

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

## **Kombination von adoptivem Transfer**

# **Marker-Protein-transduzierter T-Zellen mit einem anti-EGFR Variante 3 x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper zur Behandlung muriner Tumormodelle**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christopher Lampert

aus Schwetzingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat  
PD Dr. med. Tobias Herold

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Sebastian Kobold  
Dr. rer. nat. Jan C. Schmollinger

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2019

Meiner Familie und Catharina

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Christopher Lampert, an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Kombination von adoptivem Transfer Marker-Protein-transduzierter T-Zellen  
mit einem anti-EGFR Variante 3 x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper zur  
Behandlung muriner Tumormodelle**

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 22. Mai 2019

.....  
Christopher Lampert

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Antikörpertherapien</b> .....	<b>1</b>
1.2.1 Aufbau von Antikörpern .....	1
1.2.2 Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie .....	2
1.2.3 Bispezifische Antikörper .....	3
1.2.3.1 Trifunktionale bispezifische Antikörper .....	4
1.2.3.2 <i>Bispecific T-cell-engager</i> .....	5
1.2.3.3 Limitationen bispezifischer Antikörper .....	6
<b>1.3 T-Zell-Therapie</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Adoptiver T-Zell-Transfer .....	7
1.3.2 Gentechnisch veränderte T-Zellen .....	8
<b>1.4 Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Geräte .....	12
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	12
2.1.3 Materialien für die Zellkultur .....	14
2.1.4 Zelllinien .....	16
2.1.5 Kits .....	16
2.1.6 FACS-Antikörper .....	16
2.1.7 Software .....	17
<b>2.2 Tierversuche</b> .....	<b>18</b>
2.2.1 Mäuse .....	18
2.2.2 Isolation von Milz-Zellen .....	18
2.2.3 <i>In vivo</i> Therapieveruche .....	18
<b>2.3. Zellkultur</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	19
2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität .....	19
2.3.3 Kultivierung von Tumorzelllinien .....	19
2.3.4 Kultivierung von primären T-Zellen .....	20

<b>2.4 Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.4.1 Entwicklung eines anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers.....	20
2.4.2 Retrovirale Transduktion .....	21
2.4.2.1 Transduktion primärer T-Zellen.....	21
2.4.2.2 Transduktion von Tumorzelllinien .....	22
2.4.3 Durchflusszytometrie.....	22
2.4.4 Adhäsions-Assay .....	23
2.4.5 Zytotoxizitäts-Assay .....	23
2.4.6 Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assay .....	24
<b>2.5 Statistische Analyse</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Expression der Zielantigene</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 Generierung von mEpCAM exprimierenden Tumorzelllinien .....	25
3.1.2 Expression des Zielantigens EGFRvIII auf T-Zellen .....	26
<b>3.2 T-Zell-Retention an mEpCAM-positiven Tumorzellen durch den anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Einfluss des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers auf die Tumorzelllyse <i>in vitro</i></b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer und einem bispezifischen Antikörper im murinen Melanommodell B16-OVA</b> .....	<b>30</b>
3.4.1 Einfluss der Kombination von transduzierten, EGFRvIII <sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper auf das B16-OVA-Tumorstadium.....	31
3.4.2 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Therapie mit dem anti-EGFRvIII x anti mEpCAM bispezifischen Antikörper	32
3.4.3 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie im B16-OVA-Tumormodell nach 5 Gray Ganzkörperbestrahlung .....	33
<b>3.5 <i>In vivo</i> Testung der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer und dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper im Panc-OVA-Tumormodell</b> .....	<b>35</b>

---

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Zytotoxische Aktivität des anti-EGFRvIII x anti-mEPCAM bispezifischen Antikörpers <i>in vitro</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Adoptiver Transfer tumorspezifischer T-Zellen im B16-Tumormodell .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie in soliden Tumormodellen .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Anti-EpCAM gerichtete Antikörpertherapie bei soliden Tumoren.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 ADCC als möglicher Wirkmechanismus des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers .....</b>	<b>42</b>
<b>4.7 EpCAM als Zielantigen in der Immuntherapie .....</b>	<b>43</b>
<b>4.8 Ausblick .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>67</b>
<b>9. Veröffentlichungen .....</b>	<b>68</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

In frühen Stadien diagnostiziert, können Krebserkrankungen durch lokale Behandlung, insbesondere durch chirurgische Resektion, geheilt werden. In fortgeschrittenen, metastasierten Stadien kommen systemische Therapien zum Einsatz, allerdings in vielen Fällen nur noch in palliativer Intention. Die Immuntherapie stellt einen vielversprechenden Therapieansatz als Ergänzung zu den etablierten Krebstherapien – Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie – dar.

Durch die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Rituximab zur Therapie von B-Zell Lymphomen im Jahr 1997 (Cheson und Leonard 2008) etablierte sich die Immuntherapie als neuer Therapieansatz von Tumorerkrankungen.

2010 wurde eine Phase-III-Studie publiziert, die eine Verlängerung des Überlebens beim metastasierten malignen Melanom durch Ipilimumab nachwies (Hodi et al. 2010). Ipilimumab ist ein gegen das *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) gerichteter monoklonaler Antikörper, der im Gegensatz zu den davor eingesetzten Antikörpern nicht mehr auf die Tumorzellen, sondern auf die T-Zellen abzielt. Dies bedeutete einen Paradigmenwechsel in der Tumorbehandlung: Statt direkt den Tumor zu bekämpfen, hat die Immuntherapie das Ziel, das eigene Immunsystem zu stimulieren, damit es den Tumor bekämpft. Die Studie von Hodi et al. und die in den Folgejahren veröffentlichten Studien belegen, dass durch die Aktivierung von T-Zellen Tumorwachstum kontrolliert werden kann. Dies etablierte T-Zellen als Angriffspunkt neuer Tumortherapien.

### 1.2 Antikörpertherapien

#### 1.2.1 Aufbau von Antikörpern

Antikörper sind Teil des körpereigenen, adaptiven Immunsystems. Sie werden nach Stimulation von differenzierten B-Zellen, sogenannten Plasmazellen, gebildet und sind spezifisch für ein bestimmtes Antigen.

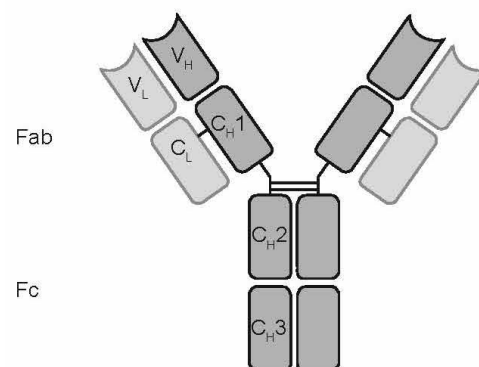
Antikörper sind Y-förmige Moleküle, die aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten bestehen. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede schwere Kette ist mit einer leichten Kette durch eine weitere Disulfidbrücke verbunden. Die beiden leichten und schweren Ketten eines Antikörpers sind identisch, sodass ein Antikörper zwei identische Antigenbindungsstellen besitzt



(Abbildung 1). Aufgrund der schweren Ketten werden fünf verschiedene Antikörperklassen (Isotyp) unterschieden (IgG, IgM, IgA, IgE und IgD).

Während die Aminotermini der schweren und leichten Kette zwischen verschiedenen Antikörpern variieren, bleiben die restlichen Abschnitte zwischen den Antikörpern eines Isotyps konstant. Die Aminotermini der leichten und schweren Kette ( $V_H$  und  $V_L$ ) bilden die variable Region und sind für die Antigenbindung erforderlich. Die konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten ( $C_H$  und  $C_L$ ) bilden die konstante Region.

Funktionell lassen sich bei Antikörpern ein Fab-Fragment (*fragment antigen binding*), welches für Antigenbindung zuständig ist, und ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) unterscheiden. Das Fc-Fragment ist der Teil des Antikörpers, der durch Interaktion mit Zellen und Molekülen die Effektorfunktionen vermittelt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Antikörpers modifiziert nach Murphy und Janeway 2012.**

### 1.2.2 Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie

1975 publizierten Köhler und Milstein eine Methode zur effizienten Herstellung monoklonaler Antikörper (Kohler und Milstein 1975). Damit legten sie den Grundstein für die Entwicklung neuer Therapien. Rituximab wurde 1997 als erster monoklonaler Antikörper zur Behandlung des B-Zell Lymphoms zugelassen (Cheson und Leonard 2008; McLaughlin et al. 1998). Heutzutage stellen monoklonale Antikörper eine etablierte Behandlungsform in der Tumorthherapie dar.

Die zur Tumorthherapie zugelassenen Antikörper sind meist gegen ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) gerichtet. Monoklonale Antikörper vermitteln ihre Wirkung vor allem durch Blockade von Signalwegen des Tumors, antikörperabhängige

zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) und komplementvermittelte Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, CDC) (Hudis 2007; Scott et al. 2012; Van Cutsem et al. 2009; Weiner 2010). Inzwischen wurden auch Antikörper zugelassen, die einen immunmodulatorischen Effekt auf T-Zellen haben (Hodi et al. 2010).

Klassische, Tumor-gerichtete Antikörper werden in der Regel gut vertragen und führen insbesondere bei hämatologischen Neoplasien zu Remissionen. Als Monotherapie haben Antikörper allerdings nur einen begrenzten Stellenwert und auch in Kombination mit Chemotherapie profitiert nur ein Teil der Patienten von diesen Therapien. Gründe für ein mangelndes Therapie-Ansprechen sind unter anderem die schlechte Penetration der Antikörper in das Tumorgewebe, Einflüsse des Tumormikromilieus, eine eingeschränkte Wechselwirkung mit Effektorzellen durch geringe Affinität des Fc-Rezeptors, eine Aktivierung inhibitorischer Rezeptoren (FcγRIIb) oder die Konkurrenz mit zirkulierenden IgG (Chames et al. 2009). Durch die Entwicklung bispezifischer Antikörper, die zwei Antigene gleichzeitig binden, könnten einige Limitationen der monoklonalen Antikörper aufgehoben werden.

### **1.2.3 Bispezifische Antikörper**

Bispezifische Antikörper (BiAk) können zwei verschiedene Antigene, die auf unterschiedlichen – oder auf denselben – Zellen exprimiert werden, erkennen und gleichzeitig binden (Muller und Kontermann 2007). Ein durch die BiAk häufig verfolgter Therapieansatz ist die Rekrutierung von T-Zellen zum Tumor (Chames und Baty 2009). Indem sie mit einem Arm gegen ein TAA und mit dem anderen gegen ein T-Zell-Marker gerichtet sind, können BiAk T-Zellen und Tumorzellen in eine räumliche Nähe bringen. T-Zellen gelten aufgrund ihrer ausgeprägten zytotoxischen Aktivität als die wichtigsten Effektorzellen des Immunsystems. Da T-Zellen keinen Fc-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie nicht durch konventionelle, monoklonale Antikörper rekrutiert werden. Die meisten BiAk richten sich gegen CD3 als T-Zell-Marker. Neben den T-Zell-rekrutierenden BiAk wurden auch Konstrukte entwickelt, die andere Effektorzellen des Immunsystems, wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) über CD16 oder Monozyten über CD64 zum Tumor rekrutieren (Curnow 1997; Hartmann et al. 2001; Hartmann et al. 1997; Pullarkat et al. 1999; Repp et al. 2003).

### 1.2.3.1 Trifunktionale bispezifische Antikörper

Die ersten BiAk entstanden durch Fusion von zwei Hybridomen (Clark et al. 1988). Die durch die Hybrid-Hybridom-Technik entstandenen bispezifischen Antikörper behalten die Struktur eines traditionellen Antikörpers bei, mit dem Unterschied, dass die beiden Fab-Fragmente gegen zwei verschiedene Antigene gerichtet sind (Abbildung 2A) (Milstein und Cuello 1983). Die schweren und leichten Ketten stammen von zwei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern. Die beiden schweren Ketten bilden ein Fc-Fragment und stellen damit eine dritte Bindungsstelle dar. Aufgrund der drei unterschiedlichen Bindungsstellen werden sie als trifunktionale Antikörper bezeichnet. Durch Fusion eines Maus IgG2a und eines Ratten IgG2b entstanden die sogenannten Triomabs (Chelius et al. 2010; Lindhofer et al. 1995). Interessanterweise bindet der Hybrid-Maus-Ratte-Fc-Teil spezifisch an aktivierende Fcγ-Rezeptoren (FcγRI und FcγRIII) und interagiert nicht mit inhibitorischen Fc-Rezeptoren (FcγRIIb) (Zeidler et al. 2000; Zeidler et al. 1999).

Durch das Fc-Fragment können diese Art der BiAk neben den T-Zellen auch Fcγ-Rezeptor-positive, akzessorische Effektorzellen, wie Makrophagen, NK-Zellen und dendritische Zellen (DC) an den Tumor binden und aktivieren (Zeidler et al. 1999). Die Aktivierung der akzessorischen Immunzellen führt zu einer gesteigerten Tumorzelllyse und zusätzlich durch Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und DCs, zur Kostimulation der T-Zellen. Diese kostimulatorischen Moleküle werden normalerweise nicht durch den Tumor exprimiert bzw. freigesetzt (Zeidler et al. 1999). Ohne die kostimulatorischen Signale würde es nach CD3-Aktivierung zu keiner ausreichenden Immunantwort der T-Zellen kommen (Boise et al. 1995; Daniel et al. 1998).

Catumaxomab bindet mit einem Arm über das *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) an die Tumorzelle und mit dem anderen Arm an das CD3 der T-Zelle (Ruf und Lindhofer 2001). In klinischen Studien zeigte Catumaxomab nach intraperitonealer Injektion bei Patienten mit malignem Aszites eine gute Wirksamkeit (Burgess et al. 2007; Heiss et al. 2010). Im April 2009 wurde Catumaxomab als erster bispezifischer Antikörper für die klinische Anwendung zugelassen (Seimetz et al. 2010).

Für eine effektive Therapie solider Tumorerkrankungen ist eine systemische Gabe erforderlich. Die intravenöse Gabe von Catumaxomab wurde in einer Phase-I-Studie zur Therapie von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht.

Hierbei kam es zu schweren, Dosis-limitierenden Nebenwirkungen (Sebastian et al. 2007). Eine weitere klinische Studie musste aufgrund des Auftretens von akutem Leberversagen abgebrochen werden (Mau-Sorensen et al. 2015). Die starken Nebenwirkungen werden auf den Wirkmechanismus von Catumaxomab zurückgeführt. Durch die Vernetzung der T-Zellen mit den akzessorischen Immunzellen kommt es zu einer tumorunabhängigen, unspezifischen T-Zell-Aktivierung, die zu einer starken Zytokinausschüttung führt und für die Nebenwirkungen verantwortlich ist (Eissler et al. 2013; Sebastian et al. 2007).

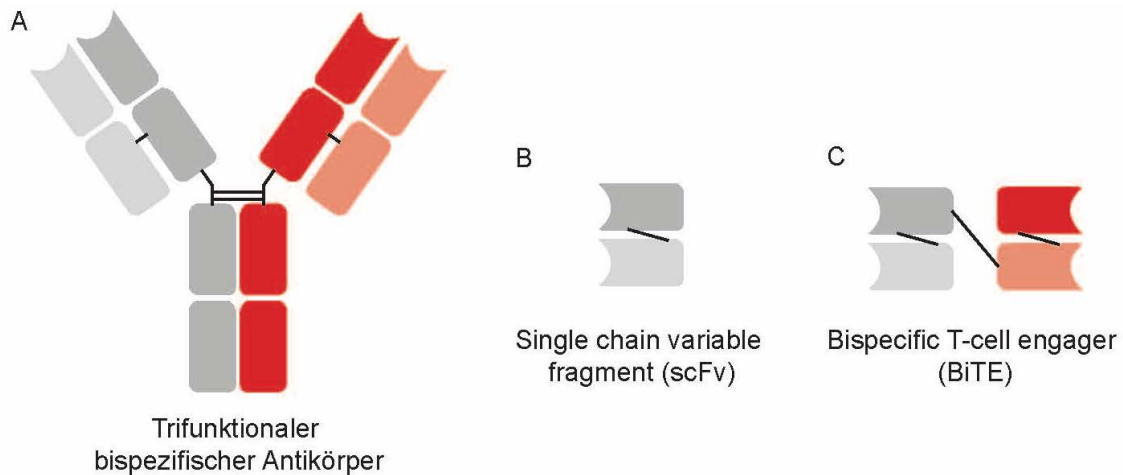
### 1.2.3.2 *Bispecific T-cell-engager*

Ein den bispezifischen Antikörpern ähnliches Format stellen die *bispecific T-cell engager* (BiTE) dar. Die BiTE bestehen aus zwei Einzelketten-Fragmenten (*single-chain variable fragment*, scFv) von verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die durch einen Linker zu einer Polypeptidkette verbunden werden (Abbildung 2C). Die Antigen-erkennenden variablen Domänen (Fv) der leichten und schweren Ketten eines konventionellen, monoklonalen Antikörpers werden über einen weiteren Linker verbunden und bilden das scFv-Fragment (Bird und Walker 1991) (Abbildung 2B). Wie die bispezifischen Antikörper binden auch die BiTE mit einer variablen Domäne an ein TAA und mit der anderen an das CD3 der T-Zellen. Dadurch können auch BiTE T-Zellen und Tumorzellen miteinander vernetzen. Durch ihren Aufbau besitzen sie kein Fc-Fragment, mit dem sie zusätzlich akzessorische Immunzellen aktivieren können, jedoch können sie durch deren geringe Größe besser in das Gewebe eindringen.

Im Gegensatz zu den meisten bisher beschriebenen BiAk zeigte dieses Format *in vitro* schon bei sehr geringen Antikörperkonzentrationen und niedrigen Effektor- zu Zielzell (E:Z)-Verhältnissen eine sehr hohe zytotoxische Aktivität (Dreier et al. 2002; Loffler et al. 2000; Mack et al. 1995). Die starke anti-tumorale Wirksamkeit bei niedrigen E:Z-Verhältnissen legt nahe, dass BiTE die Lyse mehrerer Zielzellen nacheinander vermitteln (Hoffmann et al. 2005). BiTE binden mit einer vergleichsweise niedrigen Affinität an ihre Zielantigene (Dreier et al. 2002). Die alleinige Bindung des BiTE an CD3 führt nicht zu einer Aktivierung der T-Zelle (Brischwein et al. 2007). Erst wenn die T-Zellen durch den BiTE an ihre Zielzelle gekoppelt werden, kommt es zu einer Aktivierung. Durch diesen Mechanismus wird eine unkontrollierte Aktivierung der T-Zellen verhindert. Die Zielzellen werden MHC-unabhängig und ohne weitere kostimulatorische Signale lysiert (Dreier et al. 2003; Offner et al. 2006). Auch in

präklinischen Modellen konnten BiTE eine gute therapeutische Wirksamkeit zeigen (Dreier et al. 2003; Schlereth et al. 2005).

Blinatumomab, ein BiTE, der spezifisch für CD3 und CD19 ist, führte in klinischen Studien bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und *minimal residual disease* (MRD) zur Remission (Topp et al. 2011). 2014 wurde Blinatumomab zur Therapie der ALL zugelassen.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus bispezifischer Antikörper, modifiziert nach Murphy und Janeway 2012.**

### 1.2.3.3 Limitationen bispezifischer Antikörper

Sowohl die Therapie mit trifunktionalen Antikörpern als auch die Therapie mit BiTE sind zum Teil mit schwerwiegenden Nebenwirkungen vergesellschaftet. Die meisten Patienten, die mit Blinatumomab (81 %) bzw. mit Catumaxomab (58 %) behandelt wurden, erlitten unerwünschte Ereignisse der Stufen Grad 3 bzw. 4 (Seimetz et al. 2010; Topp et al. 2011). Die häufigsten Nebenwirkungen waren Lymphopenie, Fieber, Schüttelfrost, Abfall der Immunglobulin-Konzentration im Plasma und Hypokaliämie. Außerdem traten zentralnervöse Nebenwirkungen, wie beispielsweise Desorientierung, Verwirrtheit, Sprachstörungen und Krämpfe auf (Bargou et al. 2008; Seimetz et al. 2010; Topp et al. 2011). Die Nebenwirkungen sind am ehesten auf eine starke Zytokinfreisetzung durch eine polyklonale T-Zell-Aktivierung zurückzuführen (Baeuerle und Reinhardt 2009; Seimetz et al. 2010). Zudem ist trotz der guten Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern bei hämatologischen Grunderkrankungen ihre Wirksamkeit bei soliden Tumorerkrankungen eingeschränkt.

### 1.3 T-Zell-Therapie

#### 1.3.1 Adoptiver T-Zell-Transfer

CD8-positive, zytotoxische T-Zellen sind potente Effektorzellen der adaptiven Immunantwort gegen Tumorzellen (Boon et al. 2006; Rosenberg 2001). Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor (TZR), der hochspezifisch für ein bestimmtes Antigen ist. Man spricht von tumorspezifischen T-Zellen, wenn der TZR gegen ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) gerichtet ist.

Beim adoptiven T-Zell-Transfer (AZT) werden autologe, tumorspezifische T-Zellen *ex vivo* expandiert und stimuliert (Dudley und Rosenberg 2003; Gattinoni et al. 2006; Yee et al. 2002). Für die T-Zell-Therapie werden unter anderem Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) verwendet (June 2007). TIL werden aus chirurgisch entferntem Tumorgewebe isoliert und durch Zugabe von Interleukin-2 (IL-2) expandiert (Restifo et al. 2012). Alternativ werden zytotoxische T-Zellen, die aus dem peripheren Blut oder tumordrainierenden Lymphknoten gewonnen werden, verwendet (June 2007). Der adoptive Transfer von tumorspezifischen T-Zellen zeigte in Tierversuchen vielversprechende Ergebnisse (Alexander und Rosenberg 1990). Allerdings konnte die T-Zell-Therapie in klinischen Studien bei immunkompetenten Patienten nur geringe Erfolge erzielen (Dreno et al. 2002; Dudley et al. 2001; Figlin et al. 1999; Rosenberg et al. 1994). Von einer Behandlung mit TIL in Kombination mit einer IL-2 Gabe beim metastasierten Melanom profitierten nur wenige Patienten langfristig (Dudley et al. 2001; Rosenberg et al. 1994).

Die Wirksamkeit des AZT ist aufgrund der geringen Infiltration der T-Zellen in das Tumorgewebe und der fehlenden Aktivierung der T-Zellen im Tumor begrenzt. Die fehlende T-Zell-Aktivierung kann durch eine Herabregulation des MHC-I-Komplexes oder durch das immunsuppressive Milieu im Bereich des Tumors bedingt sein (Restifo et al. 1996; Schreiber et al. 2011). Außerdem werden die T-Zellen durch immunsuppressive Faktoren wie das *programmed cell death protein 1* (PD-1), das *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) sowie durch immunsuppressive Zellen wie *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) oder regulatorische T-Zellen (Treg) gehemmt (Ahmadzadeh et al. 2009; Baitsch et al. 2011).

In präklinischen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung oder myeloablative Chemotherapie im Sinne einer immunsuppressiven Konditionierung die anti-tumorale Wirksamkeit der transferierten T-Zellen verbessert (Cheever et al.

1980; Dudley et al. 2002). Der adoptive Transfer von TIL in Kombination mit IL-2 – nach einer immunsuppressiven Konditionierung – führte bei der Mehrzahl der Patienten mit fortgeschrittenem Melanom zu einem Ansprechen der Therapie (Dudley et al. 2008; Rosenberg et al. 2011). In weiteren klinischen Studien bei Patienten mit malignem Melanom konnten Ansprechraten um 50 % bestätigt werden (Besser et al. 2010; Itzhaki et al. 2011).

Eine immunsuppressive Vorbehandlung verbessert die anti-tumorale Wirksamkeit des AZT durch die Elimination von immunsuppressiven Zellpopulationen. Zusätzlich wird dadurch die Funktionalität der APC verbessert (Gattinoni et al. 2006).

Dennoch konnte die TIL-Therapie bisher nur beim malignen Melanom eine gute Wirksamkeit zeigen, da nur bei dieser Tumorentität eine ausreichende Menge an TIL isoliert werden kann (Restifo et al. 2012). Prinzipiell können T-Zellen jede Art von Tumorzellen lysieren, sofern sie ein Antigen auf der Zelloberfläche der Tumorzelle erkennen (Porter et al. 2011; Robbins et al. 2011).

### 1.3.2 Gentechnisch veränderte T-Zellen

Durch gentechnische Veränderung können T-Zellen einen TZR oder einen *chimeric antigen receptor* (CAR) exprimieren, die ein bestimmtes Antigen auf der Tumorzelle erkennen und T-Zell-Aktivierung vermitteln (Morgan et al. 2006; Porter et al. 2011; Robbins et al. 2011). Dadurch wird das Spektrum von Tumorentitäten, die für eine T-Zell-Therapie zugänglich sind, erweitert (Brentjens et al. 2011; Kochenderfer und Rosenberg 2011; Porter et al. 2011; Robbins et al. 2011). Die tumorspezifischen TZR bzw. CAR werden in der Regel mittels viraler Transduktion in die T-Zellen hineingeschleust.

CAR entstehen durch Fusion einer Antigenbindungsstelle mit der intrazellulären Domäne eines TZR und sind dadurch in der Lage, nach Bindung an das Antigen die T-Zelle zu aktivieren (Kalos und June 2013). Ein CAR besitzt eine den Antikörpern ähnliche Spezifität (Restifo et al. 2012). Dadurch können CAR, im Gegensatz zu den TZR, Antigene auf der Zelloberfläche der Zielzellen erkennen, die nicht über den MHC-Komplex präsentiert werden (Morgan et al. 2010; Sadelain et al. 2009). Therapien mit CAR-T-Zellen werden deshalb nicht durch die Herabregulation des MHC-Komplexes, einem bei vielen Tumorarten vorkommendem *tumor-escape*-Mechanismus, beeinflusst (Vitale et al. 2005).

Die Mehrzahl klinischer Studien mit CAR wird derzeit bei B-Zell-Neoplasien durchgeführt. Das Zielantigen der CAR ist hierbei CD19. Da CD19 ausschließlich von reifen B-Zellen und nicht von anderen blutbildenden Zellreihen exprimiert wird, stellt es ein geeignetes Zielantigen in der Immuntherapie von B-Zell-Neoplasien dar (Holzinger et al. 2016). In klinischen Studien zeigte die T-Zell-Therapie mit CAR sehr gute Ansprechraten (Brentjens et al. 2011; Kochenderfer et al. 2015; Robbins et al. 2011). Bei Patienten mit therapierefraktärer oder rezidivierender ALL konnte durch eine T-Zell-Therapie mit CAR bei bis zu 90 % der Patienten eine komplette Remission erreicht werden (Maude et al. 2014). Seit 2017 ist die erste anti-CD19-CAR-T-Zell-Therapie in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (Mullard 2017).

Die Therapie von soliden Tumoren mit CAR gestaltet sich jedoch schwieriger, da die meisten TAA, anders als CD19, auch von gesunden Geweben exprimiert werden. Zusätzlich muss bei der Therapie solider Tumoren die Infiltration der T-Zellen in den Tumor, das immunsuppressive Milieu um den Tumor sowie die Rekrutierung immunsuppressiver Zellen berücksichtigt werden (Holzinger et al. 2016). Phase-I-Studien evaluieren derzeit die Sicherheit und Machbarkeit der Therapie mit CAR bei soliden Tumoren.

Obwohl der adoptive Transfer von CAR T-Zellen bei der Therapie von Leukämien und Lymphomen zu sehr guten Ansprechraten geführt hat, ist diese Therapie häufig mit schweren Nebenwirkungen vergesellschaftet. Die meisten Nebenwirkungen entstehen, weil die genetisch veränderten T-Zellen außerhalb des Tumorgewebes an ihr Antigen binden und ihre Effektorfunktionen ausüben (*on-target toxicity*) (Brentjens et al. 2010; Lamers et al. 2006; Morgan et al. 2010). Dies resultiert in Gewebeerstörung und einer starken Zytokinfreisetzung (Zytokinsturm).

Die Ergebnisse der klinischen Studien machen deutlich, dass weiterhin an der Optimierung des AZT geforscht werden muss. Ein interessanter Ansatz hierbei ist die Kombinationstherapie mit einem bispezifischen Antikörper (Buhmann et al. 2009).

#### **1.4 Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit**

Ein Ansatz zur Optimierung des AZT ist die Kombination mit einem T-Zell-rekrutierenden BiAk. Allerdings führte die Kombinationstherapie wegen der T-Zell-Aktivierung zu einer massiven Zytokinfreisetzung (Riechelmann et al. 2007). Daher hat unsere Arbeitsgruppe ein neueartiges Kombinationskonzept entwickelt, bei



dem der AZT mit einem BiAk kombiniert wird, der spezifisch die transferierten, tumorspezifischen T-Zellen an den Tumor rekrutiert ohne eine systemische T-Zell-Aktivierung zu verursachen (Kobold et al. 2015).

Für diese Kombinationstherapie wird ein inaktives Marker-Antigen in tumorspezifische T-Zellen transduziert. Dieses Antigen dient als Bindestelle für den einen Arm des BiAk. Als Zielantigen wurde in dieser Arbeit eine trunkierte Version des humanen *epidermal growth factor receptor* Variante 3 (EGFRvIII) verwendet. Hintergrund ist, dass EGFRvIII eine tumorspezifische Variante des EGFR darstellt, die ausschließlich in bestimmten Tumorzellen, wie zum Beispiel Glioblastomzellen zu finden ist (Gan et al. 2013). Daher kann dieser Arm des BiAk nur an die transduzierten T-Zellen oder an die Tumorzelle binden. Die Bindung des BiAk an EGFRvIII löst zudem keine intrazelluläre Signalkaskade in den T-Zellen aus. Im Gegensatz zu den bisherigen anti-CD3-BiAk kann eine T-Zell-Aktivierung nur durch Interaktion zwischen dem TZR und der Tumorzelle stattfinden. Dadurch soll eine Aktivierung außerhalb des Tumors verhindert und systemische Nebenwirkungen reduziert werden. Indem der in dieser Arbeit verwendete BiAk neben den T-Zellen auch an das TAA EpCAM bindet, rekrutiert er die transferierten, tumorspezifischen T-Zellen an den Tumor, wo sie spezifisch ihre Zielzellen lysieren.

Mit der Kombinationstherapie werden vor allem zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollen sich die zytotoxischen Effekte durch die spezifische Rekrutierung von T-Zellen an den Tumor potenzieren. Zum anderen sollen die Nebenwirkungen durch Verhinderung einer systemischen T-Zell-Aktivierung reduziert werden.

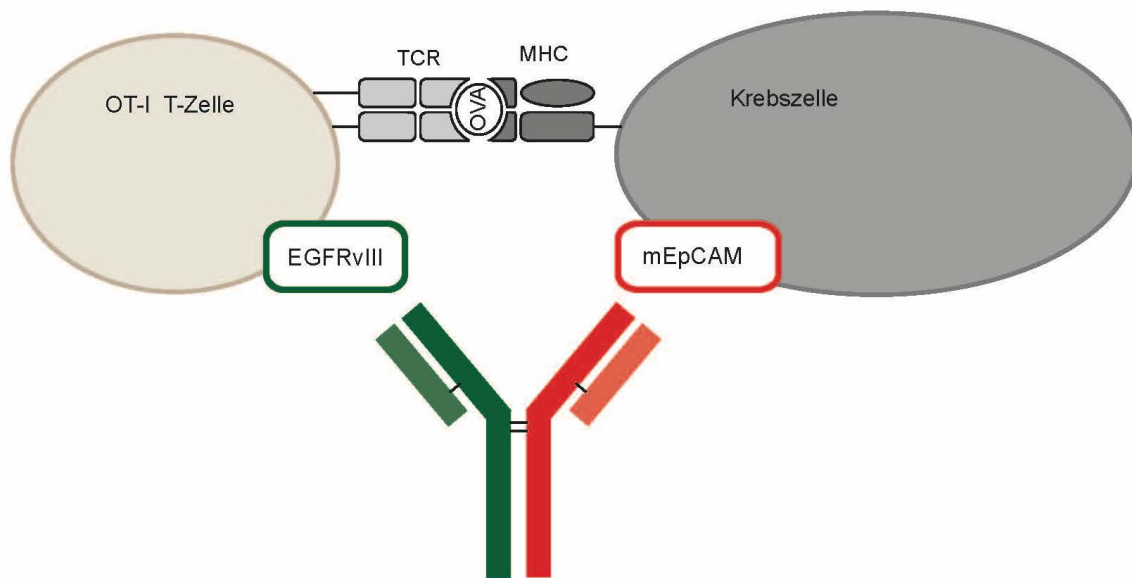
Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass eine Kombinationstherapie aus AZT tumorspezifischer T-Zellen und einem BiAk bei Mäusen, die ein murines Adenokarzinom des Magens entwickeln, zu einem verzögerten Tumorwachstum und einem verlängerten Überleben führt (Kobold et al. 2015).

Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung des Therapiekonzeptes durch die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- 1) Kann der anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifische Antikörper T-Zellen an Tumorzellen rekrutieren?
- 2) Hat die Kombination aus tumorspezifischen T-Zellen mit dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper einen additiven Effekt auf die Tumorzelllyse *in vitro*?

- 3) Ist die therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer und einem T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörper im murinen Melanommodell B16-OVA und im murinen Pankreaskarzinommodell Panc-OVA darstellbar?
- 4) Kann die Wirksamkeit der Kombinationstherapie durch eine immunsuppressive Vorbehandlung verbessert werden?

Der für die vorliegende Arbeit verwendete BiAk bindet mit einem Arm das mEpCAM der Tumorzellen und mit dem anderen den EGFRvIII, welcher als inaktives Marker-Antigen in die T-Zellen transduziert wurde (Abbildung 3). Für den AZT wurden CD8-positive T-Zellen aus transgenen OT-I Mäusen verwendet. Die OT-I T-Zellen exprimieren einen TZR, der spezifisch für das SIINFEKL-Epitop des von den Tumorzellen präsentierten Modellantigens Ovalbumins ist (Hogquist et al. 2012). Durch die Interaktion des TZR mit SIINFEKL kommt es zur Aktivierung der T-Zelle.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Therapiekonzeptes modifiziert nach Kobold et al. 2015.** Der BiAk bindet an das EGFRvIII der transduzierten T-Zelle und an das mEpCAM der Tumorzelle. Der TZR der T-Zelle ist spezifisch für das SIINFEKL-Epitop des Ovalbumins, welches im Kontext des MHC-I-Komplexes von der Tumorzelle präsentiert wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte**

Geräte	Firma
CO <sub>2</sub> Inkubator (BD6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACSCanto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C, -20 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Mithras LB940 ELISA Reader	Bertold, Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
RTCA iCELLigence	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Waage CPA 1003S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

**Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien und Reagenzien	Firma
Aceton	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calcein AM	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Ethanol 100 %	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences, New Jersey, USA
Isofluran	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol (70 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 %	Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Retronectin	Takara, Kusatsu, Japan
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 3: Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Erylyse	10 ml BD PharmLyse (10x) 90 ml PBS
Calcium Chlorid-Puffer	3,675 g CaCl <sub>2</sub> ad 10 ml ddH <sub>2</sub> O
Transfektionspuffer	1,6 g NaCl 74 mg KCl 50 mg NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g HEPES ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O und pH 6,76

### 2.1.3 Materialien für die Zellkultur

**Tabelle 4: Materialien für die Zellkultur**

Materialien	Firma
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	PAA, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco Products, Grand Island NY, USA
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, Österreich
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA, 100x)	Gibco Products, Grand Island NY, USA
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI ohne Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Very Low Endotoxine (VLE) RPMI	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

**Tabelle 5: Medien für die Zellkultur**

Zellkultur-Medien	Zusammensetzung
DMEM-Vollmedium	500 ml DMEM High Glucose 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 1 % MEM-NEAA 100 IU/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
RPMI-Vollmedium	500 ml RPMI 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 1 % MEM-NEAA 100 IU/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 1 mM Natrium-Pyruvat

Zellkultur-Medien	Zusammensetzung	
T-Zell-Medium	500 ml	VLE-RPMI
	10 %	FBS
	2 mM	L-Glutamin
	1 %	MEM-NEAA
	100 IU/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	50 µM	β-Mercaptoethanol
Zytotox-Medium	1 mM	HEPES
	500 ml	RPMI ohne Phenolrot
	1 %	FBS
	2 mM	L-Glutamin
	100 IU/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	1 mM	Natrium-Pyruvat
	1 mM	HEPES

**Tabelle 6: Zytokine und Wachstumsfaktoren**

Zytokine und Wachstumsfaktoren	Hersteller
Anti-Mouse CD3e (Klon 145-2C1)	eBioscience, Santa Clara, USA
Anti-Mouse CD28 (Klon 37.51)	eBioscience, Santa Clara, USA
Recombinant Human IL-2	PeproTech, Rocky Hill, USA
Recombinant Human IL-15	PeproTech, Rocky Hill, USA
Dynabeads Mouse T-Activator CD3-CD28	Life Technologies, München, Deutschland

Einmalmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen BD Falcon (Franklin Lakes NJ, USA), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Corning (Corning NY, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Deutschland), Millipore (Billerica, USA), Sartorius (Göttingen, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

### 2.1.4 Zelllinien

**Tabelle 7: Zelllinien**

Zelllinie	Zellart	Ursprung	Medium	Herkunft
B16-OVA	Murine Melanom-Zelllinie (C57BL/6)	B16-F10-Zelllinie	DMEM-Vollmedium	LGC Standards (Teddington, Vereinigtes Königreich)
Panc-OVA	Murine Pankreaskarzinom-Zelllinie (C57BL/6)	Panc02-Zelllinie	DMEM-Vollmedium	Prof. Dr. med. C. Bruns (LMU München, Deutschland)
Plat-E	Verpackungs-Zelllinie	293T-Zelllinie	DMEM-Vollmedium mit 1 µg/mL Puromycin und 10 µg/mL Blastocidin	Dr. rer. nat. M. Leisegang (Charité Berlin, Deutschland)

### 2.1.5 Kits

**Tabelle 8: Kits**

Kit	Hersteller
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pure Yield Plasmid Maxiprep System	Promega, Madison, USA
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, USA

### 2.1.6 FACS-Antikörper

**Tabelle 9: unkonjugierte Primärantikörper**

Primärantikörper	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Cetuximab	10 µg/ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
G8.8 IgG2a Ratten anti-mEpCAM-Antikörper	10 µg/ml	Jonas Henkel, Abteilung für Klinische Pharmakologie, München

<b>Primärantikörper</b>	<b>Eingesetzte Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischer Antikörper	10 µg/ml	Roche, Penzberg, Deutschland
Rituximab	10 µg/ml	Roche, Basel, Schweiz

**Tabelle 10: konjugierte Primärantikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Eingesetzte Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-CD3 PE/Cy7	17A2	5 µg/ml	Biologend, San Diego, USA
Anti-CD8 APC	53-6.7	5 µg/ml	Biologend, San Diego, USA
Anti-Human EGFR APC	AY13	10 µg/ml	Biologend, San Diego, USA

**Tabelle 11: Sekundärantikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Eingesetzte Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 488 AffiniPure F(ab) <sub>2</sub> Fragment Donkey anti-Rat IgG (H+L)	30 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Alexa Fluor 488 AffiniPure F(ab) <sub>2</sub> Fragment Goat anti-Mouse IgG, F(ab) <sub>2</sub> Fragment Specific	30 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Alexa Fluor 488 Goat anti-Human IgG (H+L) Secondary Antibody	20 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FITC AffiniPure Rabbit anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific	30 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
FITC AffiniPure F(ab) <sub>2</sub> Fragment Goat anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific	30 µg/ml	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

### 2.1.7 Software

**Tabelle 12: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems, San Jose, USA
Endnote	Thompson Reuter, Carlsbad, USA
FACS Diva	BD Biosciences, New Jersey, USA



Software	Hersteller
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
RTCA Data Analysis	ACEA Biosciences, San Diego, USA

## 2.2 Tierversuche

### 2.2.1 Mäuse

Mäuse, die transgen für einen T-Zell-Rezeptor (TZR) sind, der spezifisch für Ovalbumin ist (OT-I), wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) gekauft und unter SPF Bedingungen in unserem Tierstall gezüchtet. Für Therapieversuche wurden weibliche, wildtyp C57BL/6 Mäuse von der Firma Janvier (St. Berthevin, Frankreich) erworben. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente 6 bis 8 Wochen alt. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern, München, Deutschland) genehmigt.

### 2.2.2 Isolation von Milz-Zellen

Die Mäuse wurden durch Genickbruch unter Isofluran-Narkose getötet. Die Milz wurde entnommen und unter sterilen Bedingungen durch ein 40 µm Zellsieb in ein Falcon mit 5 ml T-Zell-Medium (TCM) gedrückt, um die Gewebestruktur aufzubrechen und eine Einzelzellsuspension zu erreichen. Das Zellsieb wurde dreimal mit 10 ml TCM gespült. Nach Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde das Zellpellet in Erylyse-Puffer resuspendiert und für 90 s inkubiert. Durch erneutes Waschen mit TCM und Zentrifugation wurden Erythrozytenreste entfernt. Die gewonnenen Splenozyten wurden auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml in TCM mit 10 IU/ml IL-2, 1 µg/ml anti-*mouse* CD3 und 0,1 µg/ml anti-*mouse* CD28 eingestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 *In vivo* Therapieversuche

Den Mäusen wurden  $10^5$  oder  $10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA- oder  $2 \times 10^6$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen subkutan in die Flanke injiziert. Tumortragende Mäuse wurden vor der Therapie in Gruppen randomisiert (n= 6 - 7) und erhielten entweder eine Kombinationstherapie aus EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper (ER-Ep BiAk), EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, den

ER-Ep BiAk oder PBS als Kontrolle. Pro Tier wurden  $5 \times 10^6$  bzw.  $10^7$  OT-I T-Zellen bzw. 200  $\mu\text{g}$  ER-Ep BiAk, gelöst in 150  $\mu\text{l}$  PBS, intravenös injiziert. Bei der Kombinationstherapie wurden die T-Zellen vor Injektion für 30 min mit dem ER-Ep BiAk inkubiert. Die mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumore wurden am 3. und 8. bzw. 3. und 10. Tag nach der Tumordinjektion behandelt, während die mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumore einmalig am 5. Tag nach der Tumordinjektion therapiert wurden. In einem weiteren Therapieversuch mit mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumoren wurden die Mäuse 6 h vor der ersten T-Zellinjektion – 72 h nach der Tumordinjektion – mit 5 Gray (Gy) bestrahlt, um eine Lymphopenie zu induzieren. Die Tumorgroße wurde alle 48 h verblindet gemessen. Bei einer Tumorgroße von größer 225  $\text{cm}^2$  wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und getötet.

## **2.3. Zellkultur**

### **2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellkulturexperimente wurden unter einer Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität**

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest wurde zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden. Die Zellen wurden bei einer adäquaten Verdünnung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellzahl ergab sich aus:

Zellzahl pro ml = gezählte Zellen in einem Quadrat x Verdünnungsfaktor x  $10^4$

### **2.3.3 Kultivierung von Tumorzelllinien**

Sowohl die Panc-OVA- als auch die B16-OVA-Tumorzelllinien wurden in DMEM-Vollmedium in adäquaten Zellkulturflaschen kultiviert. Unter dem Lichtmikroskop wurde regelmäßig auf die Vitalität der Zellen geachtet und die Konfluenz beurteilt. Aufgrund ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen dreimal pro Woche passagiert. Hierfür wurden die adhären Zellen mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst, gewaschen und ein Bruchteil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Zur Expansion wurden die Zellen auf

zusätzliche Zellkulturflaschen aufgeteilt. Durch regelmäßige Testung konnte eine Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen werden.

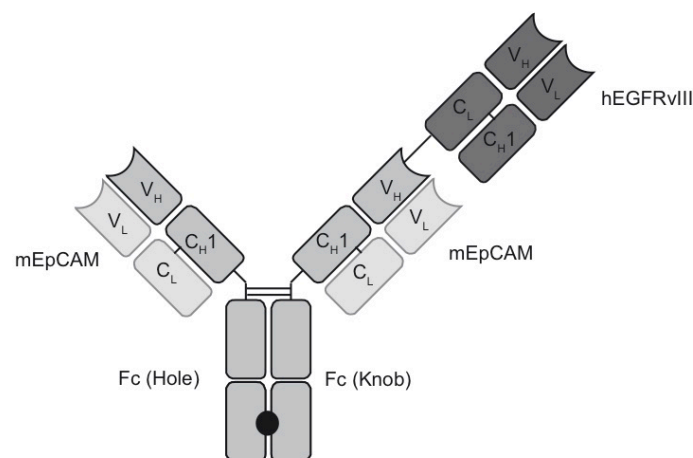
### 2.3.4 Kultivierung von primären T-Zellen

Primäre T-Zellen wurden in TCM mit 50 ng/ml IL-15 kultiviert. Alle 48 h wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt und je nach Zellzahl in frische 6-Well-Platten, 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Die Zellen wurden täglich unter dem Lichtmikroskop auf ihre Vitalität überprüft. Nach 8 bis 10 Tagen wurden die Zellen verworfen.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Entwicklung eines anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers

Der in dieser Arbeit verwendete anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifische Antikörper (ER-Ep BiAk) wurde von der Firma Roche (Penzberg, Deutschland) in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie entwickelt und zur Verfügung gestellt. Der BiAk besteht aus einem humanen IgG-Grundgerüst und ist als ein asymmetrisches 2+1-Format, mit einer bivalenten Bindung an murines EpCAM (mEpCAM) und einer monovalenten Bindung an humanes EGFRvIII, aufgebaut (Abbildung 4). Das anti-EGFRvIII Fab-Fragment wurde durch eine *head-to-tail*-Fusion über einen flexiblen Linker mit einem der anti-mEpCAM Fab-Fragmente verbunden. Der BiAk wurde mit Hilfe der Cross-MAb- und *knob-into-hole*-Technik hergestellt (Castoldi et al. 2013; Kobold et al. 2015).



**Abbildung 4: Aufbau des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers modifiziert nach Schaefer et al. 2011 sowie Murphy und Janeway 2012**

## 2.4.2 Retrovirale Transduktion

### 2.4.2.1 Transduktion primärer T-Zellen

Primäre T-Zellen wurden mit dem humanen *epidermal growth factor receptor* Variante 3 (EGFRvIII) retroviral transduziert. Hierfür wurde der EGFRvIII in den retroviralen Vektor pMP71 kloniert. Primäre T-Zellen wurden mit dem pMP71-EGFRvIII Konstrukt nach folgendem Protokoll transduziert (modifiziert nach Leisegang et al. 2008; Kobold 2015).

Es wurden pro Well  $10^6$  bis  $1,25 \times 10^6$  Plat-E Zellen in 3 ml DMEM-Vollmedium in eine 6-Well-Patte ausplattiert. Nach 20 bis 24 h Inkubation bei 37 °C wurde mit 60 bis 70 %ig konfluenten Wells fortgefahren. Für die Transfektion wurden pro Well 150 µl einer 2,5 mM Calcium-Chlorid-Lösung ( $\text{CaCl}_2$ ), die 18 µg der zu transfizierenden DNA enthält, hergestellt. 150 µl des  $\text{CaCl}_2$ -DNA-Gemischs wurden unter vortexen tröpfchenweise zu 150 µl Transfektionspuffer hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Well 300 µl der präzipitierten Lösung tröpfchenweise auf die Plat-E Zellen pipettiert. Nach 6 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium gegen DMEM-Vollmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 42 h inkubiert. Splenozyten wurden wie oben beschrieben aus einer wildtyp (WT) bzw. OT-I Maus gewonnen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Der Virusüberstand der Plat-E Zellen wurde abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. 1 bis 2 ml Virusüberstand wurden pro Well in eine Retronectin-gecoatete 24-Well-Platte überführt und bei 3000 g für 2 h bei 4 °C zentrifugiert. Die Plat-E Zellen wurden mit 3 ml TCM versorgt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Splenozyten wurden auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml in TCM mit 10 IU/ml IL-2 und  $4 \times 10^5$  Dynabeads pro ml eingestellt. Nach der Zentrifugation wurde der Virusüberstand verworfen, 1 ml der Zellsuspension auf die virusgecoateten Platten überführt und bei 800 g für 30 min bei 32 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut Virusüberstand abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter filtriert, 1 ml pro Well auf die T-Zellen gegeben und bei 800 g für 90 min bei 32 °C zentrifugiert. Nach 6 h Inkubation bei 37 °C wurden die T-Zellen auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml in TCM mit 50 ng/ml IL-15 eingestellt, in 6-Well-Platten überführt und bei 37 °C kultiviert. Die Transduktionseffizienz wurde am 8. Tag mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

### 2.4.2.2 Transduktion von Tumorzelllinien

Das murine *epithelial cell adhesion molecule* (mEpCAM) wurde in einen pMXs-Vektor kloniert und mittels retroviraler Transduktion in B16-OVA- und Panc-OVA-Tumorzellen transduziert.

Hierfür wurden, wie oben beschrieben, Plat-E Zellen transfiziert und retroviraler Virus produziert. Für die Transduktion wurden  $10^5$  Tumorzellen pro Well in einen 6-Well-Platte ausplattiert. Nachdem die Zellen adhären waren, wurde das Medium abgenommen und durch 3 ml filtrierten Virusüberstand ersetzt. Zusätzlich wurde 8  $\mu\text{g/ml}$  Polybrene hinzugegeben. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurde der Virusüberstand gegen DMEM-Vollmedium ausgetauscht. Die Transduktionsrate wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die mEpCAM-positiven Tumorzellen wurden durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS) aussortiert und anschließend expandiert.

### 2.4.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Bestimmung der Transduktionseffizienzen sowie zum Sortieren der mEpCAM-positiven Tumorzellen verwendet. Hierfür wurde ein FACS Canto II von BD Biosciences verwendet.

Zur Bestimmung der Transduktionsraten wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  PBS mit 2 % FCS gelöst. Zur Anfärbung der Oberflächenantigene wurde 0,5 - 1  $\mu\text{g}$  eines fluoreszenzmarkierten oder eines ungekoppelten Antikörpers hinzugegeben und im Dunkeln für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS mit 2 % FCS gewaschen. Wenn ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet wurde, so wurde in einem zweiten Schritt 1 - 1,5  $\mu\text{g}$  eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurde zweimal mit PBS mit 2 % FCS gewaschen. Zur Analyse wurden die Zellen in 1 ml PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit der FlowJo Software ausgewertet und in Prozent dargestellt.

Für das FACS-sorten wurden die Zellen, wie oben beschrieben, auf mEpCAM angefärbt und die am stärksten positiv angefärbten 3 % der Zellen herausortiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C kultiviert und die mEpCAM-Expression

mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Das FACS-sorten wurde durch eine befreundete Arbeitsgruppe durchgeführt.

#### 2.4.4 Adhäsions-Assay

Für die Adhäsions-Assays wurden  $10^6$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausplattiert, so dass nach Inkubation über Nacht eine 100 %ige Konfluenz erreicht wurde. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen pro ml in PBS mit Calcein angefärbt. Hierfür wurden pro ml Zellsuspension  $10 \mu\text{l}$   $10 \mu\text{M}$  Calcein hinzugefügt und für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde ein Teil der angefärbten T-Zellen in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml in PBS mit  $10 \mu\text{g/ml}$  des ER-Ep BiAk für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.  $10^6$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> bzw. nicht transduzierte, EGFRvIII<sup>-</sup> T-Zellen wurden mit oder ohne ER-Ep BiAk zu den ausplattierten Tumorzellen hinzugegeben und für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Wells sechsmal mit 1 ml PBS gewaschen, um die nicht durch den ER-Ep BiAk an die Tumorzellen gebundenen T-Zellen zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml 1 % Triton X100 lysiert und der Überstand in Eppendorf-Tubes übertragen. Nach Zentrifugation bei 15000 g für 5 min wurden die Überstände abgenommen und die Fluoreszenz mit dem Mithras Platten-Leser bei 490 nm gemessen. Die Menge an freigesetztem Calcein verhält sich proportional zur Menge der noch im Well vorhandenen T-Zellen. Dadurch lässt sich die Menge an zurückgehaltenen T-Zellen mit folgender Formel berechnen:

$$\% \text{ an zurückgehaltenen T Zellen} = \frac{\text{Fluoreszenz in nicht gewaschenen Wells}}{\text{Fluoreszenz in gewaschenen Wells}} \times 100$$

#### 2.4.5 Zytotoxizitäts-Assay

Für Zytotoxizitäts-Assays wurde das kommerziell erwerbliche Kit *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* der Firma Promega verwendet und nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

Es wurden in eine 96-Well-Platte pro Well  $2 \times 10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen in  $100 \mu\text{l}$  Zytotox-Medium ausgesät. Die Hälfte der transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen wurde in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml mit  $10 \mu\text{g/ml}$  ER-Ep BiAk für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zu den ausplattierten Tumorzellen wurden EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, die mit oder ohne den ER-Ep BiAk inkubiert wurden, in einem Verhältnis von

10:1, 5:1 oder 1:1 hinzugegeben. Die Zytotoxizitäts-Assays wurden für 8 bis 10 h bei 37 °C inkubiert. Der *CytoTox 96®* Assay misst die von den lysierten Zellen freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH). Das freigesetzte LDH im Überstand wird mit einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen und wurde bei 490 nm mit dem Mithras Platten-Leser gemessen. Die spezifische Zelllyse ergibt sich aus:

$$\text{Spezifische Zelllyse in \%} = \frac{(\text{Kokultur} - \text{Effektorzellen spontan} - \text{Zielzellen spontan})}{(\text{Zielzellen maximal} - \text{Zielzellen spontan})} \times 100$$

#### 2.4.6 Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assay

Die Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assays wurden mit dem iCELLigence System nach Angaben des Herstellers (ACEA Biosciences Inc.) durchgeführt.

Hierfür wurden pro Well 4 x 10<sup>4</sup> mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen in 100 µl Cytotox-Medium in eine 8-Well-Platte ausplattiert. EGFRvIII<sup>+</sup> und untransduzierte OT-I T-Zellen wurden in einer Konzentration von 4 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml mit 10 µg/ml ER-Ep BiAk für 30 min bei 37 °C inkubiert. EGFRvIII<sup>+</sup> bzw. nicht transduzierte, EGFRvIII<sup>-</sup> OT-I T-Zellen, die mit dem bispezifischen Antikörper inkubiert wurden, wurden in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1 zu den Tumorzellen hinzugefügt. Die Zellzahl wurde kontinuierlich mittels Impedanzmessung mit dem iCELLigence System über 48 h gemessen.

#### 2.5 Statistische Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse als Mittelwerte und die Fehlerbalken als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der GraphPad Prism Software Version 5.0. Die statistische Signifikanz wurde durch den zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben oder den zweifaktoriellen ANOVA mit der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Ab einem p-Wert kleiner 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angenommen.

### 3. Ergebnisse

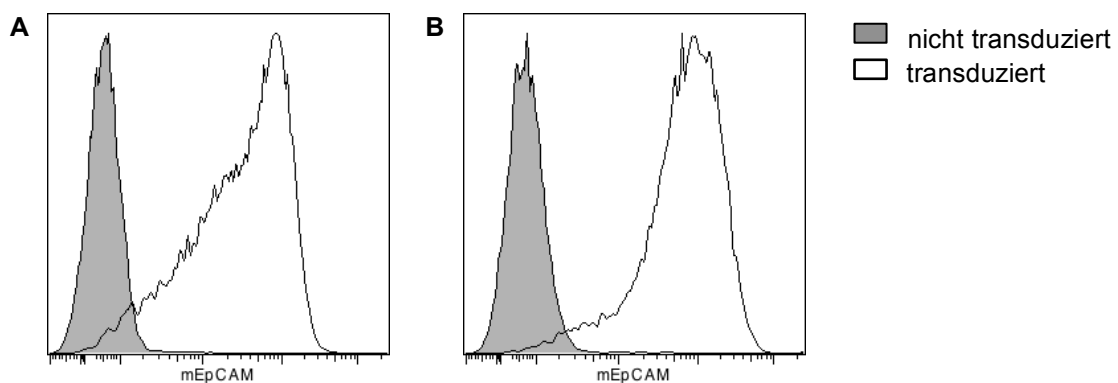
#### 3.1 Expression der Zielantigene

Damit der anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifische Antikörper (ER-Ep BiAk) an T-Zellen und Tumorzellen binden kann, müssen diese das Zielantigen EGFRvIII bzw. mEpCAM auf ihrer Oberfläche exprimieren.

##### 3.1.1 Generierung von mEpCAM exprimierenden Tumorzelllinien

Hierfür wurde das murine *epithelial cell adhesion molecule* (mEpCAM) in einen pMXs-Vektor kloniert. Die Tumorzelllinien B16-OVA und Panc-OVA wurden mit dem pMXs-mEpCAM-Vektor retroviral transduziert. Die mEpCAM-positiven Tumorzellen wurden mittels FACS aussortiert und expandiert. Die Expressionsrate des mEpCAM auf den Tumorzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die nicht transduzierten Zellen zeigten keine mEpCAM-Expression auf ihrer Oberfläche. Bei den transduzierten Zellen (schwarze Linie) kam es zu einer deutlichen Rechtsverschiebung im Vergleich zu den nicht transduzierten Zellen (grau schraffiert) (Abbildung 5). Die B16-OVA-Zellen waren nach der Transduktion in 95 % mEpCAM positiv (Abbildung 5A). Die Panc-OVA-Zellen exprimierten nach der Transduktion in 96 % mEpCAM auf ihrer Zelloberfläche (Abbildung 5B).

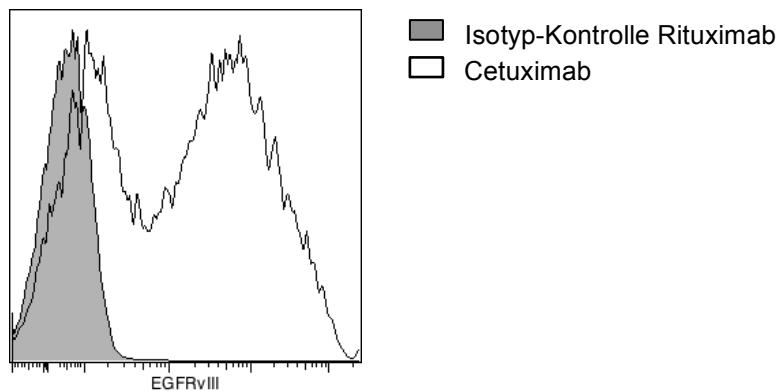


**Abbildung 5: Expression des Zielantigens mEpCAM auf Tumorzellen.** Analyse der mEpCAM-Expression auf B16-OVA- (A) und Panc-OVA- (B) Tumorzellen nach retroviraler Transduktion mittels Durchflusszytometrie. (A) Als Primärantikörper diente ein G8.8 Ratten anti-mEpCAM Antikörper. Die Bindung des Antikörpers an mEpCAM wurde über einen AF 488 gekoppelten anti-Ratten Sekundärantikörper detektiert. (B) Darstellung der mEpCAM-Expression mit dem ER-Ep BiAk und einem AF 488 gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten gefärbte, nicht transduzierte B16-OVA- bzw. Panc-OVA-Zellen. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative von zwei unabhängig durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen.



### 3.1.2 Expression des Zielantigens EGFRvIII auf T-Zellen

Primäre T-Zellen wurden mit einem inaktiven Marker-Antigen, einer trunkierten Version des humanen *epidermal growth factor receptor* Variante 3 (EGFRvIII) transduziert. Hierfür wurde der trunkierte EGFRvIII in einen pMP71-Vektor kloniert. Der Transduktionserfolg wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abbildung 6). Nicht transduzierte, primäre T-Zellen zeigten keine EGFRvIII-Expression auf ihrer Zelloberfläche (hier nicht gezeigt). Im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (grau schraffiert) kam es bei den transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen (schwarze Linie) zu einer deutlichen Rechtsverschiebung. Je nach Erfolg der retroviralen Transduktion exprimierten 35 - 70 % der T-Zellen EGFRvIII auf ihrer Oberfläche. Ab einer Transduktionsrate von mehr als 45 % wurden die transduzierten T-Zellen für Adhäsions-Assays, Zytotoxizitäts-Assays und *in vivo* Versuche verwendet.



**Abbildung 6: Expression des Zielantigens EGFRvIII auf primären T-Zellen.**

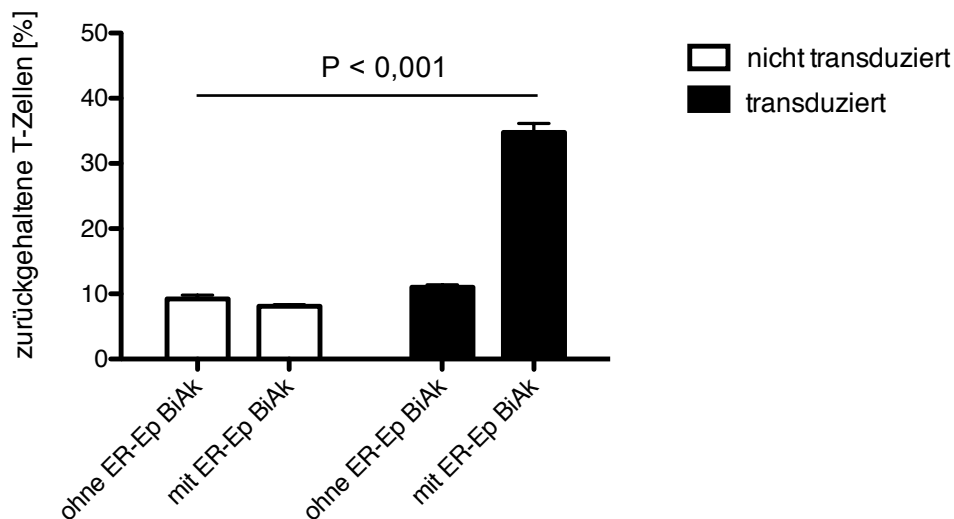
Durchflusszytometrische Analyse der EGFRvIII-Expression auf primären T-Zellen mit Cetuximab und einem AF 488 gekoppelten anti-Human Sekundärantikörper. Als Kontrolle diente die Isotyp-Färbung mit Rituximab kombiniert mit dem AF 488 gekoppelten anti-Human Sekundärantikörper. Gezeigt ist eine repräsentative Transduktion primärer T-Zellen mit dazugehöriger durchflusszytometrischer Analyse.

### 3.2 T-Zell-Retention an mEpCAM-positiven Tumorzellen durch den anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper

Eine Voraussetzung für den Erfolg der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer (AZT) und dem ER-Ep BiAk ist die Fähigkeit des ER-Ep BiAk, gleichzeitig an das mEpCAM der Tumorzelle und das EGFRvIII der T-Zelle zu binden. Dadurch werden die T-Zellen an die Tumorzellen gebunden und können so spezifisch aktiviert werden.

Um dies zu untersuchen, wurden primäre T-Zellen mit Calcein angefärbt und nach Inkubation mit dem ER-Ep BiAk zu adhärennten mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumorzellen hinzugegeben. Nach dem Waschen der Platten wurde die Menge der an den Tumorzellen zurückgehaltenen T-Zellen gemessen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ER-Ep BiAk spezifisch EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen an mEpCAM<sup>+</sup> Tumorzellen bindet. 35 % der mit EGFRvIII transduzierten T-Zellen wurden durch den ER-Ep BiAk im Well zurückgehalten. Die in dem hier gezeigten Versuch verwendeten T-Zellen exprimierten in 45 % EGFRvIII auf ihrer Zelloberfläche, sodass durch den ER-Ep BiAk 77 % der EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen an mEpCAM<sup>+</sup> Tumorzellen gebunden wurden. Im Vergleich dazu wurden lediglich 11 % der transduzierten T-Zellen, die ohne den ER-Ep BiAk inkubiert wurden und 8 % der nicht transduzierten, EGFRvIII<sup>-</sup> T-Zellen an den Tumorzellen zurückgehalten (Abbildung 7).

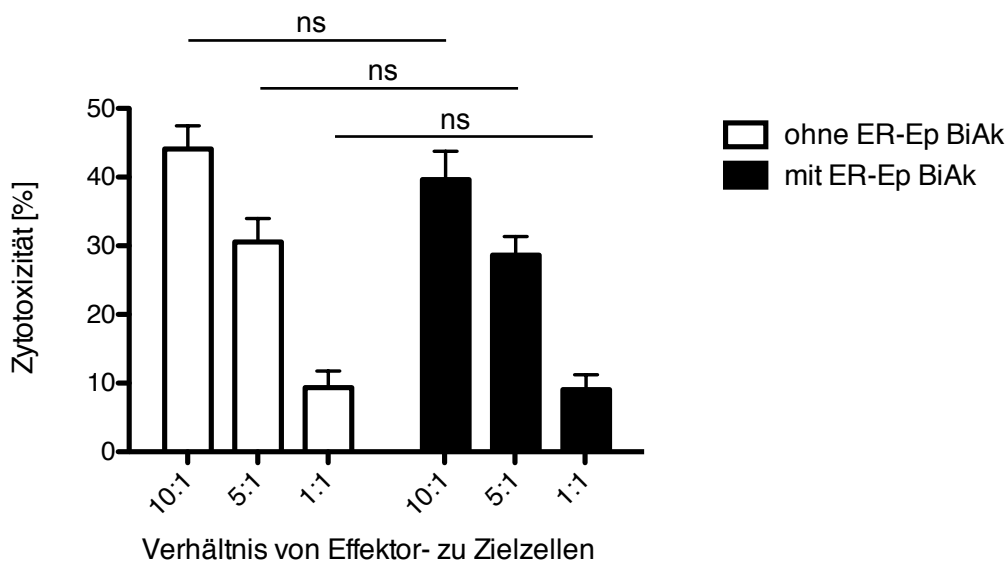


**Abbildung 7: Rekrutierung EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen an mEpCAM<sup>+</sup> Tumorzellen durch den ER-Ep BiAk.** Konfluente mEpCAM positive B16-OVA-Tumorzellen wurden mit Calcein gefärbt, EGFRvIII transduzierten oder nicht transduzierten T-Zellen mit oder ohne ER-Ep BiAk inkubiert. Die Anzahl der nach dem Waschen im Well zurückgehaltenen, Calcein gefärbten T-Zellen wurde quantifiziert. Die Anzahl der zurückgehaltenen T-Zellen ist proportional zur Fluoreszenz. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben.

### 3.3 Einfluss des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers auf die Tumorzelllyse *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der ER-Ep BiAk in der Lage war, transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen an mEpCAM<sup>+</sup> Tumorzellen *in vitro* zu binden, wurde untersucht ob die Kombination mit dem ER-Ep BiAk auch zu einer vermehrten Tumorzelllyse führt. Hierfür wurden mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen und transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen in verschiedenen Effektor- zu Zielzell (E:Z)-Verhältnissen mit oder ohne ER-Ep BiAk für 8 bis 10 h kokultiviert. Die Zelllyse wurde anhand der LDH Freisetzung gemessen.

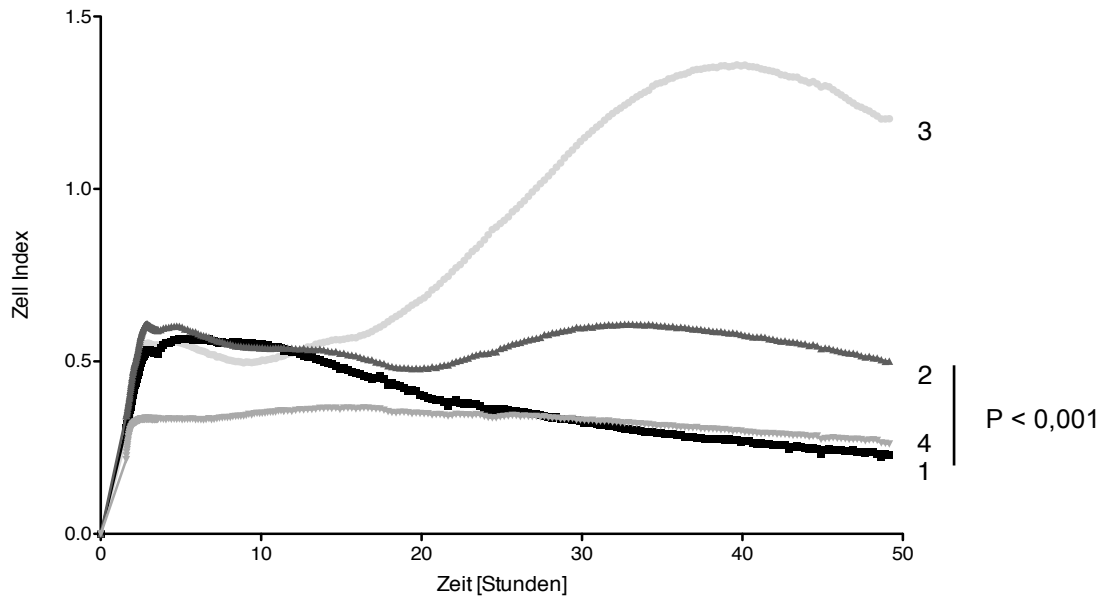
In diesen Kokulturen zeigte sich, dass die Kombination des ER-Ep BiAk mit EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen im Vergleich zu den OT-I T-Zellen alleine keinen zusätzlichen Effekt auf die Tumorzelllyse hat. Bei einem E:Z-Verhältnis von 10:1 kam es bei der Kombinationstherapie zu einer Tumorzelllyse von 40 % und ohne den ER-Ep BiAk von 44 % (Abbildung 8). Auch bei den E:Z-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 8: Einfluss der Kombination von EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk auf die Tumorzelllyse *in vitro*.** Kokultur von  $2 \times 10^5$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Zellen und EGFRvIII transduzierten OT-I T-Zellen. Die Effektorzellen wurden in einem Verhältnis von 1:1, 5:1 und 10:1 hinzugegeben. Der ER-Ep BiAk wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml verwendet. Die Tumorzelllyse wurde durch LDH Freisetzung gemessen. Die Versuche wurden in Quadruplikaten durchgeführt und als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Gezeigt sind die Daten von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben.

Zytotoxizitäts-Assays, die auf LDH Freisetzung basieren, repräsentieren die Zelllyse zu einem definierten Zeitpunkt. Um darzustellen, wie sich die Tumorzelllyse über die Zeit entwickelt, wurde in einem weiteren Versuch die Panc-OVA-Zellviabilität kontinuierlich für 48 h durch Impedanzmessung überwacht. Hierfür wurden mit EGFRvIII transduzierte oder nicht transduzierte OT-I T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk inkubiert und in einem Verhältnis von 10:1 zu mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen hinzugegeben.

Die Wachstumskurven der beiden Kokulturen aus mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Zellen, transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen bzw. nicht transduzierten, EGFRvIII<sup>-</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAk überlappten sich zu Beginn der Beobachtungsphase. Ab einem Zeitpunkt von 12 h trennten sich die Kurven auf (Zellindex  $0,34 \pm 0,01$  im Vergleich zu  $0,58 \pm 0,03$ ,  $P < 0,001$  ab 27 h). Die Wachstumskurve der Kokultur mit den transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen näherte sich der Kurve der OT-I T-Zellen an. Durch die Kombination von transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk kam es nach ca. 26 h zur vollständigen Lyse aller Tumorzellen (Abbildung 9). Im Vergleich dazu wurde durch die Kombination des ER-Ep BiAk mit nicht transduzierten, EGFRvIII<sup>-</sup> OT-I T-Zellen das Wachstum der Panc-OVA-Tumorzellen unterdrückt, jedoch blieb die Anzahl der Tumorzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Als Kontrollen wurde das Wachstum der Panc-OVA-Tumorzellen und das der OT-I T-Zellen alleine beobachtet. Die Panc-OVA-Tumorzellen teilten sich und hatten ihr Maximum nach ungefähr 40 h erreicht. Die Anzahl der OT-I T-Zellen blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant.



**Abbildung 9: Kontinuierliche Darstellung der Zahl viable Tumorzellen über 48 h.**  $4 \times 10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen wurden mit  $4 \times 10^5$  EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen **(1)** oder nicht transduzierten, EGFRvIII<sup>-</sup> OT-I T-Zellen **(2)** und dem ER-Ep BiAk für 48 h kultiviert. Als Kontrollen wurden  $4 \times 10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen **(3)** und  $4 \times 10^5$  EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen **(4)** alleine kultiviert. Die Zellviabilität wurde mittels Impedanzmessung gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Das Experiment wurde aus technischen Gründen in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *two-way* ANOVA Test mit der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen.

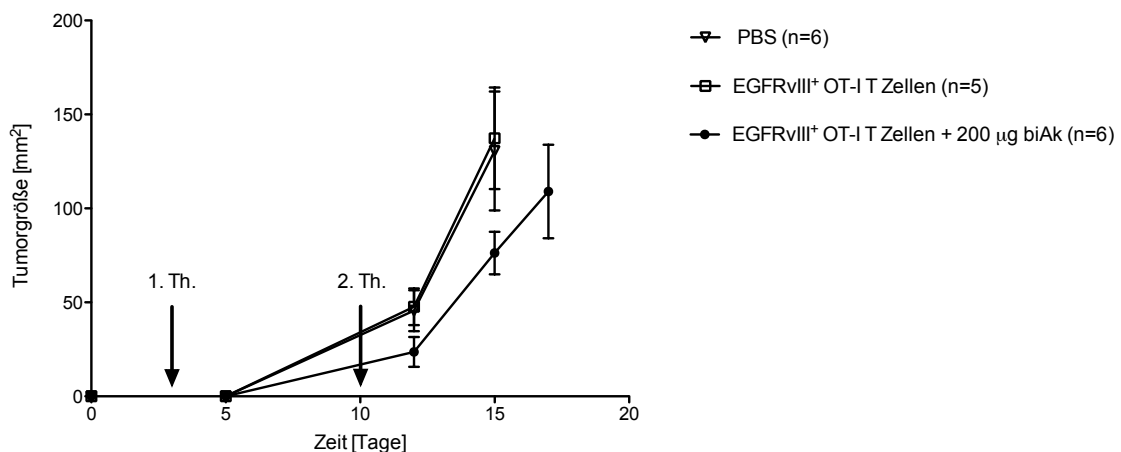
### 3.4 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer und einem bispezifischen Antikörper im murinen Melanommodell B16-OVA

Die Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus AZT tumorspezifischer T-Zellen und einem T-Zell-rekrutierenden BiAk wurde bei subkutanen B16-OVA-Tumoren untersucht. Das B16-Tumormodell ist ein murines Melanommodell. Subkutane B16-Tumore sind aggressiv wachsende und bekanntermaßen schwer zu therapierende Tumore (Ya et al. 2015). Auch der AZT zeigte eine schlechte Wirksamkeit bei subkutanen B16-Tumoren (Overwijk et al. 2003). Da die Kombination mit dem ER-Ep BiAk die Wirksamkeit des AZT steigern sollte, stellten subkutane B16-Tumore ein geeignetes Tumormodell für die *in vivo* Testung unseres Therapiekonzeptes dar.

### 3.4.1 Einfluss der Kombination von transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper auf das B16-OVA-Tumorstadium

Den Mäusen wurden subkutan mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumore induziert. Die tumortragenden Mäuse wurden am 3. und 10. Tag nach der Tumordinjektion therapiert. Die Therapie bestand entweder aus der Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAK, aus den transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen alleine oder PBS als Kontrolle.

Die Kombinationstherapie aus EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und ER-Ep BiAK verlangsamte das Tumorstadium verglichen mit den EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen allein ( $137 \pm 27 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $76 \pm 11 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,05$  an Tag 15), oder mit PBS ( $131 \pm 32 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $76 \pm 11 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,05$  an Tag 15) (Abbildung 10). Die Therapie mit EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen alleine hatte keinen Einfluss auf das B16-Tumorstadium. Die Tumorstadien unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe, die mit PBS behandelt wurde ( $137 \pm 27 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $131 \pm 32 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 15).

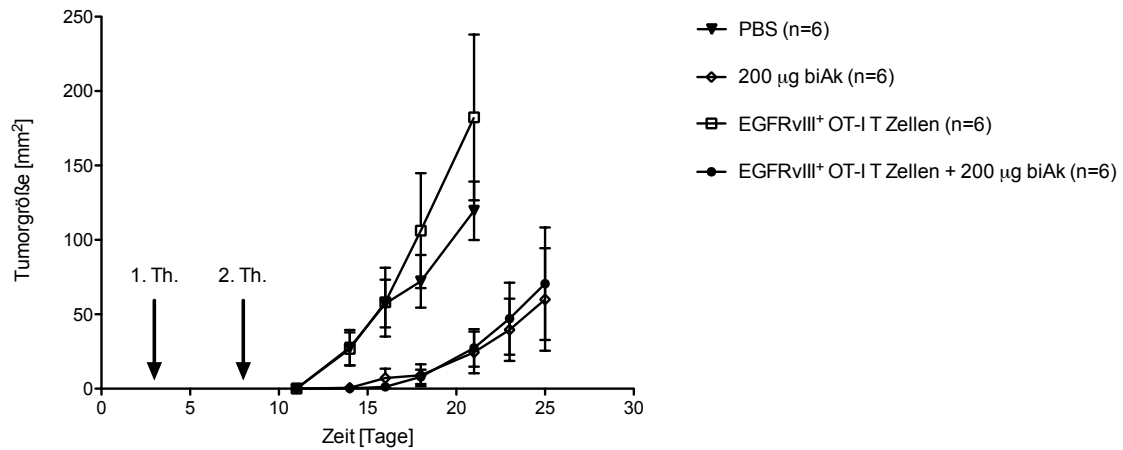


**Abbildung 10: Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAk im B16-Tumormodell.** Den Mäusen wurden  $10^5$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumorzellen subkutan injiziert. Die Therapie wurde am 3. und 10. Tag nach der Tumordinjektion appliziert (dargestellt durch Pfeile). Die Mäuse erhielten entweder PBS i. v. ( $n = 6$ ),  $5 \times 10^6$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen i. v. ( $n = 5$ ) oder  $5 \times 10^6$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen zusammen mit  $200 \mu\text{g}$  ER-Ep BiAk i. v. ( $n = 6$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte der Tumorstadium in  $\text{mm}^2$ . Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *two-way* ANOVA Test mit Korrektur für multiples Testen mit der Bonferroni-Methode.

### **3.4.2 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Therapie mit dem anti-EGFRvIII x anti mEpCAM bispezifischen Antikörper**

Um die *in vivo* Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus AZT und dem ER-Ep BiAk zu bestätigen, wurde ein zweiter *in vivo* Versuch mit einer weiteren Kontrollgruppe durchgeführt, welche mit dem ER-Ep BiAk alleine behandelt wurde (Abbildung 11). Im Vergleich zum vorherigen Therapieversuch wurde der Abstand zwischen den beiden Therapien verkürzt, sodass nun die Therapie am 3. und am 8. Tag nach der Tumorinjektion erfolgte. Zudem wurde die Anzahl der injizierten Tumorzellen auf  $10^4$  erniedrigt, während die Anzahl der injizierten T-Zellen von  $5 \times 10^6$  auf  $10^7$  erhöht wurde.

Auch in diesem Therapieversuch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit PBS und der mit EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen ( $120 \pm 20 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $182 \pm 56 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 21). Sowohl die Kombination von EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk als auch der ER-Ep BiAk alleine führte im Vergleich zu der Therapie mit den EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen alleine zu einem verzögerten Tumorwachstum ( $27 \pm 13 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $182 \pm 56 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,001$  an Tag 21 bzw.  $24 \pm 14 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $182 \pm 56 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,001$  an Tag 21). Allerdings war zwischen der Kombinationstherapie und dem ER-Ep BiAk alleine kein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum zu erkennen ( $71 \pm 35 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $60 \pm 34 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 25). Dieser Versuch zeigte, dass die therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie alleine durch den ER-Ep BiAk vermittelt wird, ohne dass die T-Zellen zu der Wirksamkeit beitragen.



**Abbildung 11: Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAk im Vergleich zum ER-Ep BiAk alleine.** Den Mäusen wurden  $10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumorzellen subkutan injiziert. Die Therapie wurde am 3. und 8. Tag nach der Tumordinjektion appliziert (dargestellt durch Pfeile). Die Mäuse erhielten entweder PBS i. v. (n = 6),  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen i. v. (n = 6), 200 µg ER-Ep BiAk i. v. (n = 6) oder  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen zusammen mit 200 µg ER-Ep BiAk i. v. (n = 6). Gezeigt sind die Mittelwerte der Tumorgöße in mm<sup>2</sup>. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem two-way ANOVA Test mit Korrektur für multiples Testen mit der Bonferroni-Methode.

### 3.4.3 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie im B16-OVA-Tumormodell nach 5 Gray Ganzkörperbestrahlung

Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) sind zwei wichtige anti-tumorale Wirkmechanismen von monoklonalen Antikörpern. Da der therapeutische Effekt im B16-Tumormodell alleine auf dem ER-Ep BiAk basiert, ist anzunehmen, dass ADCC und CDC auch hier eine Rolle spielen.

Um den Wirkmechanismus des ER-Ep BiAk zu untersuchen, haben wir in einem weiteren *in vivo* Versuch die Mäuse vor dem AZT mit 5 Gy bestrahlt, um eine Lymphopenie zu erreichen. Es konnte in mehreren Studien belegt werden, dass eine lymphodepletierende Vorbehandlung die Wirksamkeit des AZT steigert (Dudley et al. 2002; Rosenberg et al. 2011) (Abbildung 12).

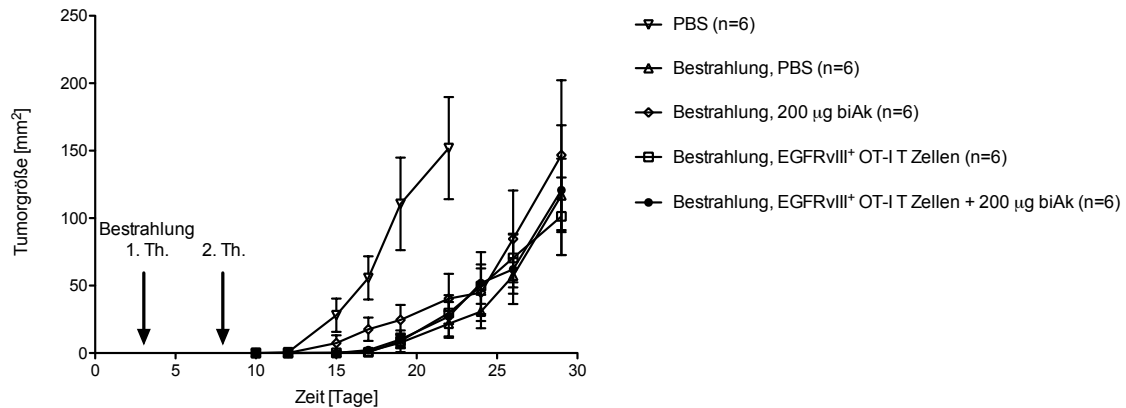
Hierfür wurden den Mäusen, wie bei dem vorherigen Versuch,  $10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumorzellen subkutan in die Flanke injiziert. 72 h nach der Tumordinjektion wurden die Mäuse vor dem AZT mit 5 Gy ganzkörperbestrahlt (TBI). Die zweite



Therapie erfolgte, analog zu den vorherigen Versuchen, am 8. Tag nach der Tumorinjektion. Die Mäuse erhielten entweder den ER-Ep BiAk zusammen mit EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, den ER-Ep BiAk, transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen oder PBS. Um die Wirkung der Bestrahlung auf das Tumorwachstum beurteilen zu können, gab es eine weitere Kontrollgruppe, welche nicht bestrahlt und mit PBS behandelt wurde.

Die Bestrahlung führte zu einem verzögerten Tumorwachstum ( $152 \pm 38 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $22 \pm 9 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,001$  an Tag 22), jedoch waren trotz Bestrahlung bei allen Mäusen die Tumore angewachsen. Zwischen den verschiedenen Therapiegruppen, die bestrahlt wurden, zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Die OT-I T-Zellen alleine zeigten im Vergleich zur PBS Gruppe auch trotz Bestrahlung keine Wirksamkeit ( $101 \pm 29 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $117 \pm 27 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 29). Der im letzten Versuch beobachtete Effekt durch den ER-Ep BiAk war nach der Bestrahlung aufgehoben ( $147 \pm 56 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $117 \pm 27 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 29). Ebenso war die therapeutische Wirkung der Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und ER-Ep BiAk nach der Bestrahlung nicht mehr zu beobachten ( $121 \pm 48 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $117 \pm 27 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 29).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der AZT trotz Bestrahlung keine Wirkung im B16-Tumormodell zeigte und auch die Kombination mit dem ER-Ep BiAk konnte die Wirksamkeit des AZT nicht steigern. Nachdem der ER-Ep BiAk durch die Bestrahlung keine Wirkung mehr zeigte, war auch die Kombinationstherapie aus ER-Ep BiAk und AZT tumorspezifischer T-Zellen wirkungslos.



**Abbildung 12: Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAk nach 5 Gy Bestrahlung.** Den Mäusen wurden  $10^4$  mEpCAM<sup>+</sup> B16-OVA-Tumorzellen subkutan injiziert. Die Mäuse wurden am 3. Tag nach Tumoringjektion vor Verabreichung der Therapie mit 5 Gy bestrahlt (TBI). Eine zweite Therapie wurde am 8. Tag nach Tumoringjektion durchgeführt (dargestellt durch Pfeile). Die Mäuse erhielten entweder PBS i. v. (n = 6), Bestrahlung und PBS i. v. (n = 6), Bestrahlung und  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen i. v. (n = 6), Bestrahlung und 200 µg ER-Ep BiAk i. v. (n = 6) oder Bestrahlung und  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen zusammen mit 200 µg ER-Ep BiAk i. v. (n = 6). Gezeigt sind die Mittelwerte der Tumorgöße in mm<sup>2</sup>. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem two-way ANOVA Test mit Korrektur für multiples Testen mit der Bonferroni-Methode.

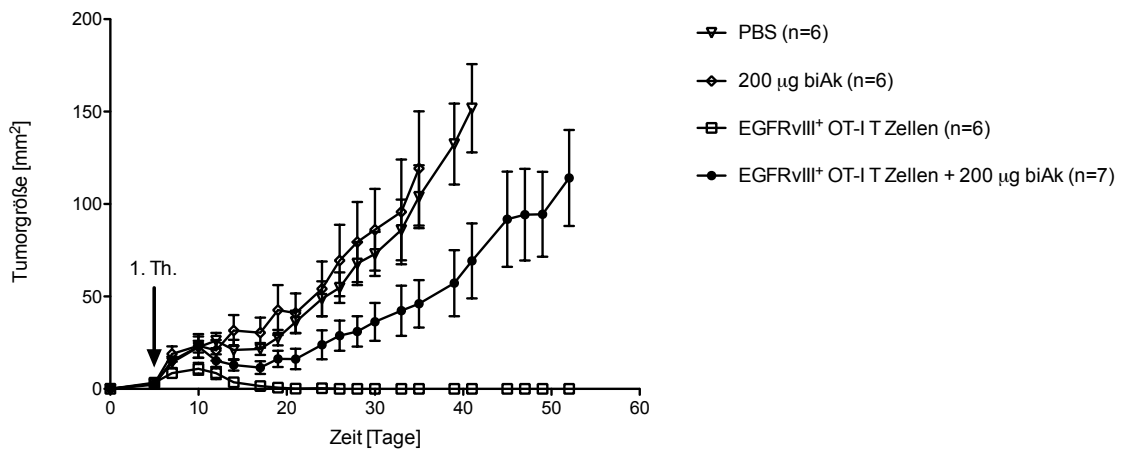
### 3.5 *In vivo* Testung der Kombinationstherapie aus adoptivem T-Zell-Transfer und dem anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörper im Panc-OVA-Tumormodell

Da die Kombination von AZT tumorspezifischer T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk keinen synergistischen Effekt im B16-Tumormodell zeigte, wurde die Wirksamkeit der Kombinationstherapie in einem weiteren Tumormodell, dem Panc-OVA-Tumormodell untersucht (Abbildung 13).

Hierfür wurden den Mäusen subkutan mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumore induziert. Den tumortragenden Mäusen wurde am 5. Tag nach der Tumoringjektion entweder die Kombinationstherapie aus transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und ER-Ep BiAk, nur die transduzierten, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen, nur der ER-Ep BiAk oder PBS intravenös injiziert.

Die Kombination von EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen mit dem ER-Ep BiAk führte verglichen mit PBS und dem ER-Ep BiAk alleine zu einem verlangsamten Tumorwachstum

( $46 \pm 13 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $104 \pm 17 \text{ mm}^2$  bzw.  $119 \pm 31 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,001$  an Tag 35). Interessanterweise zeigte die Therapie mit den EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen alleine einen Vorteil gegenüber der Kombinationstherapie ( $0 \pm 0 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $69 \pm 20 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0,001$  ab Tag 41). Während durch die Kombinationstherapie lediglich eines von sieben Tieren tumorfrei wurde, zeigten alle sechs Tiere, die nur mit den EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen behandelt wurden, eine komplette Tumorabstossung. Die geheilten Tiere blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum von 56 Tagen tumorfrei. Zwischen den Gruppen, die mit PBS oder dem ER-Ep BiAk behandelt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $104 \pm 17 \text{ mm}^2$  im Vergleich zu  $119 \pm 31 \text{ mm}^2$ ,  $P > 0,05$  an Tag 35).



**Abbildung 13: *In vivo* Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus AZT transduzierter, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen und dem ER-Ep BiAk im Panc-OVA-Tumormodell.** Den Mäusen wurden subkutan  $10^6$  mEpCAM<sup>+</sup> Panc-OVA-Tumorzellen injiziert. Nachdem die Tumore angewachsen waren, wurden die Mäuse in Therapiegruppen randomisiert und erhielten am 5. Tag nach der Tumordinjektion entweder PBS i. v. ( $n = 6$ ),  $200 \mu\text{g}$  ER-Ep BiAk i. v. ( $n = 6$ ),  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen i. v. ( $n = 6$ ) oder  $10^7$  transduzierte, EGFRvIII<sup>+</sup> OT-I T-Zellen zusammen mit  $200 \mu\text{g}$  ER-Ep BiAk i. v. ( $n = 7$ ) (Behandlungszeitpunkt ist dargestellt als Pfeil). Dargestellt sind die Mittelwerte der TumorgroÙe in  $\text{mm}^2$ . Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *two-way* ANOVA Test mit Korrektur für multiples Testen mit der Bonferroni-Methode.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neue Format des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers (ER-Ep BiAk) in der Lage ist, EGFRvIII<sup>+</sup> T-Zellen an mEpCAM<sup>+</sup> Tumorzellen zu binden und in einer räumlichen Nähe zu halten. Allerdings führte die Kombination tumorspezifischer T-Zellen mit dem bispezifischen Antikörper (BiAk) nur zu einer gering gesteigerten Tumorzelllyse *in vitro*. Im Mausmodell zeigte die Kombinationstherapie aus T-Zell rekrutierendem BiAk und adoptivem Transfer tumorspezifischer T-Zellen einen therapeutischen Effekt auf das Wachstum von subkutan induzierten B16-Tumoren. Es stellte sich jedoch heraus, dass die anti-tumorale Wirksamkeit alleine durch den ER-Ep BiAk bedingt war. Der adoptive Transfer tumorspezifischer T-Zellen hatte keinen Einfluss auf das Tumorstadium im B16-Tumormodell. Auch nach immunsuppressiver Vorbehandlung führte die Kombinationstherapie zu keinem synergistischen Effekt auf das B16-Tumorstadium. In einem weiteren Tumormodell, dem murinen Pankreaskarzinommodell Panc02, konnte die Kombinationstherapie ebenfalls keinen Vorteil zeigen.

### 4.2 Zytotoxische Aktivität des anti-EGFRvIII x anti-mEPCAM bispezifischen Antikörpers *in vitro*

Der ER-Ep BiAk war in der Lage, gleichzeitig das mEpCAM der Tumorzellen und das EGFRvIII der T-Zellen zu binden und konnte dadurch EGFRvIII-positive T-Zellen und mEpCAM exprimierende Tumorzellen *in vitro* miteinander vernetzen. Im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen BiAk war der synergistische Effekt auf die Tumorzelllyse durch die Kombination mit dem ER-Ep BiAk nur gering und erst bei hohen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen zu beobachten. Die TriomAbs und vor allem die BiTE zeigten *in vitro* eine sehr hohe zytotoxische Aktivität (Chames und Baty 2009; Loffler et al. 2000; Mack et al. 1995; Zeidler et al. 1999).

Eine Erklärung für die geringere Effektivität *in vitro* liegt möglicherweise in der Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendeten BiAk. Die bisher in der Literatur beschriebenen BiTE und TriomAbs binden an CD3, welches von den T-Zellen exprimiert wird (Chames und Baty 2009). Nach Bindung an CD3 kommt es bei diesen Formaten von bispezifischen Antikörpern zu einer Aktivierung der T-Zellen, die unabhängig von weiteren kostimulatorischen Signalen ist (Loffler et al. 2000; Mack et al. 1995; Ruf und Lindhofer 2001; Zeidler et al. 1999). Allerdings ist, insbesondere bei den BiTE, die Wirkweise noch nicht vollständig geklärt (Chames und Baty 2009). Im

Gegensatz dazu bindet der in dieser Arbeit verwendete ER-Ep BiAk an ein inaktives Marker-Antigen (EGFRvIII) und löst dadurch keine Aktivierung der T-Zelle aus (Kobold et al. 2015). Die Hauptaufgabe des BiAk bei dem hier untersuchten Therapiekonzept ist es, eine räumliche Beziehung zwischen T-Zelle und Tumorzelle zu schaffen. Dies spielt jedoch *in vitro* nur eine untergeordnete Rolle. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt erst durch Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TZR) mit dem spezifischen Antigen im Bereich des Tumors.

Unsere Arbeitsgruppe benutzte in ihrer Vorstudie ebenfalls einen nicht-aktivierenden, T-Zell rekrutierenden BiAk (Kobold et al. 2015). Allerdings beobachteten sie durch Kombination des BiAk mit tumorspezifischen T-Zellen einen deutlichen Effekt auf die Lyse von mGC8 Tumorzellen *in vitro*. Die Arbeit von Kobold et al. unterscheidet sich allerdings in wesentlichen Punkten von der hier vorliegenden Arbeit. Zum einen wurde ein anderes T-Zellantigen, das *Simian virus 40* (SV40) T-Antigen (Tag), verwendet, zum anderen eine unterschiedliche Tumorentität. Die von Kobold et al. verwendete Tumorzelllinie mGC8 ist aus transgenen CEA424/SV40 T-Antigen Mäusen entstanden, welche spontan ein Adenokarzinom des Magens entwickeln (Nockel et al. 2006; Thompson et al. 2000). Die mGC8-Zelllinie exprimiert auf ihrer Zelloberfläche sowohl das TAA EpCAM als auch Tag über MHC Klasse-I-Moleküle, sodass diese durch Tag-spezifische, zytotoxische T-Zellen *in vitro* lysiert werden können (Nockel et al. 2006). Tumorspezifische T-Zellen wurden aus transgenen Mäusen gewonnen, deren TZR spezifisch für das immundominante Epitop I des SV40 Tag ist (Deckhut et al. 1992; Staveley-O'Carroll et al. 2003). Naturgemäß haben unterschiedliche TZR unterschiedliche Affinitäten und Funktionalitäten, was erklären kann, weshalb bestimmte Ansätze mit einem Rezeptor, jedoch nicht mit dem anderen funktionieren (Alexander-Miller et al. 1996; Dutoit et al. 2001; Kaluza et al. 2012; Zeh et al. 1999).

### **4.3 Adoptiver Transfer tumorspezifischer T-Zellen im B16-Tumormodell**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte der adoptive T-Zell-Transfer (AZT) von tumorspezifischen OT-I T-Zellen das Wachstum von subkutan induzierten B16-OVA-Tumoren nicht beeinflussen. Auch in anderen Studien konnte kein bzw. nur ein geringer therapeutischer Effekt durch den adoptiven Transfer tumorspezifischer T-Zellen bei B16-Tumoren beschrieben werden (Overwijk et al. 2003; Petersen et al. 2006). Eine anti-tumorale Wirksamkeit tumorspezifischer T-Zellen war abhängig von der Stimulation mit einem verwandten Antigen. Nur durch die Kombination tumorspezifischer T-Zellen mit einer Antigen-spezifischen Vakzinierung und dem

Wachstumsfaktor IL-2 kam es zur Rückbildung subkutaner B16-Tumoren (Gattinoni et al. 2005; Overwijk et al. 2003; Palmer et al. 2004).

Sowohl in präklinischen Studien als auch in klinischen Studien am Patienten konnte gezeigt werden, dass eine immunsuppressive, lymphodepletierende Vorbehandlung die Wirksamkeit des AZT deutlich erhöhen kann (Cheever et al. 1980; Dudley et al. 2002; Dudley et al. 2005; Gattinoni et al. 2006; North 1982). Eine Lymphopenie wurde entweder durch eine nicht-myeloablative Chemotherapie oder durch Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI) erreicht (Restifo et al. 2012). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie die Mäuse vor dem AZT mit 5 Gray (Gy) bestrahlt, um eine Lymphopenie zu induzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der adoptive Transfer von tumorspezifischen T-Zellen im B16-Tumormodell trotz der lymphodepletierenden Vorbehandlung keinen Effekt auf das Tumorwachstum hat. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Literatur. Kodumudi et al. haben ebenfalls beschrieben, dass der adoptive Transfer von tumorspezifischen OT-I T-Zellen nach Bestrahlung keine Wirkung bei B16-OVA-Tumoren zeigte. Erst durch eine weiterführende Therapie mit Docetaxel, die die Regeneration der MDSC unterdrückt, konnte die Wirksamkeit des AZT verbessert werden (Kodumudi et al. 2012).

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine lymphodepletierende Vorbehandlung mit 5 Gy TBI vor AZT nicht ausreichend ist, um einen Effekt auf das Tumorwachstum von B16-Tumoren zu erzielen (Wrzesinski et al. 2007; Wrzesinski et al. 2010). Eine Rückbildung der B16-Tumoren durch adoptive T-Zell-Therapie ist erst nach einer Hochdosis Bestrahlung mit 9 Gy verbunden mit einer Stammzelltransplantation beschrieben (Wrzesinski et al. 2007; Wrzesinski et al. 2010).

#### **4.4 Therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie in soliden Tumormodellen**

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus AZT tumorspezifischer T-Zellen und einem T-Zell-rekrutierenden BiAk bei soliden Tumoren zu untersuchen. Im B16-Tumormodell war die Kombinationstherapie auch nach immunsuppressiver Vorbehandlung nicht in der Lage, die Wirksamkeit des AZT zu steigern.

In einem weiteren Tumormodell, dem Panc02-Tumormodell, für das in der Literatur bereits die Wirksamkeit von adoptiv transferierten tumorspezifischen T-Zellen belegt ist (Chmielewski et al. 2012), kam es durch die Kombinationstherapie ebenfalls zu keinem additiven Effekt auf das Tumorwachstum. Im Gegenteil, die Kombinationstherapie war der Therapie mit tumorspezifischen T-Zellen alleine unterlegen. Die schlechtere Wirksamkeit der T-Zellen in Kombination mit dem ER-Ep BiAk lässt vermuten, dass es aufgrund des BiAk zu einer verminderten T-Zell-Infiltration in das Tumorgewebe kommt.

Kobold et al konnten hingegen zeigen, dass die Kombination eines nicht aktivierenden, T-Zell rekrutierenden bispezifischen Antikörpers mit adoptivem Transfer tumorspezifischer T-Zellen zu einem verlangsamten Tumorwachstum und in der Folge zu einem verlängerten Überleben in dem murinen Magenkarzinommodell mGC8 führt (Kobold et al. 2015). Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumorzelllinien Panc02 und B16 zeigt die Magenkarzinom-Zelllinie mGC8 langsamere Wachstumsraten mit Tumorgrößen von 50 mm<sup>2</sup> nach 40-50 Tagen (Corbett et al. 1984; Nockel et al. 2006). Die Tumorverdopplungszeit der mGC8 Tumorzellen beträgt 7,2 Tage verglichen mit 17,2 h bei den B16-Tumorzellen (Danciu et al. 2013; Nockel et al. 2006). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der Transfer naiver Milz-Zellen nach Lymphodepletion in Kombination mit GM-CSF und einer Tumorzell-Vakzinierung im mGC8 Tumormodell eine anti-tumorale Wirksamkeit besitzt (van den Engel et al. 2011). In einem dem mGC8 verwandten subkutanen, murinen Magenkarzinommodell konnte zudem gezeigt werden, dass der adoptive Transfer tumorreaktiver Milz-Zellen zu einem verlangsamten Tumorwachstum führt. Die in dieser Studie verwendete Tumorzelllinie mGC3 stammt, ebenso wie die mGC8 Zelllinie, von CEA424/SV40 T-Antigen Tumoren ab (Nockel et al. 2006). Die therapeutische Wirksamkeit korrelierte wie auch bei Kobold et al. mit einer vermehrten Infiltration CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorgewebe (Bourquin et al. 2010; Kobold et al. 2015; Leisegang et al. 2008).

#### **4.5 Anti-EpCAM gerichtete Antikörpertherapie bei soliden Tumoren**

In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass der ER-Ep BiAk bei subkutanen B16-Tumoren zu einem verzögerten Tumorwachstum führt. Der genaue Wirkmechanismus des BiAk ist bisher ungeklärt.

Anti-EpCAM-Antikörper gehörten zu den ersten monoklonalen Antikörpern, die für die Tumorbehandlung zugelassen wurden (Riethmuller et al. 1998; Sears et al. 1982).

Seitdem wurden in der Literatur verschiedene gegen EpCAM gerichtete Antikörper beschrieben (Munz et al. 2010). Adecatumomab (MT 201), ein humaner IgG1 anti-EpCAM monoklonaler Antikörper, konnte in präklinischen Studien eine starke anti-tumorale Wirksamkeit beim Kolon- und Mammakarzinom zeigen (Naundorf et al. 2002; Prang et al. 2005). Wie die meisten monoklonalen Antikörper vermittelt Adecatumomab seine anti-tumoralen Effekte durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) (Naundorf et al. 2002). Zudem konnten *in vivo* Studien zeigen, dass Adecatumomab durch Austausch des humanen Fcγ1-Teils gegen ein murines Fcγ2A-Teil und der damit verbundenen besseren Interaktion mit murinen Immunzellen eine starke anti-tumorale Aktivität im B16-Lungenmetastasenmodell hat (Lutterbuese et al. 2007). Diese Studien machen deutlich, dass solide Tumore, unter anderem auch das von uns verwendete B16-Tumormodell, prinzipiell einer gegen EpCAM gerichteten Antikörpertherapie zugänglich sind.

In der Literatur wurden auch anti-tumorale Effekte durch bispezifische Antikörper beschrieben, die mit einem Arm gegen EpCAM gerichtet sind. *In vivo* Studien zeigten, dass Catumaxomab, ein anti-EpCAM x anti-CD3 trifunktionaler Antikörper, alle Tiere nach intraperitonealer Injektion einer tödlichen Dosis EpCAM-positiver B16-Tumorzellen heilt. Die Therapie führte zur Induktion einer langanhaltenden Immunantwort, sodass alle Tiere bei erneuter Tumordinjektion die Tumore abgestoßen haben (Ruf und Lindhofer 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MT110, ein gegen humanes EPCAM und CD3 gerichteter BiTE, in immundefizienten Mäusen zur Eradikation von etablierten subkutanen Kolonkarzinomen führte (Brischwein et al. 2006; Schlereth et al. 2005). Auch für die murine Form des MT110, MuS110, konnte eine anti-tumorale Wirksamkeit beim Mamma- und Lungenkarzinom nachgewiesen werden (Amann et al. 2008). Schlereth et al. zeigten, dass es durch einen BiTE, der gegen EpCAM und murines CD3 gerichtet ist, zu einer Hemmung des Tumorwachstums von subkutanen EpCAM exprimierenden B16-Tumoren kommt (Schlereth et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten für den ER-Ep BiAk analoge Ergebnisse erzielt werden.

In den Panc02-Tumoren konnte der ER-Ep BiAk jedoch keine anti-tumoralen Effekte bewirken. Vor kurzem wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigen konnte, dass subkutane Panc02-Tumore auf monoklonale Antikörper und ADCC ansprechen (Doberstein et al. 2015). Zu einer gegen EpCAM gerichteten Antikörpertherapie beim Pankreaskarzinom existieren allerdings keine Studien.



Durch welchen Mechanismus der in dieser Arbeit verwendete ER-Ep BiAk seine anti-tumorale Wirkung im B16-Tumormodell vermittelt, soll im Folgenden diskutiert werden.

#### **4.6 ADCC als möglicher Wirkmechanismus des anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischen Antikörpers**

Monoklonale Antikörper vermitteln ihre anti-tumoralen Effekte unter anderem durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) (Weiner et al. 2010). An ADCC sind vor allem natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, dendritische Zellen (DC), sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten beteiligt. Diese Effektorzellen exprimieren einen Fc $\gamma$ -Rezeptor (Fc $\gamma$ R) mit dem sie den Fc-Teil des an die Tumorzellen gebundenen Antikörpers erkennen. Nach Bindung an die Fc-Domäne der Antikörper und Aktivierung kommt es zur Lyse der Tumorzellen.

Clynes et al. konnten zeigen, dass die Wirksamkeit von Rituximab und Trastuzumab in Fc $\gamma$ R-knockout-Mäusen vermindert ist (Clynes et al. 1998; Clynes et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fc-Fc $\gamma$ R-Interaktion und damit die ADCC für die therapeutische Wirksamkeit monoklonaler Antikörper essentiell ist. Die Bedeutung des Fc $\gamma$ R für die anti-tumorale Wirkung wird durch weitere Studien gestützt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen, welche zu einer höheren Affinität der aktivierenden Fc $\gamma$ RIII für die Antikörper führen, die therapeutische Wirksamkeit von Rituximab bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) verbessern (Cartron et al. 2002). Dieser Effekt konnte auch für Trastuzumab und Cetuximab gezeigt werden (Musolino et al. 2008; Weng und Levy 2003).

BiAk, die ein Fc-Teil besitzen, können über diesen neben T-Zellen auch akzessorische Immunzellen wie DC, NK-Zellen und Makrophagen rekrutieren (Zeidler et al. 2000; Zeidler et al. 1999). Dadurch sind solche BiAk in der Lage durch ADCC zusätzliche zytotoxische Effekte auf die Tumorzellen zu bewirken. Dieser Wirkmechanismus wurde in der Literatur für mehrere BiAk beschrieben (Chames und Baty 2009). Für Catumaxomab konnte gezeigt werden, dass er über seinen Fc-Teil fast ausschließlich an aktivierende Fc $\gamma$ R und nicht bzw. nur geringfügig an den inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb bindet (Zeidler et al. 2000). Diese Eigenschaft von Catumaxomab ist insofern interessant, da gezeigt werden konnte, dass es durch eine geringere Interaktion mit dem inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb zu einer verbesserten anti-tumoralen Wirksamkeit

monoklonaler Antikörper durch ADCC kommt (Clynes et al. 2000). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Antikörper in der Tumorthherapie vor allem an aktivierende Fc $\gamma$ R und nur sehr schwach an inhibitorische Fc $\gamma$ R binden sollten.

Der in dieser Arbeit verwendete BiAk basiert auf einem IgG-Grundgerüst und ist als ein asymmetrisches 2+1-Format aufgebaut. Dadurch besitzt der ER-Ep BiAk zwei Bindestellen für mEpCAM, eine Bindestelle für EGFRvIII sowie eine intakte Fc-Region. Durch den Fc-Teil ist der ER-Ep BiAk theoretisch in der Lage durch ADCC anti-tumorale Effekte zu vermitteln. In den Therapieversuchen zeigte sich, dass der ER-Ep BiAk alleine zu einer Verzögerung des Tumorwachstums bei subkutanen B16-Tumoren führt. Um zu untersuchen, ob auch hier ADCC eine Rolle spielt, wurden die Mäuse mit 5 Gy ganzkörperbestrahlt. Durch die Bestrahlung werden unter anderem die Fc $\gamma$ R-positiven Effektorzellen, welche ADCC vermitteln, depletiert. Nach der Bestrahlung war der therapeutische Effekt des ER-Ep BiAk komplett aufgehoben.

Wie oben bereits erwähnt ist CDC ein weiterer Wirkmechanismus therapeutischer Antikörper. Es konnte gezeigt werden, dass CDC einen wesentlichen Teil zur anti-tumoralen Wirkung von Rituximab beiträgt (Weiner 2010). Während die Depletion der Effektorzellen und die Therapie in bestrahlten Nacktmäusen keinen Einfluss auf die therapeutische Aktivität von Rituximab hatten, war die therapeutische Wirksamkeit in C1q-defizienten Mäusen bzw. nach Depletion der Komplementfaktoren komplett aufgehoben (Di Gaetano et al. 2003; Golay et al. 2006). Im Gegensatz dazu beobachteten wir in unseren Versuchen, dass nach Depletion der Effektorzellen durch 5 Gy TBI der therapeutische Effekt des ER-EP BiAk nicht mehr vorhanden war. Diese Ergebnisse unterstreichen unsere Hypothese, dass die anti-tumorale Wirkung des ER-Ep BiAk im B16-Melanommodell vor allem durch ADCC vermittelt wird und das CDC nur eine untergeordnete Rolle spielt.

#### **4.7 EpCAM als Zielantigen in der Immuntherapie**

Die Identifikation eines geeigneten Tumorantigens ist einer der wichtigsten Aspekte im Bereich der Tumormimmuntherapie (Restifo et al. 2012). Das optimale Zielantigen sollte ausschließlich auf Tumorzellen und nicht von gesunden Geweben exprimiert werden. Allerdings werden die meisten Antigene zwar verstärkt, jedoch nicht selektiv von Tumorzellen, sondern auch von gesunden Zellen exprimiert. Dies kann zu schweren Nebenwirkungen führen (Keefe 2002; Seidman et al. 2002).

Aufgrund seiner weit verbreiteten Expression in fast allen humanen Karzinomen ist das *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) ein interessantes Zielantigen für Tumormimmuntherapien. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass EpCAM in Adenokarzinomen des Kolons, Magens, Pankreas, Prostata, Mamma und der Lunge überexprimiert wird (Went et al. 2006; Went et al. 2004). Andere klinisch validierte Antikörperziele, wie zum Beispiel Her-2/neu und EGFR, werden nur zu einem geringen Prozentsatz von den Tumoren exprimiert. So sind zum Beispiel Mamma-Karzinome in nur etwa 15-30 % Her-2/neu positiv bzw. überexprimieren EGFR in nur 40 % der Fälle (Fox und Harris 1997; Pauletti et al. 2000). Deshalb profitiert nur ein Teil der Patienten von einer Antikörpertherapie. Im Gegensatz dazu wird EpCAM von bestimmten Tumoren wie dem Kolon-, Magen- oder Prostatakarzinom in annähernd 100 % exprimiert (Martin et al. 1999; Went et al. 2006). Auch auf Krebsstammzellen wurde eine EpCAM-Expression beobachtet (Al-Hajj et al. 2003; Maetzel et al. 2009; Ricci-Vitiani et al. 2007). Zunehmend wurde die Rolle von EpCAM in der Tumorgenese untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass EpCAM die Zellproliferation fördert (Maetzel et al. 2009; Munz et al. 2009; Munz et al. 2004). Die Inhibition der EpCAM-Expression mittels einer EpCAM-spezifischen antisense oder siRNA führte zu einer deutlichen Abnahme der Zellproliferation humaner Karzinomzellen (Munz et al. 2004; Osta et al. 2004). Eine EpCAM-Überexpression ist zudem mit einer schlechteren Prognose im Mamma- und Ovarialkarzinom assoziiert (Gastl et al. 2000; Spizzo et al. 2002; Spizzo et al. 2006; Spizzo et al. 2004).

Wie die meisten anderen tumorassoziierten Antigene wird EpCAM auch auf normalen Zellen exprimiert (Balzar et al. 1999). Physiologischerweise wird es auf der basolateralen Zellmembran von einschichtigem, mehrreihigen und Übergangsepithelien exprimiert und vermittelt die interzelluläre Zelladhäsion (Litvinov et al. 1994). Eine EpCAM-Expression wurde in Kolon, Dünndarm, Magen, Gallengängen, Pankreas, Mamma, Lunge, Niere und Prostata nachgewiesen (Gottlinger et al. 1986; Momburg et al. 1987).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Antikörper *in vivo* zwischen EpCAM auf Tumorzellen und normalen Zellen differenzieren können. In einer Studie mit EpCAM exprimierenden transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach intravenöser Injektion eines anti-EpCAM-Antikörpers dieser lediglich an EpCAM exprimierende Tumore und nicht an normales EpCAM-positives Gewebe bindet. Proben des gesunden Gewebes konnten jedoch *ex vivo* in immunhistochemischen Untersuchungen mit einem anti-EpCAM-Antikörper angefärbt werden (McLaughlin et

al. 2001). Man geht davon aus, dass EpCAM auf normalen Zellen aufgrund der *tight junctions* für Antikörper schwer erreichbar ist, wohingegen EpCAM im Tumorgewebe homogen auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert wird und dadurch für Antikörper gut zugänglich ist (Litvinov et al. 1994; McLaughlin et al. 2001).

Aufgrund der weitverbreiteten Expression bei humanen Karzinomen ist EpCAM Zielantigen für eine Vielzahl von immunotherapeutischen Ansätzen (Baeuerle und Gires 2007; Chaudry et al. 2007; Munz et al. 2010). Der erste monoklonale Antikörper der jemals in Tumorpatienten untersucht wurde, war der gegen EpCAM gerichtete Antikörper Edrecolomab (17-1A) (Sears et al. 1982; Sears et al. 1984). In einer ersten Studie bei chirurgisch resezierten kolorektalen Karzinomen (Stadium Dukes C) führte Edrecolomab zu einer verminderten Rezidivrate und verbesserten Überlebensrate (Riethmuller et al. 1998; Riethmuller et al. 1994). Große Studien konnten jedoch die klinische Wirksamkeit im adjuvanten Setting nicht bestätigen, sodass Edrecolomab schließlich seine Zulassung in Deutschland wieder verlor (Fields et al. 2009). In Phase-I-Studien wurden zwei weitere gegen EpCAM gerichtete monoklonale Antikörper (ING-1 und 3622W94) getestet. Hierbei kam es zum Auftreten akuter Pankreatitiden. Beide Antikörper besitzen eine hohe Affinität für EpCAM und verursachen durch die Bindung an EpCAM im gesunden Gewebe unerwünschte Toxizitäten (de Bono et al. 2004; Goel et al. 2007; Munz et al. 2010). Auf der anderen Seite zeigte Adecatumomab (MT201), ein humaner anti-EpCAM-Antikörper mit mittlerer Affinität, in Phase-I und Phase-II Studien eine therapeutische Wirksamkeit ohne Auftreten schwerer Nebenwirkungen (Ahmadzadeh et al. 2009; Naundorf et al. 2002; Oberneder et al. 2006; Schmidt et al. 2010).

Im Jahr 2009 wurde der anti-EpCAM trispezifische Antikörper Catumaxomab zur Therapie der Peritonealkarzinose EpCAM<sup>+</sup> Tumoren zugelassen. Um die Sicherheit und Verträglichkeit einer intravenösen Injektion zu testen, wurde eine Phase-I-Studie durchgeführt (Mau-Sorensen et al. 2015). Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Hepatoxizität, wobei der erste Patient bei einer Dosis von 10 µg Catumaxomab ein fulminantes akutes Leberversagen erlitt, was schließlich zur Beendigung der Studie führte (Mau-Sorensen et al. 2015). In der immunhistologischen Aufarbeitung stellte sich heraus, dass Catumaxomab durch die Bindung an den FcγR der Kupffer-Zellen unabhängig von der EpCAM-Expression der Hepatozyten die Toxizität vermittelte (Borlak et al. 2016). MT110 ist ein gegen EpCAM und CD3 gerichteter BiTE, der in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigte. MT110 wird derzeit in einer Phase-I-Studie zur Therapie solider Tumore untersucht. In den ersten

veröffentlichten Ergebnissen kam es auch bei MT110 zu schweren dosislimitierenden Nebenwirkungen wie Leberwerterhöhungen und Diarrhoe (Fiedler et al. 2012).

Die in den verschiedenen klinischen Studien beobachtete schlechte Verträglichkeit sowie die zum Teil fehlende Wirksamkeit einer gegen EpCAM gerichteten Therapie verdeutlichen die Notwendigkeit, nach alternativen Tumorantigenen zu suchen.

#### 4.8 Ausblick

Die Kombination von Marker-Antigen-transduzierten, tumorspezifischen T-Zellen mit einem T-Zell-rekrutierenden BiAk führte in den untersuchten Tumormodellen zu keiner gesteigerten Wirksamkeit des AZT. Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, dass eine reine Rekrutierung der T-Zellen an den Tumor nicht ausreicht, um die Wirksamkeit des AZT zu steigern. Das immunsuppressive Milieu im Bereich des Tumors scheint durch Hemmung der T-Zellen eine entscheidende Rolle beim Versagen T-Zell-basierter Therapien zu spielen (Abate-Daga et al. 2013; Scarfo und Maus 2017). Ein möglicher Ansatz zur Steigerung der Wirksamkeit könnte somit in der Optimierung der T-Zell-Aktivierung liegen.

Eine Weiterentwicklung des in dieser Arbeit untersuchten Therapiekonzeptes – die trunkierte Version des Marker-Proteins durch einen *chimeric antigen receptor* (CAR) mit einer aktivierenden intrazellulären Domäne als Bindestelle für den rekrutierenden BiAk zu ersetzen – würde diesen Ansatz verfolgen. Die Bindung des BiAk an den CAR würde in diesem Fall zu einer spezifischen Aktivierung der tumorspezifischen T-Zellen führen. Der Vorteil wäre die Beibehaltung der selektiven Rekrutierung mit zusätzlicher Aktivierung der transduzierten, tumorspezifischen T-Zellen, ohne einen Einfluss auf die Sicherheit dieser Therapie zu nehmen.

Ein weiterer Angriffspunkt zur Optimierung der T-Zell-Aktivierung könnten inhibitorische Rezeptoren wie beispielsweise das *programmed cell death protein 1* (PD-1) darstellen. Durch Interaktion von PD-1 mit seinem Liganden PDL-1 kommt es zur Hemmung der TZR-Signalkaskade und damit der T-Zell-Aktivierung (Yokosuka et al. 2012). Dieser Mechanismus konnte durch eine verbesserte anti-tumorale Wirksamkeit des AZT in Kombination mit einem anti-PD-1-Antikörper belegt werden (John et al. 2013). Die systemische Applikation von anti-PD-1-Antikörpern in Kombination mit AZT birgt jedoch durch unselektive T-Zell-Aktivierung die Gefahr der Potenzierung der Nebenwirkungen der jeweiligen Therapien. Um den Effekt der PD-1-Blockade auf tumorreaktive T-Zellen

zu begrenzen, hat unsere Arbeitsgruppe einen Fusionsrezeptor aus PD-1 und CD28 entwickelt, welcher das inhibitorische in ein kostimulatorisches Signal umwandelt und so eine verbesserte T-Zell-Aktivierung bewirkt. In einer *proof of concept*-Studie zeigten die Fusionsrezeptor-transduzierten T-Zellen eine gesteigerte anti-tumorale Wirksamkeit (Kobold et al. 2015).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit gemeinsam mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass künftige Ansätze zur Optimierung des AZT nicht nur die Rekrutierung der T-Zellen zum Tumor, sondern auch die Verbesserung der T-Zell-Aktivierung adressieren sollten.

## 5. Zusammenfassung

Adoptiver T-Zell-Transfer (AZT) ist ein vielversprechender Ansatz in der Tumorimmuntherapie. Seine Wirksamkeit ist durch eine geringe T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe limitiert. Unsere Arbeitsgruppe hat ein neuartiges Therapiekonzept zur Verbesserung der Wirksamkeit des AZT und Minimierung der Nebenwirkungen entwickelt. Durch Kombination Marker-Antigen-transduzierter, tumorspezifischer T-Zellen mit einem bispezifischen Antikörper, der spezifisch die transduzierten, tumorspezifischen T-Zellen bindet, soll die Rekrutierung der T-Zellen an den Tumor verbessert werden. Wir konnten bereits zeigen, dass die Kombinationstherapie zu einem verzögerten Tumorwachstum und einem verlängerten Überleben in einem murinen Magenkarzinommodell führt. Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit dieser Kombinationstherapie in weiteren soliden Tumoren zu überprüfen.

Für diese Arbeit wurden mittels retroviraler Transduktion mEpCAM exprimierende B16- und Panc02-Tumorzelllinien generiert. Primäre T-Zellen wurden mit einer inaktiven, trunkierten Version des EGFRvIII transduziert. Der verwendete anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifische Antikörper (ER-Ep BiAk) konnte spezifisch EGFRvIII-positive T-Zellen an mEpCAM-positive Tumorzellen zurückhalten. Diese Kombination führte *in vitro* nur zu einem gering gesteigerten zytotoxischen Potential. Dies lässt sich durch den Wirkmechanismus des verwendeten bispezifischen Antikörpers erklären, der durch Bindung an sein Antigen keine Aktivierung der T-Zelle auslöst. Die therapeutische Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus EGFRvIII<sup>+</sup>, tumorspezifischen T-Zellen und dem ER-Ep BiAk wurde *in vivo* in zwei verschiedenen Tumormodellen untersucht. Bei subkutanen B16-Tumoren führte sie zu einer Verzögerung des Tumorwachstums. Dieser Effekt beruhte auf dem ER-Ep BiAk, dessen anti-tumorale Wirksamkeit am ehesten durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) vermittelt wird. Im murinen Pankreaskarzinom-Modell Panc-OVA war die Kombinationstherapie der Wirksamkeit der tumorspezifischen T-Zellen alleine unterlegen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Kombination des adoptiven Transfers tumorspezifischer T-Zellen mit einem T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörper weder in einem murinen Melanommodell noch in einem murinen Pankreaskarzinommodell die anti-tumorale Wirksamkeit des AZT verbessern. In darauf aufbauenden Projekten der Arbeitsgruppe wurde daher das Therapiekonzept umgestellt und T-Zellen mit einem durch bispezifische Antikörper aktivierbaren Rezeptor transduziert.

## 6. Literaturverzeichnis

Abate-Daga D, Hanada K, Davis JL, Yang JC, Rosenberg SA, Morgan RA. Expression profiling of TCR-engineered T cells demonstrates overexpression of multiple inhibitory receptors in persisting lymphocytes.

*Blood* 2013; 122:1399-1410.

Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.

*Blood* 2009; 114:1537-1544.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:3983-3988.

Alexander RB, Rosenberg SA. Long-term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice.

*Journal of Immunology* 1990; 145:1615-1620.

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:4102-4107.

Amann M, Brischwein K, Lutterbuese P, Parr L, Petersen L, Lorenczewski G, Krinner E, Bruckmeier S, Lippold S, Kischel R, Lutterbuese R, Kufer P, Baeuerle PA, Schlereth B. Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3.

*Cancer Research* 2008; 68:143-151.

Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer.

*British Journal of Cancer* 2007; 96:417-423.

Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy.

*Cancer Research* 2009; 69:4941-4944.

Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N, Speiser DE. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients.

*Journal of Clinical Investigation* 2011; 121:2350-2360.

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (EpCAM).

*J Mol Med (Berl)* 1999; 77:699-712.

Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmuller G, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kufer P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.

*Science* 2008; 321:974-977.



Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, Levy D, Kubi A, Hovav E, Chermoshniuk N, Shalmon B, Hardan I, Catane R, Markel G, Apter S, Ben-Nun A, Kuchuk I, Shimoni A, Nagler A, Schachter J. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients.  
*Clinical Cancer Research* 2010; 16:2646-2655.

Bird RE, Walker BW. Single chain antibody variable regions.  
*Trends in Biotechnology* 1991; 9:132-137.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL.  
*Immunity* 1995; 3:87-98.

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma.  
*Annual Review of Immunology* 2006; 24:175-208.

Borlak J, Langer F, Spanel R, Schondorfer G, Dittrich C. Immune-mediated liver injury of the cancer therapeutic antibody catumaxomab targeting EpCAM, CD3 and Fcγ receptors.  
*Oncotarget* 2016; 7:28059-28074.

Bourquin C, von der Borch P, Zoglmeier C, Anz D, Sandholzer N, Suhartha N, Wurzenberger C, Denzel A, Kammerer R, Zimmermann W, Endres S. Efficient eradication of subcutaneous but not of autochthonous gastric tumors by adoptive T cell transfer in an SV40 T antigen mouse model.  
*Journal of Immunology* 2010; 185:2580-2588.

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.  
*Molecular Therapy* 2010; 18:666-668.

Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias.  
*Blood* 2011; 118:4817-4828.

Brischwein K, Parr L, Pflanz S, Volkland J, Lumsden J, Klinger M, Locher M, Hammond SA, Kiener P, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA. Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class.  
*Journal of Immunotherapy* 2007; 30:798-807.

Brischwein K, Schlereth B, Guller B, Steiger C, Wolf A, Lutterbuese R, Offner S, Locher M, Urbig T, Raum T, Kleindienst P, Wimberger P, Kimmig R, Fichtner I, Kufer P, Hofmeister R, da Silva AJ, Baeuerle PA. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors.  
*Molecular Immunology* 2006; 43:1129-1143.

- Buhmann R, Simoes B, Stanglmaier M, Yang T, Faltin M, Bund D, Lindhofer H, Kolb HJ. Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion.  
*Bone Marrow Transplantation* 2009; 43:383-397.
- Burges A, Wimberger P, Kumper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jager M, Strohle MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study.  
*Clinical Cancer Research* 2007; 13:3899-3905.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene.  
*Blood* 2002; 99:754-758.
- Castoldi R, Ecker V, Wiehle L, Majety M, Busl-Schuller R, Asmussen M, Nopora A, Jucknischke U, Osl F, Kobold S, Scheuer W, Venturi M, Klein C, Niederfellner G, Sustmann C. A novel bispecific EGFR/Met antibody blocks tumor-promoting phenotypic effects induced by resistance to EGFR inhibition and has potent antitumor activity.  
*Oncogene* 2013; 32:5593-5601.
- Chames P, Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?  
*MAbs* 2009; 1:539-547.
- Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.  
*British Journal of Pharmacology* 2009; 157:220-233.
- Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC. EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges.  
*British Journal of Cancer* 2007; 96:1013-1019.
- Cheever MA, Greenberg PD, Fefer A. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors.  
*Journal of Immunology* 1980; 125:711-714.
- Chelius D, Ruf P, Gruber P, Ploscher M, Liedtke R, Gansberger E, Hess J, Wasiliu M, Lindhofer H. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab.  
*MAbs* 2010; 2:309-319.
- Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma.  
*New England Journal of Medicine* 2008; 359:613-626.
- Chmielewski M, Hahn O, Rappl G, Nowak M, Schmidt-Wolf IH, Hombach AA, Abken H. T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice.  
*Gastroenterology* 2012; 143:1095-1107.e1092.

- Clark M, Gilliland L, Waldmann H. Hybrid antibodies for therapy. *Progress in Allergy* 1988; 45:31-49.
- Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95:652-656.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 2000; 6:443-446.
- Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, Jr., Schabel FM, Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Research* 1984; 44:717-726.
- Curnow RT. Clinical experience with CD64-directed immunotherapy. An overview. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1997; 45:210-215.
- Danciu C, Falamas A, Dehelean C, Soica C, Radeke H, Barbu-Tudoran L, Bojin F, Pinzaru SC, Munteanu MF. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell International* 2013; 13:75.
- Daniel PT, Kroidl A, Kopp J, Sturm I, Moldenhauer G, Dorken B, Pezzutto A. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* 1998; 92:4750-4757.
- de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF. ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:7555-7565.
- Deckhut AM, Lippolis JD, Tevethia SS. Comparative analysis of core amino acid residues of H-2D(b)-restricted cytotoxic T-lymphocyte recognition epitopes in simian virus 40 T antigen. *Journal of Virology* 1992; 66:440-447.
- Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Introna M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of Immunology* 2003; 171:1581-1587.
- Doberstein K, Harter PN, Haberkorn U, Bretz NP, Arnold B, Carretero R, Moldenhauer G, Mittelbronn M, Altevogt P. Antibody therapy to human L1CAM in a transgenic mouse model blocks local tumor growth but induces EMT. *International Journal of Cancer* 2015; 136:E326-339.
- Dreier T, Baeuerle PA, Fichtner I, Grun M, Schlereth B, Lorenczewski G, Kufer P, Lutterbuse R, Riethmuller G, Gyorstrup P, Bargou RC. T cell costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct. *Journal of Immunology* 2003; 170:4397-4402.

Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, Hanakam F, Kufer P, Riethmuller G, Bargou R, Baeuerle PA. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody.

*International Journal of Cancer* 2002; 100:690-697.

Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Billaudel S, Labarriere N, Jotereau F. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2002; 51:539-546.

Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer.

*Nature Reviews: Cancer* 2003; 3:666-675.

Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Sherry R, Leitman SF, Rosenberg SA. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma.

*Journal of Immunotherapy* 2001; 24:363-373.

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.

*Science* 2002; 298:850-854.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry RM, Marincola FM, Leitman SF, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Nahvi A, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma.

*Journal of Immunotherapy* 2002; 25:243-251.

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma.

*Journal of Clinical Oncology* 2005; 23:2346-2357.

Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens.

*Journal of Clinical Oncology* 2008; 26:5233-5239.

Dutoit V, Rubio-Godoy V, Dietrich PY, Quiqueres AL, Schnuriger V, Rimoldi D, Lienard D, Speiser D, Guillaume P, Batard P, Cerottini JC, Romero P, Valmori D.

Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity.

*Cancer Research* 2001; 61:5850-5856.

- Eissler N, Mysliwietz J, Deppisch N, Ruf P, Lindhofer H, Mocikat R. Potential of the trifunctional bispecific antibody surek depends on dendritic cells: rationale for a new approach of tumor immunotherapy.  
*Molecular Medicine* 2013; 19:54-61.
- Fiedler WM, Wolf M, Kebenko M, Goebeler M-E, Ritter B, Quaas A, Vieser E, Hijazi Y, Patzak I, Friedrich M, Kufer P, Frankel S, Seggewiss-Bernhardt R, Kaubitzsch S. A phase I study of EpCAM/CD3-bispecific antibody (MT110) in patients with advanced solid tumors.  
*Journal of Clinical Oncology* 2012; 30:suppl; abstr 2504.
- Fields AL, Keller A, Schwartzberg L, Bernard S, Kardinal C, Cohen A, Schulz J, Eisenberg P, Forster J, Wissel P. Adjuvant therapy with the monoclonal antibody Edrecolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve overall survival of patients with stage III colon cancer.  
*Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:1941-1947.
- Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, Steinberg GD, Belldegrun AS. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma.  
*Journal of Clinical Oncology* 1999; 17:2521-2529.
- Fox SB, Harris AL. The epidermal growth factor receptor in breast cancer.  
*Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1997; 2:131-141.
- Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered.  
*FEBS Journal* 2013; 280:5350-5370.
- Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.  
*Lancet* 2000; 356:1981-1982.
- Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA, Restifo NP. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells.  
*Journal of Experimental Medicine* 2005; 202:907-912.
- Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success.  
*Nature Reviews: Immunology* 2006; 6:383-393.
- Goel S, Bauer RJ, Desai K, Bulgaru A, Iqbal T, Strachan BK, Kim G, Kaubisch A, Vanhove GF, Goldberg G, Mani S. Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ING-1, a human engineered monoclonal antibody targeting human EpCAM, in patients with advanced solid tumors.  
*Annals of Oncology* 2007; 18:1704-1707.
- Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Manganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Rooijen N, Vago L, Introna M. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes.  
*Haematologica* 2006; 91:176-183.

- Gottlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmuller G. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *International Journal of Cancer* 1986; 38:47-53.
- Hartmann F, Renner C, Jung W, da Costa L, Tembrink S, Held G, Sek A, König J, Bauer S, Kloft M, Pfreundschuh M. Anti-CD16/CD30 bispecific antibody treatment for Hodgkin's disease: role of infusion schedule and costimulation with cytokines. *Clinical Cancer Research* 2001; 7:1873-1881.
- Hartmann F, Renner C, Jung W, Deisting C, Juwana M, Eichentopf B, Kloft M, Pfreundschuh M. Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood* 1997; 89:2042-2047.
- Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *International Journal of Cancer* 2010; 127:2209-2221.
- 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, Urban WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 2010; 363:711-723.
- Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, Brandl C, Crommer S, Bargou R, Itin C, Prang N, Baeuerle PA. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *International Journal of Cancer* 2005; 115:98-104.
- Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. Pillars article: T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*. 1994. 76: 17-27. *Journal of Immunology* 2012; 188:2046-2056.
- Holzinger A, Barden M, Abken H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2016.
- Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine* 2007; 357:39-51.
- Itzhaki O, Hovav E, Ziporen Y, Levy D, Kubi A, Zikich D, Hershkovitz L, Treves AJ, Shalmon B, Zippel D, Markel G, Shapira-Frommer R, Schachter J, Besser MJ. Establishment and large-scale expansion of minimally cultured "young" tumor infiltrating lymphocytes for adoptive transfer therapy. *Journal of Immunotherapy* 2011; 34:212-220.

John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, Chow MT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells.  
*Clinical Cancer Research* 2013; 19:5636-5646.

June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic.  
*Journal of Clinical Investigation* 2007; 117:1466-1476.

Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology.  
*Immunity* 2013; 39:49-60.

Kaluza KM, Kottke T, Diaz RM, Rommelfanger D, Thompson J, Vile R. Adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes targeting two different antigens limits antigen loss and tumor escape.  
*Human Gene Therapy* 2012; 23:1054-1064.

Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity.  
*Cancer* 2002; 95:1592-1600.

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. Impact of a New Fusion Receptor on PD-1-Mediated Immunosuppression in Adoptive T Cell Therapy.  
*Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107.

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. Selective bispecific T cell recruiting antibody and antitumor activity of adoptive T cell transfer.  
*Journal of the National Cancer Institute* 2015; 107:364.

Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan DA, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.  
*Journal of Clinical Oncology* 2015; 33:540-549.

Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Chimeric antigen receptor-modified T cells in CLL.  
*New England Journal of Medicine* 2011; 365:1937-1938; author reply 1938.

Kodumudi KN, Weber A, Sarnaik AA, Pilon-Thomas S. Blockade of myeloid-derived suppressor cells after induction of lymphopenia improves adoptive T cell therapy in a murine model of melanoma.  
*Journal of Immunology* 2012; 189:5147-5154.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.  
*Nature* 1975; 256:495-497.

Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, Gratama JW, Stoter G, Oosterwijk E. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience.  
*Journal of Clinical Oncology* 2006; 24:e20-22.

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

*J Mol Med (Berl)* 2008; 86:573-583.

Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies.

*Journal of Immunology* 1995; 155:219-225.

Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion.

*Cell Adhesion and Communication* 1994; 2:417-428.

Loffler A, Kufer P, Lutterbuse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmuller G, Dorken B, Bargou RC. 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.

Lutterbuse P, Brischwein K, Hofmeister R, Crommer S, Lorenczewski G, Petersen L, Lippold S, da Silva A, Locher M, Baeuerle PA, Schlereth B. Exchanging human Fc $\gamma$ 1 with murine Fc $\gamma$ 2a highly potentiates anti-tumor activity of anti-EpCAM antibody adecatumumab in a syngeneic mouse lung metastasis model.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007; 56:459-468.

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

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92:7021-7025.

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM.

*Nature Cell Biology* 2009; 11:162-171.

Martin IG, Cutts SG, Birbeck K, Gray S, Quirke P. Expression of the 17-1A antigen in gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinomas: a potential immunotherapeutic target?

*Journal of Clinical Pathology* 1999; 52:701-704.

Mau-Sorensen M, Dittrich C, Dienstmann R, Lassen U, Buchler W, Martinius H, Tabernero J. A phase I trial of intravenous catumaxomab: a bispecific monoclonal antibody targeting EpCAM and the T cell coreceptor CD3.

*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2015; 75:1065-1073.

Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.

*New England Journal of Medicine* 2014; 371:1507-1517.

McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.

*Journal of Clinical Oncology* 1998; 16:2825-2833.



McLaughlin PM, Harmsen MC, Dokter WH, Kroesen BJ, van der Molen H, Brinker MG, Hollema H, Ruiters MH, Buys CH, de Leij LF. The epithelial glycoprotein 2 (EGP-2) promoter-driven epithelial-specific expression of EGP-2 in transgenic mice: a new model to study carcinoma-directed immunotherapy.

*Cancer Research* 2001; 61:4105-4111.

Milstein C, Cuello AC. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry.

*Nature* 1983; 305:537-540.

Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.

*Cancer Research* 1987; 47:2883-2891.

Morgan RA, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy: genetic modification to redirect effector cell specificity.

*Cancer Journal* 2010; 16:336-341.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. 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, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.

*Molecular Therapy* 2010; 18:843-851.

Mullard A. FDA approves first CAR T therapy.

*Nature Reviews Drug Discovery* 2017; 16:669.

Muller D, Kontermann RE. Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy.

*Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2007; 9:319-326.

Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling.

*Cancer Research* 2009; 69:5627-5629.

Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.

*Oncogene* 2004; 23:5748-5758.

Munz M, Murr A, Kvesic M, Rau D, Mangold S, Pflanz S, Lumsden J, Volkland J, Fagerberg J, Riethmuller G, Ruttiger D, Kufer P, Baeuerle PA, Raum T. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies.

*Cancer Cell International* 2010; 10:44.

Murphy KM, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. London ; New York: Garland Science; 2012.

Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer.

*Journal of Clinical Oncology* 2008; 26:1789-1796.

Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmuller G, Baeuerle PA, Dreier T. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment. *International Journal of Cancer* 2002; 100:101-110.

Nockel J, van den Engel NK, Winter H, Hatz RA, Zimmermann W, Kammerer R. Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene. *BMC Cancer* 2006; 6:57.

North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1982; 155:1063-1074.

Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, Quadt C, Kirchinger P, Raum T, Locher M, Prang N, Baeuerle PA, Leo E. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *European Journal of Cancer* 2006; 42:2530-2538.

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. *Molecular Immunology* 2006; 43:763-771.

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Research* 2004; 64:5818-5824.

Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Antony PA, Spiess PJ, Palmer DC, Heimann DM, Klebanoff CA, Yu Z, Hwang LN, Feigenbaum L, Kruisbeek AM, Rosenberg SA, Restifo NP. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198:569-580.

Palmer DC, Balasubramaniam S, Hanada K, Wrzesinski C, Yu Z, Farid S, Theoret MR, Hwang LN, Klebanoff CA, Gattinoni L, Goldstein AL, Yang JC, Restifo NP. Vaccine-stimulated, adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells traffic indiscriminately and ubiquitously while mediating specific tumor destruction. *Journal of Immunology* 2004; 173:7209-7216.

Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18:3651-3664.

Petersen CC, Petersen MS, Agger R, Hokland ME. Accumulation in tumor tissue of adoptively transferred T cells: A comparison between intravenous and intraperitoneal injection. *Journal of Immunotherapy* 2006; 29:241-249.

Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.

*New England Journal of Medicine* 2011; 365:725-733.

Prang N, Preithner S, Brischwein K, Goster P, Woppel A, Muller J, Steiger C, Peters M, Baeuerle PA, da Silva AJ. Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines.

*British Journal of Cancer* 2005; 92:342-349.

Pullarkat V, Deo Y, Link J, Spears L, Marty V, Curnow R, Groshen S, Gee C, Weber JS. A phase I study of a HER2/neu bispecific antibody with granulocyte-colony-stimulating factor in patients with metastatic breast cancer that overexpresses HER2/neu.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 1999; 48:9-21.

Repp R, van Ojik HH, Valerius T, Groenewegen G, Wieland G, Oetzel C, Stockmeyer B, Becker W, Eisenhut M, Steininger H, Deo YM, Blijham GH, Kalden JR, van de Winkel JG, Gramatzki M. Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-FcγRI x anti-HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer.

*British Journal of Cancer* 2003; 89:2234-2243.

Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.

*Nature Reviews: Immunology* 2012; 12:269-281.

Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy.

*Journal of the National Cancer Institute* 1996; 88:100-108.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.

*Nature* 2007; 445:111-115.

Riechelmann H, Wiesneth M, Schauwecker P, Reinhardt P, Gronau S, Schmitt A, Schroen C, Atz J, Schmitt M. Adoptive therapy of head and neck squamous cell carcinoma with antibody coated immune cells: a pilot clinical trial.

*Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007; 56:1397-1406.

Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmaier R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.

*Journal of Clinical Oncology* 1998; 16:1788-1794.

Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmaier R, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group.

*Lancet* 1994; 343:1177-1183.

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. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29:917-924.

Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. 2015.

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411:380-384.

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2011; 17:4550-4557.

Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *Journal of the National Cancer Institute* 1994; 86:1159-1166.

Ruf P, Lindhofer H. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 2001; 98:2526-2534.

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

Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2017; 5:28.

Schaefer W, Regula JT, Bahner M, Schanzer J, Croasdale R, Durr H, Gassner C, Georges G, Kettenberger H, Imhof-Jung S, Schwaiger M, Stubenrauch KG, Sustmann C, Thomas M, Scheuer W, Klein C. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108:11187-11192.

Schlereth B, Fichtner I, Lorenczewski G, Kleindienst P, Brischwein K, da Silva A, Kufer P, Lutterbuese R, Junghahn I, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Baeuerle PA. Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Research* 2005; 65:2882-2889.

Schlereth B, Kleindienst P, Fichtner I, Lorenczewski G, Brischwein K, Lippold S, da Silva A, Locher M, Kischel R, Lutterbuse R, Kufer P, Baeuerle PA. Potent inhibition of local and disseminated tumor growth in immunocompetent mouse models by a bispecific antibody construct specific for Murine CD3. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2006; 55:785-796.

- Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C, Obrist P, Marschner N, Dirix L, Schmidt M, Ruttinger D, Schuler M, Reinhardt C, Awada A. An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* 2010; 21:275-282.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-1570.
- Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity* 2012; 12:14.
- Sears HF, Atkinson B, Mattis J, Ernst C, Herlyn D, Steplewski Z, Hayry P, Koprowski H. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet* 1982; 1:762-765.
- Sears HF, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H. Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma. *Journal of Biological Response Modifiers* 1984; 3:138-150.
- Sebastian M, Passlick B, Friccius-Quecke H, Jager M, Lindhofer H, Kannies F, Wiewrodt R, Thiel E, Buhl R, Schmittel A. Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007; 56:1637-1644.
- Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20:1215-1221.
- Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36:458-467.
- Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theurl I, Dunser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G. Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *International Journal of Cancer* 2002; 98:883-888.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, Mueller-Holzner E, Marth C, Gastl G, Zeimet AG. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2006; 103:483-488.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Kochli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2004; 86:207-213.
- Staveley-O'Carroll K, Schell TD, Jimenez M, Mylin LM, Tevethia MJ, Schoenberger SP, Tevethia SS. In vivo ligation of CD40 enhances priming against the endogenous tumor antigen and promotes CD8+ T cell effector function in SV40 T antigen transgenic mice. *Journal of Immunology* 2003; 171:697-707.

Thompson J, Epting T, Schwarzkopf G, Singhofen A, Eades-Perner AM, van Der Putten H, Zimmermann W. A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy.

*International Journal of Cancer* 2000; 86:863-869.

Topp MS, Kufer P, Gokbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, Horst HA, Raff T, Viardot A, Schmid M, Stelljes M, Schaich M, Degenhard E, Kohne-Volland R, Bruggemann M, Ottmann O, Pfeifer H, Burmeister T, Nagorsen D, Schmidt M, Lutterbuese R, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kneba M, Einsele H, Riethmuller G, Hoelzer D, Zugmaier G, Bargou RC. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival.

*Journal of Clinical Oncology* 2011; 29:2493-2498.

Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.

*New England Journal of Medicine* 2009; 360:1408-1417.

van den Engel NK, Ruttinger D, Rusan M, Kammerer R, Zimmermann W, Hatz RA, Winter H. Combination immunotherapy and active-specific tumor cell vaccination augments anti-cancer immunity in a mouse model of gastric cancer.

*Journal of Translational Medicine* 2011; 9:140.

Vitale M, Pelusi G, Taroni B, Gobbi G, Micheloni C, Rezzani R, Donato F, Wang X, Ferrone S. HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage.

*Clinical Cancer Research* 2005; 11:67-72.

Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action.

*Seminars in Hematology* 2010; 47:115-123.

Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.

*Nature Reviews: Immunology* 2010; 10:317-327.

Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma.

*Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:3940-3947.

Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers.

*British Journal of Cancer* 2006; 94:128-135.

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas.

*Human Pathology* 2004; 35:122-128.

Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, Palmer DC, Kaiser A, Yu Z, Rosenberg SA, Restifo NP. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells.

*Journal of Clinical Investigation* 2007; 117:492-501.

Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, Yu Z, Rosenberg SA, Restifo NP. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *Journal of Immunotherapy* 2010; 33:1-7.

Ya Z, Hailemichael Y, Overwijk W, Restifo NP. Mouse model for pre-clinical study of human cancer immunotherapy. *Current Protocols in Immunology* 2015; 108:20.21.21-43.

Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:16168-16173.

Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *Journal of Experimental Medicine* 2012; 209:1201-1217.

Zeh HJ, 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *Journal of Immunology* 1999; 162:989-994.

Zeidler R, Mysliwietz J, Csanady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, Wollenberg B, Lindhofer H. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *British Journal of Cancer* 2000; 83:261-266.

Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *Journal of Immunology* 1999; 163:1246-1252.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity;</i> Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AZT	Adoptiver T-Zell-Transfer
BiAk	Bispezifischer Antikörper
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity;</i> Komplementvermittelte Zytotoxizität
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	Dendritische Zelle
E:Z-Verhältnis	Effektor- zu Zielzell-Verhältnis
EGFR	Humaner <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	Humaner <i>epidermal growth factor receptor</i> Variante 3
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER-Ep BiAk	Anti-EGFRvIII x anti-mEpCAM bispezifischer Antikörper
Fab	<i>Fragment antigen binding;</i> Antigen-bindendes Fragment
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting;</i> Durchflusszytometrie
FBS	Fetales Kälberserum
Fc	<i>Fragment crystallizable;</i> kristallisierbares Fragment
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gy	Gray
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
Her-2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
IL-15	Interleukin-15
LDH	Laktatdehydrogenase
M	mol/L; Molar
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>



---

mEpCAM	<i>Murines epithelial cell adhesion molecule</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex;</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunden
scFv	<i>Single-chain variable fragment;</i> Einzelketten-Fragmente der variablen Region
SEM	<i>Standard error of the mean;</i> Standardfehler des Mittelwertes
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TBI	<i>Total body irradiation;</i> Ganzkörperbestrahlung
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Treg	Regulatorische T-Zellen
TriomAb	Trifunktionaler Antikörper
TZR	T-Zell-Rezeptor
WT	Wildtyp

## 8. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Stefan Endres, für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung für Klinische Pharmakologie anzufertigen, ganz herzlich bedanken. Auch für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die weiterführenden Gespräche und seine persönliche Förderung und Unterstützung auch über die Promotion hinaus bedanke ich mich sehr. Zudem möchte ich mich für die Aufnahme in das DFG-Graduiertenkolleg 1202 bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Sebastian Kobold für die Überlassung des interessanten Themas, sein persönliches Interesse am Fortschritt dieses Projektes und die stetig neuen Anregungen und Vorschläge. Sein Engagement für die Forschung und die Leitung der Arbeitsgruppe sind einzigartig.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Jan C. Schmollinger für seine Geduld beim Erlernen zahlreicher Methoden, die kritische Auseinandersetzung mit der Thematik und seine Unterstützung während meiner gesamten Zeit im Labor.

Des Weiteren bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern bei der Firma Roche - Dr. Claudio Sustmann, Dr. Gerhard Niederfellner und Dr. Christian Klein - für die Bereitstellung des Antikörpers und für eine produktive Zusammenarbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei dem gesamten Team der Klinischen Pharmakologie für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, die Schaffung einer produktiven, aber dennoch sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre und die konstruktiven Gespräche während der Lab-Meetings. Herrn Michael Chaloupka und allen weiteren Doktoranden meines Jahrgangs danke ich für die gegenseitige moralische Unterstützung und die Unterhaltungen auch über nicht-forschungsrelevante Themen.

Schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich mein ganzes Leben lang unterstützt, immer an mich geglaubt und mir mein Studium und meine Auslandsaufenthalte ermöglicht haben.

Bei meiner Frau Catharina, die mich fast durch das ganze Studium begleitete, möchte ich mich für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation, ihr Verständnis und für die unzähligen schönen gemeinsamen Momente ganz herzlich bedanken.

## 9. Veröffentlichungen

### Publikation

Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, **Lampert C**, Wenk S, Kraus F, Rapp M, Düwell P, Zeng Y, Schmollinger JC, Schnurr M, Endres S, Rothenfuß S. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2015;107.

### Vortrag

**Lampert C**. Bispecific Antibodies and Adoptive T Cell Transfer for Cancer Therapy. 8th Annual Retreat Graduiertenkolleg 1202, Ohlstadt, Deutschland, 2011.

### Posterpräsentationen

1. **Lampert C**, Schmollinger JC, Niederfellner G, Sustmann C, Klein C, Endres S, Kobold S. Combination of adoptive T cell therapy with an EGFR x EpCAM-specific antibody for the treatment of a murine melanoma model. 12.CIMT *Cancer Immunotherapy Meeting*, Mainz, Deutschland, 2014.
2. Grassmann S, Chaloupka M, **Lampert C**, Schmollinger JC, Endres S, Kobold S. A new PD1-CD28 chimeric receptor overcomes PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. 12.CIMT *Cancer Immunotherapy Meeting*, Mainz, Deutschland, 2014.
3. Kobold S, Steffen J, **Lampert C**, Grassmann S, Henkel J, Castoldi R, Schmollinger JC, Sustmann C, Niederfellner G, Klein C, Bourquin C, Endres S. A new bispecific T cell recruiting antibody enhances anti-tumor activity of adoptive T cell transfer. 12. CIMT *Cancer Immunotherapy Meeting*, Mainz, Deutschland, 2014.