allem daran, dass T-Zellen, welche T-Zellrezeptoren einer hohen Affinität exprimieren, präferentiell im Thymus negativ selektiert werden (Enouz et al. 2012, Zehn et al. 2006). Strategien, die Affinität von T-Zellrezeptoren im Nachhinein zu erhöhen, bergen ihrerseits das Risiko, dass auch die Affinität gegenüber anderen Strukturen erhöht wird, wodurch gefährliche Autoimmunphänomene begünstigt werden können (Linette et al. 2013).

1.4.2.3 Adoptiver Transfer von CAR-modifizierten T-Zellen

Ein Teil dieser Limitationen kann durch einen anderen Ansatz der adoptiven T-Zelltherapie umgangen werden. Aufgrund der Entwicklung von CARs, welche unabhängig von MHC-I-Molekülen ihre Zielstrukturen erkennen, ist es derart modifizierten T-Zellen sogar möglich, MHC-I-negative Tumorzellen effizient zu lysieren (Brown et al. 2015, Gross et al. 1989, Lee

et al. 2015, Turtle et al. 2016). Da CARs ihre Funktion als einzelne Rezeptoren ausüben, besteht außerdem keine Gefahr der Fehlpaarung.

Auch CAR-modifizierte T-Zellen bergen jedoch das Risiko von unerwünschter Reaktivität gegenüber anderen Körperstrukturen, wodurch Autoimmunität ausgelöst werden kann (Lamers et al. 2013, Parkhurst et al. 2011). Eine im Vergleich zu T-Zellrezeptor-modifizierten T-Zellen spezielle Limitation für die Anwendung CAR-transduzierter T-Zellen ist weiterhin, dass anders als bei TZR lediglich extrazellulär verfügbare Strukturen durch CARs erkannt werden können, was deren Anwendbarkeit begrenzt. Außerdem konnte kürzlich auch für Therapien mit CAR-transduzierten T-Zellen ein Antigenverlust als Resistenzmechanismus der Tumorzellen beschrieben werden (Jacoby et al. 2016).

Ein wesentlicher Vorteil beider Formen der adoptiven T-Zelltherapie mit *ex vivo* generierten, spezifischen T-Zellen ist die Unabhängigkeit von der Isolation der TILs, welche nur begrenzt zugänglich sind. Somit wäre es auch möglich, im Verlauf der Therapie eines Tumorleidens mehrere Strategien sequentiell zu verfolgen.

1.5 Experimentelle Ansätze zur Verbesserung von Effizienz und Sicherheit des adoptiven T-Zelltransfers

Durch die gezielte genetische Modifikation adoptiv transferierter T-Zellen ergeben sich neben der Generierung von Tumorspezifität über die Expression von TZRs oder CARs noch weitere Möglichkeiten. So können therapeutisch verwendete T-Zellen in ihrer Funktion verbessert, oder aber die Sicherheit der Applikation von solchen Zellprodukten erhöht werden.

1.5.1 Überexpression von Genen zur Verbesserung der T-Zellfunktion

So können zusätzlich zu einem TZR oder CAR weitere Proteine in T-Zellen exprimiert werden, um die Funktion der T-Zellen positiv zu beeinflussen oder zu einer Resistenz der T-Zellen gegenüber Tumor-induzierten Immunsuppressionsstrategien beizutragen. Auf diese Weise ist es möglich, durch die forcierte Expression von Chemokinrezeptoren in adoptiv transferierten T-Zellen, die Migrationseigenschaften von therapeutisch genutzten T-Zellen in das Tumorgewebe zu verbessern (Craddock et al. 2010, Di Stasi et al. 2009, Moon et al. 2011, Peng et al. 2010, Siddiqui et al. 2016). Es muss in diesem Zusammenhang allerdings darauf hingewiesen werden, dass die meisten publizierten Studien in immunkompromittierten

Mäusen mit humanen Effektor- und Zielzellen durchgeführt wurden (Xenograft). Sie können daher nur zeigen, dass grundsätzlich eine verbesserte Migration den therapeutischen Nutzen einer T-Zelltherapie steigern könnte, nicht jedoch, dass ein solcher Ansatz auch in einem immunkompetenten Umfeld erfolgreich sein kann. In einem Xenograft-Modell ist der humane Tumor die einzige Quelle des humanen Chemokins, dessen Gradienten die adoptiv transferierten Zellen folgen. Somit ist es nicht möglich, eine Vorhersage zu treffen, in welche Kompartimente die Zellen in einem nicht artifiziellen System migrieren würden.

Weiterhin können T-Zellen so verändert werden, dass sie immunstimulatorische Faktoren sezernieren, welche dem immunsuppressiven Tumormilieu entgegen wirken können. Dies konnte zum Beispiel für eine forcierte Expression von Interleukin-12 (IL-12) durch adoptiv transferierte T-Zellen gezeigt werden (Chinnasamy et al. 2012, Chmielewski et al. 2011). Bei diesem Ansatz wird die Sekretion von IL-12 unter die Kontrolle des NFAT-Promotors gestellt. Dies führt dazu, dass dieses hochpotente Zytokin nur nach Antigenerkennung durch die transferierten T-Zellen (lokal im Tumor) freigesetzt wird.

Schließlich ist es möglich, den adoptiv transferierten T-Zellen einen Vorteil in der direkten Interaktion mit den Tumorzellen zu verschaffen. Mit molekularbiologischen Methoden können T-Zellen auf der einen Seite mit einer größeren Widerstandskraft gegen Tumor-abhängige Apoptoseinduktion ausgestattet werden (Charo et al. 2005, Dotti et al. 2005). Über die ektopische Expression von stimulatorischen Rezeptoren, welche Tumor-assoziierte Zytokine erkennen, können therapeutische T-Zellen von bereits im Tumor vorhandenen Signalen profitieren (Lo et al. 2008). Hierbei können auch artifizielle chimäre Rezeptoren verwendet werden, welche das Signal im Tumorstroma vorkommender Zytokine in ein T-Zell stimulierendes Signal umwandeln können (Leen et al. 2014).

1.5.2 Suppression und Deletion von Genen

Neben der Überexpression von Genen, welche die T-Zellfunktion optimieren, besteht die Möglichkeit, gezielt solche Gene zu supprimieren oder vollständig zu entfernen, welche eine negative Funktion auf T-Zellen ausüben.

Mit Hilfe von in therapeutisch verwendeten T-Zellen eingebrachter, inhibitorischer siRNA lässt sich die Expression spezifischer Gene transient reduzieren (Hinterleitner et al. 2012, Ohta et al. 2006). Um einen dauerhaften Effekt zu erzielen, kann das jeweilige Gen so

modifiziert werden, dass es kein funktionelles Protein mehr erzeugen kann. Unter Verwendung solcher *knock-out*-Strategien ist es beispielshalber möglich, das zuvor beschriebene Risiko der T-Zellrezeptor Fehlpaarung zu reduzieren, indem die Alpha- und Beta-Ketten des endogenen TCR aus den Zellen entfernt wird (Provasi et al. 2012).

Die Entwicklung von CRISPR/Cas9-basierten *knock-out*-Methoden führte in den letzten Jahren zu einer verbesserten Effizienz solcher Strategien. Somit ist es möglich geworden, auch andere T-Zell inhibierende Proteine wie PD-1 an der Expression zu hindern (Su et al. 2016). Durch die gleichzeitige Modifikation mehrerer Gene können beispielshalber sowohl endogener T-Zellrezeptor als auch PD-1 in therapeutisch verwendeten T-Zellen entfernt werden. Ein zusätzlicher *knock-out* von HLA-Molekülen könnte sogar eine Anwendung von allogenen T-Zellen als Therapeutikum ermöglichen (Ren et al. 2016).

1.5.3 Strategien zur Verbesserung der Sicherheit adoptiver Zelltransfers

Neben der Verbesserung der T-Zellfunktion können gentechnische Methoden weiterhin dazu verwendet werden, die Sicherheit der Applikation von therapeutischen T-Zellprodukten zu verbessern. Im Rahmen der T-Zelltherapie treten teilweise gravierende Nebenwirkungen auf, welche einen Abbruch der Therapie erforderlich machen können. Hierbei kann man zwei wesentliche Mechanismen unterscheiden. Auf der einen Seite können T-Zellen über ihre jeweilige Spezifität andere Organe angreifen, wodurch es zu einer Zielstruktur-spezifischen Toxizität kommen kann (Lamers et al. 2013, Linette et al. 2013, Parkhurst et al. 2011). Des Weiteren werden, vor allem bei hochpotenten CAR-modifizierten T-Zellen, wie sie bei akuten lymphatischen Leukämien eingesetzt werden, Nebenwirkungen beobachtet, welche durch die systemische Aktivierung der T-Zellen entstehen (Brentjens et al. 2010, Davila et al. 2014, Kochenderfer et al. 2012).

Um im Falle von Nebenwirkungen die Therapie schnellstmöglich abbrechen zu können, werden Strategien verfolgt, die es erlauben, die therapeutisch verwendeten T-Zellen bei Bedarf selektiv auszuschalten. Über die Koexpression von Markerproteinen wie einem trunkierten hEGFR können die transferierten T-Zellen mit Hilfe von klinisch etablierten Antikörpern depletiert werden (Paszkiwicz et al. 2016, Wang et al. 2011). Andere Ansätze versehen therapeutisch genutzte T-Zellen mit induzierbaren Proteinen, welche selektiv in diesen Zellen Apoptose auslösen. So können T-Zellen mit einer speziellen Form der Caspase 9 modifiziert werden, um durch die Applikation von einem *small molecule* selektiv in

diesen Zellen Apoptose auszulösen (Straathof et al. 2005). In ähnlicher Weise funktioniert die Expression der Herpes-simplex-Virus-spezifischen Thymidinkinase in transferierten Zellen, welche so mit dem etablierten Medikament Ganciclovir ausgeschaltet werden können (Barese et al. 2012, Jensen et al. 2010).

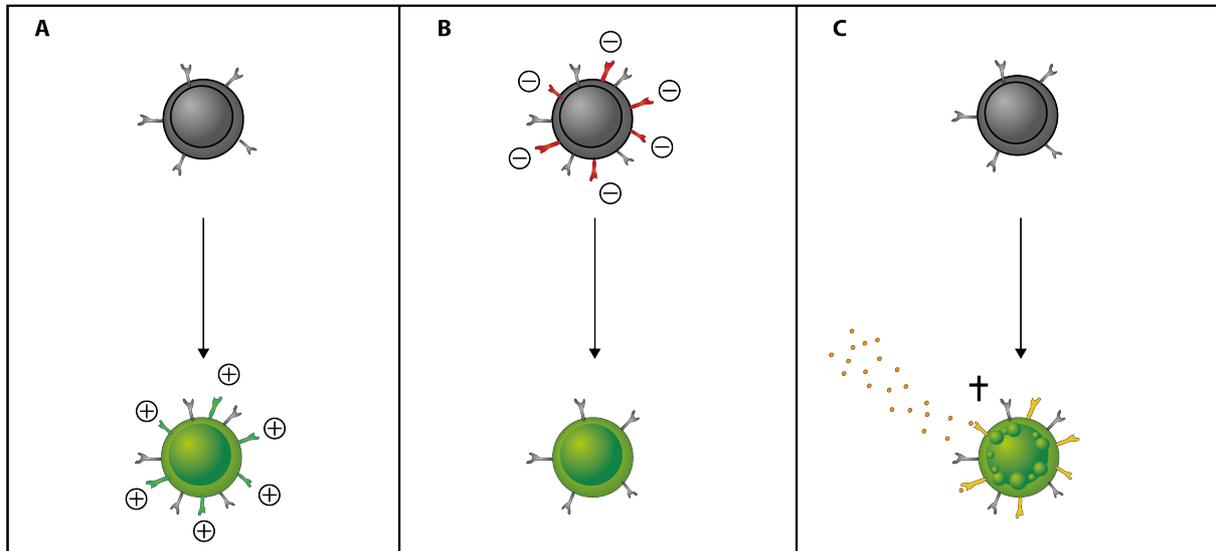


Abbildung 4: Genetische Modifikationen zur Verbesserung der Effizienz und der Sicherheit des adoptiven T-Zelltransfers: **A) Überexpression:** Zusätzlich zu TZRs oder CARs können Gene in therapeutisch verwendete T-Zellen eingebracht werden, welche deren Funktion verbessern. **B) Deletion:** Gene, welche die Effizienz von T-Zellprodukten verschlechtern, können selektiv inhibiert oder ausgeschaltet werden. **C) Safety-Ansätze:** Durch die Ausstattung von adoptiv transferierten T-Zellen mit spezifischen Proteinen lassen sich diese im Falle von Nebenwirkungen depletieren. Eigene Abbildung, basierend auf (Fesnak et al. 2016).

1.6 Fragestellungen der Promotionsarbeit

Die bahnbrechenden Erfolge der Immuncheckpoint-blockierenden Therapie machen deutlich, wie wichtig die T-Zell regulierenden koinhibitorischen Moleküle wie CTLA-4 oder PD-1 für die Funktion dieser Zellen sind. Jedoch geht eine systemische Blockade dieser inhibitorischen Achsen mit einer ungerichteten Aktivierung des Immunsystems einher, da nicht nur Tumor-spezifische T-Zellen aktiviert werden. Um solche Nebeneffekte zu vermeiden ist es notwendig, Strategien zu entwickeln, welche diese immuninhibitorischen Achsen nur in Tumor-spezifischen T-Zellen angreifen.

Auch wenn es gelingt, die Aktivität von Tumor-spezifischen T-Zellen zu erhöhen, ist ein Erfolg solcher Ansätze abhängig davon, ob therapeutisch genutzte T-Zellen überhaupt den Tumor erreichen. Viele solide Tumorentitäten verhindern effizient die Immigration von Immun-Effektorzellen, was die Immuntherapie solcher Tumore vor allem im Vergleich mit

hämatologischen Malignomen erschwert. Um dieser Limitation zu begegnen ist es unabdingbar, Strategien zu erforschen, die gezielte Migration von Tumor-spezifischen T-Zellen in das Tumorstroma zu ermöglichen.

2. Zusammenfassung der präsentierten Publikationen

In unseren Arbeiten haben wir genetische Modifikationen für T-Zellen entwickelt, welche spezifisch die PD-1-abhängige Immunsuppression Tumor-spezifischer T-Zellen aushebeln und die Migration dieser T-Zellen in den Tumor verbessern können.

Für die CD28-Rezeptorfamilie ist beschrieben, dass es möglich ist, über eine artifizielle Fusion der extrazellulären Domäne eines Rezeptors mit der intrazellulären Domäne eines anderen Rezeptors das in die Zelle übertragene Signal zu transformieren (Parry et al. 2005). Eine Bindung des Liganden des ersten führt somit zu einem Signal im Sinne des zweiten Rezeptors, welcher die intrazelluläre Domäne stellt.

Wir exprimierten in Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen einen selbst erstellten, artifiziellen Rezeptor bestehend aus der extrazellulären Domäne von PD-1 und der intrazellulären Domäne von CD28. In diesen T-Zellen wird das eigentliche inhibitorische Signal, welches durch die Bindung von PD-L1 an PD-1 ausgelöst wird, in ein kostimulatorisches Signal umgewandelt. Die forcierte Kostimulation bewirkt eine verbesserte Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen. In unseren anschließenden Therapieversuchen, konnten die in dieser Weise modifizierten T-Zellen auch *in vivo* zu einer deutlichen Verbesserung der Therapieeffizienz führen.

Physiologischerweise wird die Expression von PD-L1 in Tumoren durch Interferon- γ stimuliert (Abiko et al. 2015). Sobald die tumorspezifischen, adoptiv transferierten T-Zellen den Tumor erkennen, wird dieses Zytokin freigesetzt. Um die weitere Aktivierung der T-Zellen zu verhindern, erfolgt die Expression von PD-L1 durch die Tumorzellen. Dieser Mechanismus wird jedoch durch unseren Rezeptor in sein Gegenteil umgewandelt.

Diese Strategie birgt im Vergleich zu etablierten Therapien einen weiteren Vorteil. Wie bereits erwähnt, ist eine relevante Limitierung der bereits erfolgreich eingesetzten Immuncheckpoint-Blockade dadurch bedingt, dass schwere Autoimmunphänomene auftreten können. In unserem Konzept werden durch die selektive genetische Modifikation adoptiv transferierter Tumor-spezifischer T-Zellen die Vorteile einer Immuncheckpoint-Blockade ausgenutzt und gleichzeitig die Gefahren von Autoimmunphänomenen reduziert.

Da eine Kostimulation (Signal 2) ohne ein TZR-Signal (Signal 1) nicht erfolgreich ist, führt die Bindung von PD-L1 an unseren Fusionsrezeptor nur zu einer Aktivierung der therapeutisch genutzten CD8⁺ T-Zellen nach Bindung des TZR an sein spezifisches Peptid. Folglich sind in diesem Konzept nur die therapeutisch genutzten Antigen-spezifischen T-Zellen resistent gegenüber PD-1 abhängiger Koinhibition, wodurch Autoimmunphänomene abhängig von dem jeweiligen TZR nicht oder vorhersehbar auftreten würden.

In unserer zweiten Publikation untersuchen wir die Verbesserung der Migration von T-Zellen zur Steigerung der Therapieeffizienz des adoptiven T-Zelltransfers. Die CCL22-bedingte Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen stellt einen wichtigen Mechanismus dar, um ein immunsuppressives Milieu in Tumoren zu schaffen (Anz et al. 2015, Gobert et al. 2009). Da CD8⁺ T-Zellen den Rezeptor für CCL22 – CCR4 – nur in sehr geringem Maße exprimieren, ermöglicht die Sekretion von CCL22 dem Tumor eine Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen ohne zytotoxische T-Zellen zu rekrutieren.

Durch Transduktion von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit CCR4 kann diese Achse gegen den Tumor verwendet werden. Anstatt nur regulatorische T-Zellen in das Tumorgewebe zu locken, werden auch CCR4-transduzierte CD8⁺ T-Zellen rekrutiert, welche den Tumor attackieren und *in vivo* zu einer deutlich verbesserten Therapieeffizienz führten.

Da dendritische Zellen im Tumorstroma CCL22 produzieren (Anz et al. 2015, Wiedemann et al. 2016), untersuchten wir weiterhin die Rolle der Chemokin-vermittelten Affinitätssteigerung von LFA-1 (Giagulli et al. 2004), welches mit ICAM-1 auf dendritischen Zellen interagiert (Onishi et al. 2008). Die Transduktion mit CCR4 führte zu einer LFA-1 abhängigen Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch Peptid-beladene dendritische Zellen. Dies zeigt, dass nicht nur die Migration von therapeutisch verwendeten T-Zellen durch Transduktion mit Chemokinrezeptoren verbessert werden kann, sondern dirigierte Migration zumindest indirekt auch zu einer Aktivierung von T-Zellen genutzt werden kann. Die Translation dieser Strategien in wirksame Therapiekonzepte muss in weiteren Arbeiten adressiert werden.

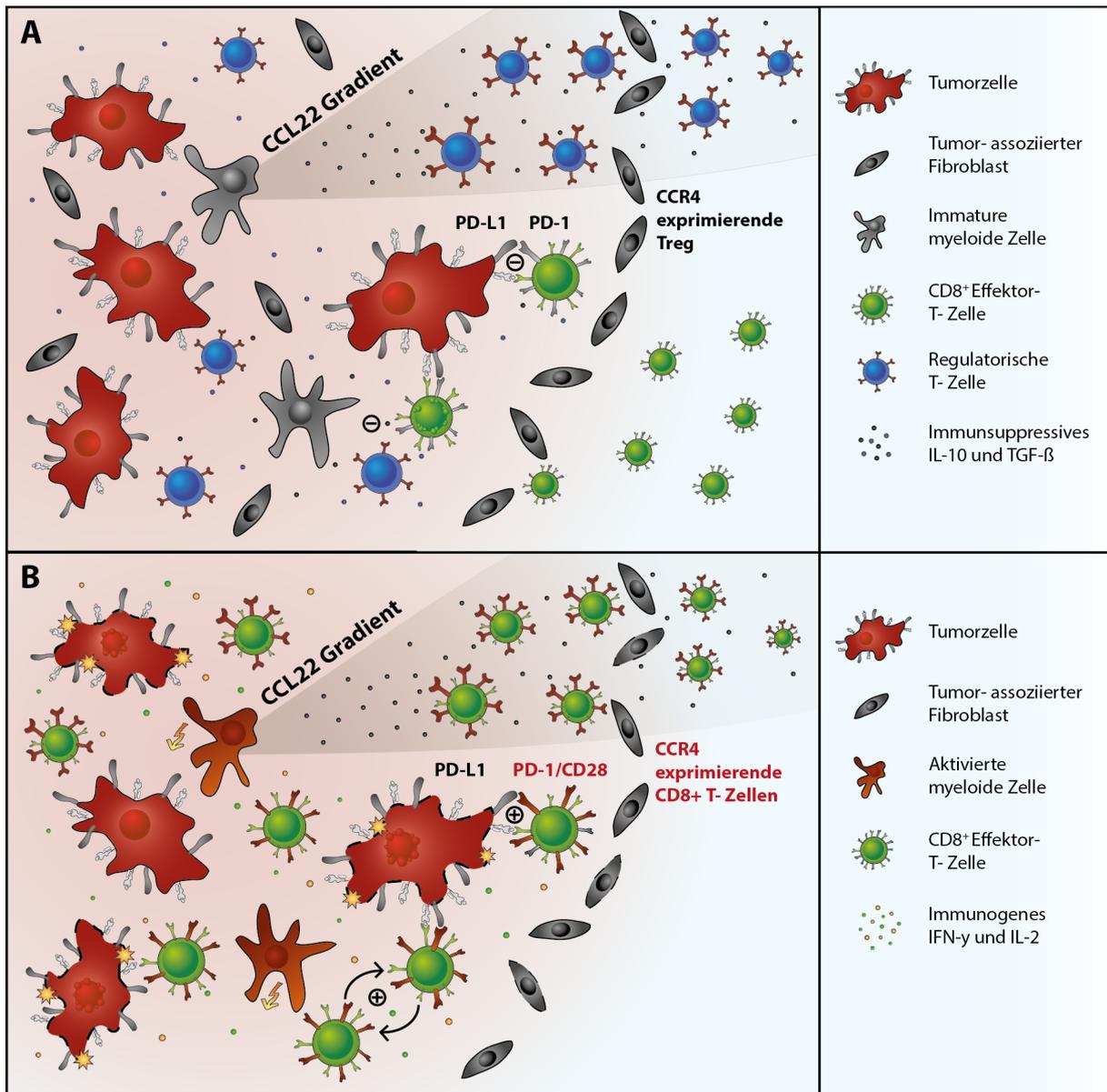


Abbildung 5: Überblick über die Konzepte welche beiden Publikationen zugrunde liegen: A) Limitationen der adoptiven T-Zelltherapie in soliden Tumoren: Im Tumor gebildetes CCL22 rekrutiert über seine Bindung an CCR4 regulatorische T-Zellen, welche ein immunsuppressives Milieu erhalten. Die Tumorzellen exprimieren hohe Mengen an PD-L1, welches Effektor-T-Zellen direkt in ihrer Funktion inhibiert. **B) Ansätze zur Überwindung der Immunsuppression in soliden Tumoren:** Durch Transduktion tumorreaktiver CD8⁺ T-Zellen mit CCR4 werden anstelle von Treg nun auch CD8⁺ T-Zellen durch CCL22 rekrutiert. Die Expression eines PD-1-CD28-Fusionsrezeptors führt zu einer Umwandlung des hemmenden PD-1-Signals in ein stimulierendes CD28-Signal. Tumorreaktive, transduzierte CD8⁺ T-Zellen werden lokal zur Proliferation und Ausschüttung von immunstimulierenden Zytokinen angeregt. Eigene Abbildung, basierend auf (Ott et al. 2013, Roussos et al. 2011).

3. Summary of the presented publications

In the presented publications we genetically engineered T cells to specifically overcome PD-1-mediated T cell suppression in solid tumors and to improve tumor-directed migration of tumor-specific T cells.

It has previously been shown that CD28 family members can be fused to one another to modify their signaling (Parry et al. 2005). Binding of the ligand of one member thereby results in a signal specific for the member contributing the intracellular domain.

We generated and expressed an artificial receptor comprising the extracellular domain of PD-1 and the intracellular domain of CD28 in antigen-specific CD8⁺ T cells. In T cells, harboring this fusion receptor, the inhibitory signal mediated by binding of PD-L1 to PD-1 is transformed into a co-stimulatory CD28 signal. This forced co-stimulation culminates in an enhanced activation of CD8⁺ T cells. Furthermore, T cells modified with our fusion receptor mediated enhanced therapeutic efficacy *in vivo*.

PD-L1 expression on tumor cells is controlled by interferon- γ (Abiko et al. 2015). Adoptively transferred tumor-specific T cells release this cytokine upon recognition of tumor cells. To prevent further activation of T cells, tumor cells upregulate the inhibitory ligand PD-L1. The impact of PD-L1-mediated suppression is however reversed through our fusion receptor.

This strategy holds further advantage over established therapies targeting PD-L1 in cancer. A major limitation of immune checkpoint blockade is autoimmunity. Restricted expression of our fusion receptor to adoptively transferred tumor-specific T cells maintains the advantages of immune checkpoint blockade while reducing the probability of autoimmune phenomena.

As co-stimulation (signal 2) requires TCR signaling (signal 1), binding of PD-L1 to adoptively transferred CD8⁺ T cells does not result in activation if no antigen is recognized. We can thereby protect therapeutically applied T cells specifically from PD-L1-mediated immunosuppression. Autoimmunity would only occur in dependence of the TCR expressed on adoptively transferred T cells and may thus either be absent or predictable in a clinical setting.

In our second publication, we sought to improve the migration of T cells to the tumor site in order to enhance the efficacy of adoptively transferred T cells. Many tumors express CCL22 to recruit regulatory T cells which contribute to immunosuppression in the tumor stroma (Anz et al. 2015, Gobert et al. 2009). CD8⁺ T cells do not express CCR4 which is the receptor for CCL22. Therefore, CCL22 secretion leads to a specific enrichment of regulatory T cells over CD8⁺ T cells in tumors.

We show that transduction of CD8⁺ tumor-specific T cells with CCR4 can be used to hijack this immunosuppressive axis in tumors. CCL22 expression no longer specifically recruits regulatory T cells, as adoptively transferred CD8⁺ T cells can migrate into the tumor in a CCL22 dependent manner. Recognition of the tumor by these migrating CD8⁺ T cells leads to increased therapeutic efficacy *in vivo*.

Since dendritic cells are a major source of CCL22 in tumor tissues (Anz et al. 2015, Wiedemann et al. 2016), we investigated the role of CCR4 in the interactions of dendritic cells with CD8⁺ T cells. Chemokine receptor signaling in T cells leads to an increase of LFA-1 affinity (Giagulli et al. 2004) to its ligand ICAM-1 expressed on dendritic cells (Onishi et al. 2008). CCR4 transduction enhanced activation of T cells by peptide-pulsed dendritic cells in an LFA-1 dependent manner. Hereby we can show that engineering T cells with chemokine receptors not only results in enhanced migration but can also indirectly affect activation of T cells. The potential translation of our strategies into clinical concepts needs to be addressed in further studies.

4. Abkürzungsverzeichnis mit Glossar

Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9; Endonuklease, welche mit Hilfe von DNA-bindender RNA an spezifischen Stellen des Genoms Strangbrüche verursacht, welche für zahlreiche Methoden der Molekularbiologie genutzt werden können.
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i> , Chimärer Antigen-Rezeptor; Rezeptor, welcher aus einer variablen Einzelkette eines Antikörpers (extrazellulär) und einer T-Zellrezeptor spezifischen Signaldomäne (CD3zeta Kette, intrazellulär) aufgebaut ist. Fakultativ können zusätzlich kostimulatorische intrazelluläre Domänen vorhanden sein.
Caspase 9	Protein, welches in eukaryoten Zellen Apoptose auslösen kann
CCL22	C-C-Chemokinligand 22
CCR4	C-C-Chemokinrezeptor Typ 4
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> ; Markerprotein zytotoxischer T-Zellen, Korezeptor für den TZR
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> ; Immunsystem-ähnliche Region bakterieller DNA, in der Motive von Bakteriophagen-spezifischen Sequenzen hinterlegt werden, welche anschließend erkannt und unschädlich gemacht werden können
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> ; koinhibitorischer Rezeptor der CD28 Rezeptorfamilie, exprimiert auf T-Zellen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DC	<i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle; Familie von Antigen-präsentierenden myeloiden Zellen, welche T-Zellen aktivieren können
Ektop	Expression in einem nicht üblichen Gewebe
<i>Escape</i>	Erfolg des Tumors, der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen
<i>Ex vivo</i>	Aus einem lebenden Individuum gewonnen
Fas	Rezeptor welcher nach Bindung seines Liganden Apoptose in der exprimierenden Zelle auslöst
Fas-L	Fas-Ligand; Bindet an Fas
hEGFR	Humaner EGF-Rezeptor, in trunkierter Form ohne intrazelluläre Signaldomäne häufig als extrazellulär zugänglicher Marker verwendet

ICAM-1	Ligand von LFA-1, welcher vor allem an Gefäßwänden und auf Immunzellen exprimiert wird
IFN- γ	Interferon- γ ; Effektorzytokin von CD8 ⁺ T-Zellen und Effektor-T-Zellen
IL-2	Interleukin-2; Zytokin, welches für die Proliferation der meisten T-Zellgruppen essenziell ist
IL-10	Interleukin-10; immunsuppressives Zytokin
IL-12	Interleukin-12; immunstimulatorisches Zytokin, welches seine Wirkung vor allem auf Effektor-T-Zellen und NK-Zellen ausübt
<i>Immunoediting</i>	Prozess während der Interaktion des Immunsystems mit einem Tumor, im Rahmen dessen das Immunsystem Selektionsdruck auf den Tumor ausübt und dadurch zur Immunresistenz des Tumors beiträgt
<i>Immunosurveillance</i>	Immunüberwachung; Fähigkeit des Immunsystems, maligne transformierte Zellen zu erkennen und abzutöten
<i>Knock-out</i>	Entfernen oder derartige Modifikation eines Gens, welche zu einem vollständigen Verlust der Funktionalität des Gens führt
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> ; Integrin, welches von Leukozyten exprimiert wird und Funktionen bei der Adhäsion, Extravasation sowie der Interaktion von Immunzellen erfüllt. Ein wichtiger Ligand ist ICAM-1
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex class I</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I; Proteinkomplex welcher prozessierte Peptidfragmente (Epitope) präsentiert, welche im Proteasom entstehen (Komplex zum Abbau von zellulären Proteinen). Bindet an CD8 auf zytotoxischen T-Zellen
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i> , Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen; Transkriptionsfaktor, welcher in Abhängigkeit von einem T-Zellrezeptorsignal in den Zellkern transloziert und NFAT-abhängige Promotoren aktiviert
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i> , Programmierter Zelltod Protein 1; koinhibitorischer Rezeptor der CD28 Rezeptorfamilie, exprimiert auf T-Zellen
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i> , Programmierter Zelltod Ligand 1; Ligand von PD-1, welcher nach Bindung T-Zellen hemmt
<i>Prediction tool</i>	Vorhersage-Werkzeug; Überbegriff für computerbasierte Software, welche anhand von <i>in silico</i> Berechnungen biologische Prozesse simuliert. Beispielsweise können so Peptide identifiziert werden, welche an MHC-Molekülen präsentiert werden können
<i>Small molecule</i>	Organisches Molekül, welches spezifische Proteininteraktionen auslöst oder hemmt (<i>small molecule inhibitor</i>)

siRNA	<i>Small inhibitory RNA</i> ; RNA welche mit der Expression von spezifischen Genen interferiert
<i>Targeted therapies</i>	Gezielte Krebstherapie; Therapie mit Antikörpern oder Molekülen, welche ihre Wirkung auf spezifische Zielstrukturen des Tumors ausüben
TZR	T-Zellrezeptor; Rezeptor bestehend aus einer Alpha- und einer Betakette, welcher MHC gebundene Peptidfragmente (Epitope) erkennt
TILs	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i> , Tumordinfiltrierende Lymphozyten; Oberbegriff aller Lymphozyten, welche im Tumor existieren und aus diesem isoliert werden können
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> , Transformierender Wachstumsfaktor- β ; immunsuppressives Zytokin
Treg	Regulatorische T-Zellen, welche immunsuppressiv wirken

5. Referenzen

1. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M. IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2015; 112:1501-9.
2. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996; 8:765-72.
3. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattry D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372:311-9.
4. Anz D, Rapp M, Eiber S, Koelzer VH, Thaler R, Haubner S, Knott M, Nagel S, Golic M, Wiedemann GM, Bauernfeind F, Wurzenberger C, Hornung V, Scholz C, Mayr D, Rothenfusser S, Endres S, Bourquin C. Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression. *Cancer Res* 2015; 75:4483-93.
5. Barese CN, Krouse AE, Metzger ME, King CA, Traversari C, Marini FC, Donahue RE, Dunbar CE. Thymidine kinase suicide gene-mediated ganciclovir ablation of autologous gene-modified rhesus hematopoiesis. *Mol Ther* 2012; 20:1932-43.
6. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373:1627-39.
7. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2010; 18:666-8.

8. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, Naranjo A, Starr R, Wagner J, Wright C, Zhai Y, Bading JR, Ressler JA, Portnow J, D'Apuzzo M, Forman SJ, Jensen MC. Bioactivity and safety of IL13R α 2-redirected chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21:4062-72.
9. Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, Mothe BR, Chisari FV, Watkins DI, Sette A. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics* 2005; 57:304-14.
10. Charo J, Finkelstein SE, Grewal N, Restifo NP, Robbins PF, Rosenberg SA. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T cell survival. *Cancer Res* 2005; 65:2001-8.
11. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:227-42.
12. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, Rosenberg SA. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1672-83.
13. Chiu DK, Xu IM, Lai RK, Tse AP, Wei LL, Koh HY, Li LL, Lee D, Lo RC, Wong CM, Ng IO, Wong CC. Hypoxia induces myeloid-derived suppressor cell recruitment to hepatocellular carcinoma through chemokine (C-C motif) ligand 26. *Hepatology* 2016; 64:797-813.
14. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 2011; 71:5697-706.
15. Cooper LJ, Kalos M, Lewinsohn DA, Riddell SR, Greenberg PD. Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T cell receptor genes. *J Virol* 2000; 74:8207-12.
16. Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, Foster AE. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother* 2010; 33:780-8.

17. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.
18. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2014; 6:224ra25.
19. Dembic Z, Haas W, Weiss S, McCubrey J, Kiefer H, von Boehmer H, Steinmetz M. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 1986; 320:232-8.
20. Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, Foster AE, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G, Savoldo B. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 2009; 113:6392-402.
21. Ding Y, Shen J, Zhang G, Chen X, Wu J, Chen W. CD40 controls CXCR5-induced recruitment of myeloid-derived suppressor cells to gastric cancer. *Oncotarget* 2015; 6:38901-11.
22. Doessinger G, Bunse M, Bet J, Albrecht J, Paszkiewicz PJ, Weissbrich B, Schiedewitz I, Henkel L, Schiemann M, Neuenhahn M, Uckert W, Busch DH. MHC multimer-guided and cell culture-independent isolation of functional T cell receptors from single cells facilitates TCR identification for immunotherapy. *PLoS One* 2013; 8:e61384.
23. Dotti G, Savoldo B, Pule M, Straathof KC, Biagi E, Yvon E, Vigouroux S, Brenner MK, Rooney CM. Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Blood* 2005; 105:4677-84.
24. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
25. Duval L, Schmidt H, Kaltoft K, Fode K, Jensen JJ, Sorensen SM, Nishimura MI, von der Maase H. 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; 12:1229-36.

26. Enouz S, Carrie L, Merkler D, Bevan MJ, Zehn D. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med* 2012; 209:1769-79.

27. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176:6752-61.

28. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016; 375:1856-67.

29. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016; 16:566-81.

30. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027-34.

31. Gevensleben H, Dietrich D, Golletz C, Steiner S, Jung M, Thiesler T, Majores M, Stein J, Uhl B, Muller S, Ellinger J, Stephan C, Jung K, Brossart P, Kristiansen G. The immune checkpoint regulator PD-L1 is highly expressed in aggressive primary prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22:1969-77.

32. Giagulli C, Scarpini E, Ottoboni L, Narumiya S, Butcher EC, Constantin G, Laudanna C. RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity* 2004; 20:25-35.

33. Giorda E, Sibilio L, Martayan A, Moretti S, Venturo I, Mottolese M, Ferrara GB, Cappellacci S, Eibenschutz L, Catricala C, Grammatico P, Giacomini P. The antigen processing machinery of class I human leukocyte antigens: linked patterns of gene expression in neoplastic cells. *Cancer Res* 2003; 63:4119-27.
34. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009; 69:2000-9.
35. 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; 86:10024-8.
36. Haas J, Schopp L, Storch-Hagenlocher B, Fritzsching B, Jacobi C, Milkova L, Fritz B, Schwarz A, Suri-Payer E, Hensel M, Wildemann B. Specific recruitment of regulatory T cells into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis. *Blood* 2008; 111:761-6.
37. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. β 2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 1998; 101:2720-9.
38. Hinterleitner R, Gruber T, Pfeifhofer-Obermair C, Lutz-Nicoladoni C, Tzankov A, Schuster M, Penninger JM, Loibner H, Lametschwandtner G, Wolf D, Baier G. Adoptive transfer of siRNA Cblb-silenced CD8⁺ T lymphocytes augments tumor vaccine efficacy in a B16 melanoma model. *PLoS One* 2012; 7:e44295.
39. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:711-23.

40. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66:1123-31.
41. Huang X, Guo H, Kang J, Choi S, Zhou TC, Tammana S, Lees CJ, Li ZZ, Milone M, Levine BL, Tolar J, June CH, Scott McIvor R, Wagner JE, Blazar BR, Zhou X. Sleeping Beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19+ lymphoid malignancies. *Mol Ther* 2008; 16:580-9.
42. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2335-42.
43. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11:3887-95.
44. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:12293-7.
45. Jacoby E, Nguyen SM, Fountaine TJ, Welp K, Gryder B, Qin H, Yang Y, Chien CD, Seif AE, Lei H, Song YK, Khan J, Lee DW, Mackall CL, Gardner RA, Jensen MC, Shern JF, Fry TJ. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun* 2016; 7:12320.
46. Jaffe N, Frei E, Traggis D, Bishop Y. Adjuvant methotrexate and citrovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma. *N Engl J Med* 1974; 291:994-7.
47. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 177:896-904.
48. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, Forman SJ. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively

transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1245-56.

49. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009; 114:535-46.

50. Jung HI, Jeong D, Ji S, Ahn TS, Bae SH, Chin S, Chung JC, Kim HC, Lee MS, Baek MJ. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res Treat* 2017; 49:246-54.

51. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:1788-95.

52. Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 2002; 95:1592-600.

53. Klippel ZK, Chou J, Towlerton AM, Voong LN, Robbins P, Bensinger WI, Warren EH. Immune escape from NY-ESO-1-specific T cell therapy via loss of heterozygosity in the MHC. *Gene Ther* 2014; 21:337-42.

54. Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, Wulf A, Villmow B, Schmidt B, Bernhard H, Wagner H, Busch DH. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 2002; 8:631-7.

55. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; 119:2709-20.

56. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, Gandhi L, Redig AJ, Rodig SJ, Asahina H, Jones RE, Kulkarni MM, Kuraguchi M, Palakurthi S, Fecci PE, Johnson BE, Janne PA, Engelman JA, Gangadharan SP, Costa DB, Freeman GJ,

Bueno R, Hodi FS, Dranoff G, Wong KK, Hammerman PS. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016; 7:10501.

57. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, Vulto A, den Bakker M, Oosterwijk E, Debets R, Gratama JW. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol Ther* 2013; 21:904-12.

58. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2:261-8.

59. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509-20.

60. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271:1734-6.

61. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS, Mackall CL. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015; 385:517-28.

62. Leen AM, Sukumaran S, Watanabe N, Mohammed S, Keirnan J, Yanagisawa R, Anurathapan U, Rendon D, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Vera JF. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor. *Mol Ther* 2014; 22:1211-20.

63. Li MC, Hertz R, Bergenstal DM. Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *N Engl J Med* 1958; 259:66-74.

64. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, Litzky L, Bagg A, Carreno BM, Cimino PJ, Binder-Scholl GK, Smethurst DP, Gerry AB, Pumphrey NJ, Bennett AD, Brewer JE, Dukes J, Harper J, Tayton-Martin HK, Jakobsen BK, Hassan NJ,

Kalos M, June CH. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 2013; 122:863-71.

65. Lo AS, Taylor JR, Farzaneh F, Kemeny DM, Dibb NJ, Maher J. Harnessing the tumour-derived cytokine, CSF-1, to co-stimulate T cell growth and activation. *Mol Immunol* 2008; 45:1276-87.

66. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:4676-80.

67. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 2011; 208:1949-62.

68. Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, Powell DJ, Jr., Riley JL, June CH, Albelda SM. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res* 2011; 17:4719-30.

69. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 2013; 36:133-51.

70. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, Castellano D, Choueiri TK, Gurney H, Donskov F, Bono P, Wagstaff J, Gauder TC, Ueda T, Tomita Y, Schutz FA, Kollmannsberger C, Larkin J, Ravaud A, Simon JS, Xu LA, Waxman IM, Sharma P. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373:1803-13.

71. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007; 13:828-35.

72. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition

by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6:117-27.

73. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11:141-51.

74. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1420-5.

75. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:13132-7.

76. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10113-8.

77. Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2013; 19:5300-9.

78. Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunol Cell Biol* 2003; 81:106-13.

79. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan DN, Feldman SA, Davis JL, Morgan RA, Merino MJ, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, Phan GQ, Lim RM, Wank SA, Restifo NP, Robbins PF, Laurencot CM, Rosenberg SA. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 2011; 19:620-6.

80. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005; 25:9543-53.

81. Paszkiewicz PJ, Frassle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, Sadelain M, Liu L, Jensen MC, Riddell SR, Busch DH. Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest* 2016; 126:4262-72.
82. Peng W, Ye Y, Rabinovich BA, Liu C, Lou Y, Zhang M, Whittington M, Yang Y, Overwijk WW, Lizee G, Hwu P. Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* 2010; 16:5458-68.
83. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005; 6:280-6.
84. Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, Schutyser E, Put W, Parmentier M, Struyf S, Van Damme J. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* 2007; 110:37-44.
85. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu PQ, Reik A, Chu V, Paschon DE, Zhang L, Kuball J, Camisa B, Bondanza A, Casorati G, Ponzoni M, Ciceri F, Bordignon C, Greenberg PD, Holmes MC, Gregory PD, Naldini L, Bonini C. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med* 2012; 18:807-15.
86. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res* 2016.
87. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 1993; 177:265-72.
88. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348:124-8.

89. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011; 29:917-24.
90. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:4538-42.
91. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313:1485-92.
92. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319:1676-80.
93. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:299-308.
94. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:573-87.
95. Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, Matsushima K. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 2008; 111:5457-66.
96. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, Haliburton GE, Ye CJ, Bluestone JA, Doudna JA, Marson A. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:10437-42.

97. Shao H, Zhang W, Hu Q, Wu F, Shen H, Huang S. TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Biol Rep* 2010; 37:3951-6.
98. Siddiqui I, Erreni M, van Brakel M, Debets R, Allavena P. Enhanced recruitment of genetically modified CX3CR1-positive human T cells into Fractalkine/CX3CL1 expressing tumors: importance of the chemokine gradient. *J Immunother Cancer* 2016; 4:21.
99. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-92.
100. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006; 90:1-50.
101. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005; 105:4247-54.
102. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-6.
103. Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, Zhou J, Yu L, Zhang L, Chen F, Sha H, Cheng L, Meng F, Zou Z, Huang X, Liu B. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6:20070.
104. Tang H, Wang Y, Chlewicki LK, Zhang Y, Guo J, Liang W, Wang J, Wang X, Fu YX. Facilitating T cell infiltration in tumor microenvironment overcomes resistance to PD-L1 blockade. *Cancer Cell* 2016; 29:285-96.
105. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 2006; 66:3381-5.

106. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443-54.

107. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515:568-71.

108. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, Hawkins R, Chaney C, Cherian S, Chen X, Soma L, Wood B, Li D, Heimfeld S, Riddell SR, Maloney DG. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med* 2016; 8:355ra116.

109. Wang X, Chang WC, Wong CW, Colcher D, Sherman M, Ostberg JR, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 2011; 118:1255-63.

110. Weber JS, O'Day S, Urba W, Powderly J, Nichol G, Yellin M, Snively J, Hersh E. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:5950-6.

111. Wiedemann GM, Knott MM, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, Kuhnemuth B, Layritz P, Thaler R, Kruger S, Ormanns S, Mayr D, Endres S, Anz D. Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1175794.

112. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369:122-33.

113. Yan M, Jene N, Byrne D, Millar EK, O'Toole SA, McNeil CM, Bates GJ, Harris AL, Banham AH, Sutherland RL, Fox SB. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res* 2011; 13:R47.

114. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet Moreno B, Mezzadra R, Chmielowski B, Ruchalski K, Shintaku IP, Sanchez PJ, Puig-Saus C, Cherry G, Seja E, Kong X, Pang J, Berent-Maoz B, Comin-Anduix B, Graeber TG, Tumei PC, Schumacher TN, Lo RS, Ribas A. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2016; 375:819-29.

115. Zehn D, Bevan MJ. T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 2006; 25:261-70.

6. Der kumulativen Dissertation zugrunde liegende Publikationen

6.1 Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy

Kobold S*, **Grassmann S***, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Duwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S*, Rothenfusser S*

(*contributed equally)

J Natl Cancer Inst 2015; 107 (8)

DOI: 10.1093/jnci/djv146

<https://doi.org/10.1093/jnci/djv146>

6.2 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

Rapp M*, **Grassmann S***, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D*, Kobold S*

(*contributed equally)

Oncoimmunology 2016; 5:e1105428

DOI: 10.1080/2162402X.2015.1105428

<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1105428>

7. Publikationsliste

1. **RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8(+) T cells**

Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, Stieg MR, **Grassmann S**, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M

Cell Death Differ 2014; 21:1825-37

2. **Selective bispecific T cell recruiting antibody enhances anti-tumor activity of adoptive T cell transfer**

Kobold S, Steffen J, Chaloupka M, **Grassmann S**, Henkel J, Castoldi R, Zeng Y, Chmielewski M, Schmollinger JC, Schnurr M, Rothenfusser S, Schendel DJ, Abken H, Sustmann C, Niederfellner G, Klein C, Bourquin C, Endres S

J Natl Cancer Inst 2015; 107 (1)

3. **Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy**

Kobold S*, **Grassmann S***, Chaloupka M, Lampert C, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Duwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S*, Rothenfusser S*
(*contributed equally)

J Natl Cancer Inst 2015; 107 (8)

4. **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**

Rapp M*, **Grassmann S***, Chaloupka M, Layritz P, Kruger S, Ormanns S, Rataj F, Janssen KP, Endres S, Anz D*, Kobold S*
(*contributed equally)

Oncoimmunology 2016; 5:e1105428

8. Danksagung

Ich möchte mich bei den folgenden Personen bedanken:

Prof. Dr. Stefan Endres und PD Dr. Sebastian Kobold für die Betreuung und Unterstützung während meiner Dissertation.

Dr. Moritz Rapp für die enge Zusammenarbeit, Freundschaft und die wissenschaftliche und methodische Unterstützung.

Michael Chaloupka für die enge Zusammenarbeit und Freundschaft.

Dr. Peter Düwell, Prof. Dr. Maximilian Schnurr und Dr. Gabriela Wiedemann für wissenschaftliche Diskussionen und Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors.

Allen Ko-Autoren unserer Publikationen für deren Beiträge zu unseren Projekten.

Meinen Eltern, die mich immer unterstützen und mir die Freiheit gaben, meine Ziele zu verfolgen.

Eidesstattliche Versicherung

Graßmann, Simon Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Proof-of-Concept-Studien zu PD-1-CD28-Fusionsrezeptoren und C-C-Motiv-Chemokinrezeptor Typ 4 (CCR4) zur Verbesserung der Effizienz des adoptiven T-Zell-Transfers in einem murinen Pankreaskarzinommodell

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

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

München 30.7.2017

Ort, Datum

Simon Graßmann

Unterschrift Doktorandin/Doktorand