

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Charakterisierung pan-T-Zell-spezifischer Antikörper in Hinblick auf die  
Funktion von T-Zellen und deren Eignung für immuno-PET-Anwendungen  
im Kontext von Immuntherapien**

Kristine Elisabeth Mayer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizinischen  
Wissenschaft (Dr. med. sci.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Angela Krackhardt
2. Prof. Dr. Wilko Weichert (schriftliche Beurteilung)  
    apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janßen (mündliche Beurteilung)
3. Prof. Dr. Wolfgang Weber

Die Dissertation wurde am 31.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 16.03.2022 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	4
Zusammenfassung .....	7
Einleitung .....	9
1. Immunbasierte Tumorthérapien, deren Anwendungsspektrum und Nebenwirkungen .....	9
1.1 Überblick .....	9
1.2 Antikörperbasierte Therapien .....	10
1.3 Zellbasierte Therapien: adoptiver Zelltransfer .....	14
1.4 Therapeutische Vakzine und onkolytische Viren .....	16
2. Determinanten für das Ansprechen immunbasierter Tumorthérapien .....	17
2.1 Immunologische Grundlagen der Tumorbologie .....	17
2.2 Resistenz im Rahmen immunbasierter Therapien .....	18
2.3 Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens bei Immuntherapien .....	20
3. Bildgebungsmodalitäten im Rahmen von Immuntherapien bei malignen Tumoren .....	22
3.1 Anforderungen an die Bildgebung bei immunbasierten Tumorthérapien .....	22
3.2 Konventionelle Bildgebungsmethoden .....	23
3.3 PET/CT-Bildgebung .....	23
4. T-Zell-basierte Bildgebung bei Immuntherapien .....	26
4.1 Rationale von T-Zell-Tracern und immuno-PET im Kontext von Immuntherapien .....	26
4.2 Detektion von durch Effektorzellen sezernierten Molekülen .....	27
4.3 Immuno-PET von T-Zell-Oberflächenmolekülen .....	27
5. T-Zell-Funktionalität bei bildgebenden Verfahren im Kontext von Immuntherapien .....	28
5.1 Anforderungen an T-Zell-Tracer im Rahmen von Immuntherapien .....	28
5.2 Funktionalitätstestung von T-Zell-Tracern in der Literatur .....	30
6. Konstant exprimierte pan-T-Zell-Marker und deren Funktion .....	30
6.1 CD3 .....	31
6.2 CD2 .....	32
6.3 CD7 .....	32
Problemstellung .....	34
Material .....	35
1. Puffer, Medien, Antikörper für die Durchflusszytometrie und weitere Reagenzien .....	35
2. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	39
3. Zellmaterial und getestete Antikörper .....	40
3.1 Zellmaterial .....	40
3.2 Getestete Antikörper und F(ab') <sub>2</sub> Fragmente .....	41
Methodik .....	42
1. Zellisolation, -kultur und Transduktion .....	42

2. Präparation der getesteten Antikörper und F(ab') <sub>2</sub> Fragmente.....	45
3. Funktionelle <i>in vitro</i> -Charakterisierung von Antikörpern und F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten.....	47
3.1 Durchflusszytometrie .....	47
3.2 Expressionsanalyse der Zielstrukturen auf PBMC-Subpopulationen.....	47
3.2 Quantifizierung der Oberflächenexpression der Zielantigene auf spezifisch aktivierten T <sub>CM</sub>	47
3.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	48
3.4 Untersuchung auf Internalisierung .....	48
3.5 Untersuchung auf Zellapoptose .....	48
3.6 Untersuchung des Proliferationsverhaltens .....	49
3.7 ELISA.....	50
3.8 Quantitative Analyse der Zytotoxizität von T-Zellen .....	51
4. <i>In vivo</i> -Testung von F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten.....	52
4.1 <i>In vivo</i> -Tumormodell.....	52
4.2 <i>In vivo</i> -Funktionalitätstestung der F(ab') <sub>2</sub> Fragmente .....	52
4.3 PET/CT-Bildgebung.....	53
4.4 <i>Ex vivo</i> -Analysen.....	53
5. Software und Statistik .....	54
Ergebnisse .....	55
1. Expressionsverhalten von CD2, CD3 und CD7 .....	55
1.1 Expression auf Subpopulationen von frisch isolierten PBMC .....	55
1.2 Expression auf spezifisch aktivierten T-Zellen .....	56
2. Untersuchte Antikörper gegen die pan-T-Zell-Antigene CD2, CD3 und CD7 .....	56
2.1 Bindung der untersuchten Antikörper an humane PBMC.....	57
2.2 Untersuchung der Induktion von Zellapoptose und IFN $\gamma$ -Produktion durch die ausgewählten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD7 .....	58
3. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) Antikörpern und F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten hinsichtlich deren Tracereigenschaften .....	59
3.1 Bindungsverhalten und Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	59
3.2 Internalisierungsverhalten .....	60
4. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab') <sub>2</sub> hinsichtlich der <i>in vitro</i> -T-Zell-Funktionalität .....	60
4.1 Induktion von Zellapoptose und IFN $\gamma$ -Produktion.....	60
4.2 T-Zell-Proliferationsverhalten.....	61
4.3 Zytotoxizitätsverhalten von aktivierten T-Zellen .....	63
5. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten hinsichtlich der <i>in vivo</i> -T-Zell-Funktionalität .....	66
5.1 Funktionalitätstestung nach Bildgebungsprotokoll .....	66
5.2 Funktionalitätstestung bei verzögerter T-Zell-Gabe.....	68
6. <i>In vivo</i> -Bildgebung mit <sup>89</sup> Zr-OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten...	71

6.1 PET/CT mit <sup>89</sup> Zr-OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten .....	71
6.2 <i>In vivo</i> -Charakterisierung von <sup>89</sup> Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten .....	72
6.3 Detektion tumorreaktiver T-Zellen mittels <sup>89</sup> Zr-T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten <i>in vivo</i> .....	75
Diskussion .....	76
1. Beurteilung des Therapieansprechens antitumoraler Immuntherapien .....	76
2. CD2, CD3 und CD7 als Zielstrukturen für pan-T-Zell-Tracer.....	79
2.1 CD3 .....	80
2.2 CD2 und CD7.....	82
3. Anforderungen an potentielle immuno-PET-Tracer.....	83
3.1 Bindung, Affinität und Spezifität der untersuchten Antikörper und F(ab') <sub>2</sub> Fragmente .....	83
3.2 Funktionalität der Zielzellen.....	83
3.3 Verwendung von F(ab') <sub>2</sub> Fragmenten .....	84
4. Funktionelle Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2)-basierten Tracern .....	85
5. T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab') <sub>2</sub> -Tracer und die Zielstruktur CD7 .....	88
5.1 Funktionalität.....	88
5.2 Spezifität des Tracers für tumorreaktive T-Zellen .....	89
5.3 Perspektiven und Hürden der Zielstruktur CD7 .....	90
6. Radiotraceroptimierung und klinische Translation .....	91
Literaturverzeichnis.....	95
Abbildungsverzeichnis .....	121
Danksagung .....	123

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	„adoptive cell transfer“ (adoptiver Zelltransfer)
ADCC	„antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität)
AML	akute myeloische Leukämie
APCs	„antigen presenting cells“ (antigenpräsentierende Zellen)
CAR	„chimeric antigen receptors“ (chimärer Antigenrezeptor)
CT	Computertomographie
CTLs	„cytotoxic T lymphocytes“ (zytotoxische T-Zellen)
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“
CTV	„CellTrace Violet“
CRS	„cytokine release syndrome“ (Zytokin-Freisetzungssyndrom)
DLBCL	„diffuse large B-cell lymphoma“ (diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom)
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EORTC	„European Organisation for Research and Treatment of Cancer“
FDA	„Food and Drug Administration“
<sup>18</sup> FDG	Fluor-18-Deoxyglukose
<sup>18</sup> F-AraG	Fluor-18-arabinofuranosylguanin
GITR	„Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein“
GM	„geometric mean“ (geometrisches Mittel)
GvHD	„graft-versus-host-disease“ (Graft-versus-Host Erkrankung)
ICOS	„inducible T cell co-stimulator“ (induzierbarer T-Zell-Costimulator)
IDO	„indoleamin-2,3-dioxygenase“
IFN $\gamma$	„interferone $\gamma$ “ (Interferon $\gamma$ )
IHC	Immunhistochemie
IL-x	„interleukin x“ (Interleukin x)
iRFP	„infrared fluorescent protein“
irRC	„immune-related response criteria“
JAK1/2	Januskinase 1/2
KIRs	„killer cell immunoglobulin-like receptors“
LAG-3	„lymphocyte-activation gene 3 protein“
MAPKinase	„mitogen-activated protein kinase“

MART-1	„melanoma antigen recognized by T cells 1“
MDSCs	„myeloid-derived suppressor cells“ (myeloide Suppressorzellen)
MFI	„mean fluorescence intensity“ (durchschnittliche Fluoreszenzintensität)
MIP	„maximum intensity projection“ (Maximalintensitätsprojektion)
ML2-B7	ML2 HLA-B*07:02 transduzierte Tumorzellen
ML2-B15	ML2 HLA-B*15:01 transduzierte Tumorzellen
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCLC	„non small cell lung cancer“ (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
NSG Mäuse	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ Mäuse
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“ (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PD-1	„programmed cell death protein 1“
PERCIST	„PET Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“
PET	„positron emission tomography“ (Positronenemissionstomographie)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PSMA	„prostate specific membrane antigen“ (prostataspezifisches Membranantigen)
PTEN	„phosphatase and tensin Homolog“
RECIST	„Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“
scFv	„single-chain variable Fragment“
SE-HPLC	„size-exclusion high performance liquid chromatography“ (Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
SPECT	„single photon emission computed tomography“ (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)
SUV	„standardized uptake value“
TAA	tumor-assoziiertes Antigen
TCR	„t-cell receptor“ (T-Zell-Rezeptor)
TCR2.5D6 T-Zellen	TCR2.5D6 transduzierte T-Zellen
T <sub>CM</sub>	„central memory T cells“ (zentrale Gedächtnis-T-Zellen)
T <sub>EFF</sub>	„effector T cells“ (Effektor-T-Zellen)
T <sub>EM</sub>	„effector memory T cells“ (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen)
T <sub>N</sub>	„naive T cells“ (naive T-Zellen)

TIL	„tumor-infiltrating lymphocytes“ (Tumor-infiltrierende Lymphozyten)
TIM-3	„T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3“
TIGIT	„T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains“
TGF $\beta$	„transforming growth factor $\beta$ “
TNF $\alpha$	„tumor necrosis factor $\alpha$ “ (Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$ )
T <sub>Reg</sub>	„regulatory T cells“ (regulatorische T-Zellen)
TSA	„tumor-specific antigen“ (tumor-spezifisches Antigen)
VEGF	„vascular endothelial growth factor“ (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

## Zusammenfassung

Immuntherapien haben in den vergangenen Jahren die moderne Tumorthherapie revolutioniert, sodass sie nun bei unterschiedlichen Tumorentitäten routinemäßig eingesetzt werden (Waldman et al. 2020). Ihr Anwendungsspektrum erweitert sich kontinuierlich und es ist davon auszugehen, dass sie bei den meisten Tumorentitäten – wenn auch mit unterschiedlicher Effektivität – zum Einsatz kommen können. Gleichzeitig zeichnen sich Immuntherapien im Gegensatz zu konventionellen Therapien wie Chemo- oder Strahlentherapien häufig durch eine hohe Spezifität für ihre Zielstrukturen aus (Pardoll 2012), was sie zu attraktiven Therapeutika macht.

Grundsätzlich unterscheidet man verschiedene den Immuntherapien zugrundeliegende Ansätze (Waldman et al. 2020), von denen im Folgenden nur exemplarisch auf einige von großer klinischer Relevanz eingegangen werden soll. Antikörperbasierte Ansätze zielen auf eine Reprogrammierung inaktivierter T-Zellen ab (Pardoll 2012). Dies kann einerseits durch eine weitere Verstärkung des Signals aktivierender Rezeptoren gelingen und andererseits, indem die Antikörperbindung an inhibierende Oberflächenmoleküle wie CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3 und TIM-3 diese funktionell inaktiviert (Burugu et al. 2018). Daneben werden bei den zellbasierten Verfahren Zellen des Immunsystems so modifiziert, dass sie Tumorzellen erkennen und deren Apoptose induzieren (Rosenberg und Restifo 2015). Auf diesem Konzept bauen CAR T-Zellen und TCR-transgene T-Zellen auf, bei dem T-Zellen mit spezifischen Rezeptoren ausgestattet werden, um die Immunantwort zu stimulieren (June et al. 2018).

Eine Hürde bei der Anwendung von Immuntherapien stellt allerdings das stark variable Therapieansprechen dar. Dabei bestehen nicht nur große Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapieoptionen und Tumorentitäten, sondern auch das interindividuelle Ansprechen variiert beträchtlich (Borcoman et al. 2019, Ribas und Wolchok 2018). Aufgrund dessen sind diagnostische Marker und Methoden zur Abschätzung der Therapieeffizienz von großer klinischer Relevanz.

Entsprechend bieten sich als auf zu erwartenden therapeutischen Erfolg hinweisende Surrogatparameter im Kontext von Immuntherapien insbesondere T-Zellen an, da diese die Effektorzellen vieler immuntherapeutischer Ansätze darstellen. Durch die Auswahl unterschiedlicher Oberflächenmoleküle als Zielstrukturen können entweder spezifische Subpopulationen von T-Zellen oder im Rahmen von sogenannten pan-T-Zell-Markern T-Zellen im Allgemeinen detektiert werden. Bei Letzteren ist von einer breiteren Anwendung auszugehen, da im Rahmen unterschiedlicher immuntherapeutischer Konzepte zum Teil verschiedene T-Zell-Populationen von Bedeutung sind.

Die PET-basierte Bildgebung hat sich als Methodik zur Visualisierung von als Biomarker genutzten Zielstrukturen etabliert, da sie in der Lage ist, funktionelle Aussagen über das untersuchte Gewebe mit einer räumlichen Zuordnung zu kombinieren. Durch Verwendung antikörperbasierter Konstrukte kann ein für die jeweilige Zielstruktur hochspezifischer Tracer entwickelt werden. Gleichzeitig bietet die

Vielfalt an Antikörpern ein beinahe grenzenloses Spektrum möglicher Zielstrukturen, sodass sich dieses als immuno-PET bezeichnete Konzept auch besonders zum Nachweis von T-Zellen eignet.

Da T-Zellen als potentielle Zielstrukturen auch die therapeutischen Effektorzellen darstellen, ist es bei der Suche nach einem geeigneten diagnostischen Marker wichtig, dass die Antikörper und ihre Konstrukte keinen Einfluss auf ihre Zielzellen und damit die Therapie nehmen.

In dieser Arbeit wurden insbesondere die pan-T-Zell-Marker CD2 und CD7 anhand ausgewählter Antikörper bzw. deren F(ab')<sub>2</sub> Fragmente auf ihre grundsätzliche Eignung als Biomarker für T-Zellen im Rahmen eines Modells des adoptiven T-Zell-Transfers untersucht. Nach einer ausführlichen *in vitro*-Analyse der Effekte der Konstrukte auf T-Zellen wurden diese *in vivo* sowohl hinsichtlich der Funktionalität als auch ihrer Eignung als Tracer getestet. Dabei konnte unter peritherapeutischer anti-CD2 F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Gabe ein Therapieversagen festgestellt werden.

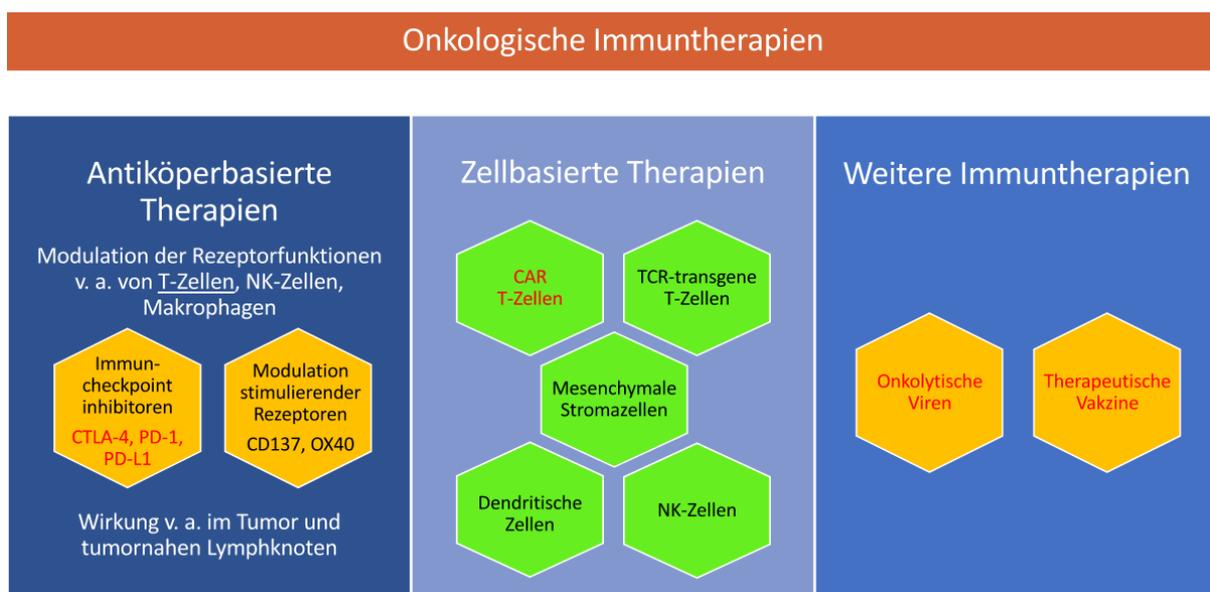
Aufbauend auf diesen Erkenntnissen kann davon ausgegangen werden, dass der funktionellen Analyse möglicher Tracer *in vitro* wie *in vivo* im Rahmen geeigneter Tumortherapiemodelle essentielle Bedeutung zukommt.

# Einleitung

## 1. Immunbasierte Tumorthérapien, deren Anwendungsspektrum und Nebenwirkungen

### 1.1 Überblick

Die therapeutische Modulation von Komponenten des Immunsystems, zusammenfassend als Immuntherapien bezeichnet, spielt eine zunehmend größere Rolle bei der Behandlung von malignen Tumoren (Ribas und Wolchok 2018, Waldman et al. 2020). Dabei sind Immuntherapien im engeren Sinne, die direkt in das Immunsystem eingreifen bzw. dieses nutzen, von solchen Ansätzen zu unterscheiden, welche vorrangig Tumorzellen adressieren, jedoch wesentlich von einer zusätzlichen Immunantwort profitieren. Zweiteres ist bspw. bei tumorspezifischen Antikörpern der Fall. Insbesondere seit der Zulassung des Immuncheckpoint-Inhibitors Ipilimumab durch die „Food and Drug Administration“ (FDA) und die Europäische Kommission 2011 wuchs das Feld der onkologischen Immuntherapien stetig, sodass es heute eine wichtige Therapiesäule für viele Tumorentitäten darstellt (Kruger et al. 2019, Ribas und Wolchok 2018, Tang et al. 2018). Die Vielzahl von Immuntherapien umfasst neben immunmodulierenden Antikörpern auch zellbasierte Therapien sowie Konzepte der therapeutischen Vakzine und onkolytische Viren (Abb. 1; Kaufman et al. 2015, Waldman et al. 2020). Das Prinzip der antikörperbasierten Therapien beruht auf der Modulation stimulierender bzw. inhibierender Rezeptoren von Immunzellen (Pardoll 2012, Ribas und Wolchok 2018), wobei man in Zusammenhang mit letzteren von Immuncheckpoint-Inhibition spricht. Bei zellbasierten Therapien werden genetische Veränderungen an Immunzellen vorgenommen, welche die Immunantwort verstärken (June et al. 2015, Rosenberg und Restifo 2015). Daneben können mittels therapeutischer Vakzine und onkolytischen Viren Immunantworten initiiert werden (Kaufman et al. 2015, Waldman et al. 2020).



**Abbildung 1. Überblick über onkologische Immuntherapien.** Therapien mit klinischer Anwendung in rot dargestellt.

Grundsätzlich stellen unterschiedliche Zellen des Immunsystems mögliche Angriffspunkte für derartige Therapien dar. So können neben T-Zellen auch NK-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen als Effektorzellen fungieren (DeNardo und Ruffell 2019, Huntington et al. 2020, Wculek et al. 2020). Von höchster klinischer Relevanz sind jedoch bis jetzt Therapiemodalitäten, welche ihre Wirkung insbesondere über T-Zellen entfalten (Ribas und Wolchok 2018, Waldman et al. 2020).

## 1.2 Antikörperbasierte Therapien

### Immunmodulierende Rezeptoren und deren therapeutische Modulation

Basierend auf der Entdeckung immunmodulierender Rezeptoren, von denen eine Auswahl in Tabelle 1 dargestellt ist (Burugu et al. 2018), entwickelte sich die Erkenntnis, dass diese durch Bindung monoklonaler Antikörper in ihrer Funktion beeinflusst werden können (Pardoll 2012). Die ersten entsprechenden Antikörper in klinischer Anwendung richteten sich gegen die Immuncheckpoint-Rezeptoren CTLA-4 („cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“) und PD-1 („programmed cell death protein 1“) sowie dessen Liganden PD-L1, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Zelltyp	Stimulierend	Inhibierend
<b>T-Zellen</b>	CD137	CTLA-4
	OX40	PD-1
	ICOS	LAG-3
	GITR	TIM-3
	CD27, CD28	TIGIT
<b>NK-Zellen</b>		KIR

**Tabelle 1. Ausgewählte immunmodulierende Rezeptoren auf T-Zellen und NK-Zellen.** Die Auswahl ist angelehnt an Burugu et al. 2018.

#### a. CTLA-4

CTLA-4 ist ein von T-Zellen exprimierter Rezeptor, der in besonderem Maße auf regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) vorkommt (Takahashi et al. 2000). Andere Subpopulationen von T-Zellen speichern diesen Rezeptor hingegen v. a. intrazellulär in Vesikeln bei variabler Oberflächenexpression (Linsley et al. 1996). Seine Mobilisation an die Oberfläche hängt dann von unterschiedlichsten Faktoren wie dem Aktivierungsgrad der Zelle ab (Linsley et al. 1996, Rowshanravan et al. 2018). So kann es bei T-Zell-Aktivierung über T-Zell-Rezeptor (TCR)-Erkennung und Kostimulation von CD28 zur induzierten Oberflächenexpression von CTLA-4 kommen (Rowshanravan et al. 2018). Die Funktion von CTLA-4 ist sehr komplex. Es interagiert einerseits mit den gleichen Rezeptoren wie CD28, nämlich mit CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wenn auch mit höherer Affinität, und verhindert so durch Blockade des kostimulatorischen Signals von CD28 eine weitere T-Zell-Aktivierung,

vermittelt andererseits aber auch direkte inhibitorische Signale (Krummel und Allison 1995, Walunas et al. 1994).

Wenn CTLA-4 mit Hilfe von Antikörpern blockiert wird, kann durch Aufhebung seiner inhibitorischen Funktion die antitumorale T-Zell-Antwort verstärkt werden (Leach et al. 1996, Ribas und Wolchok 2018). Für Ipilimumab geht man davon aus, dass es durch seine Interaktion mit CTLA-4 aufgrund sterischer Ähnlichkeit zu dessen natürlichen Liganden zu einer mechanischen Blockade dieser Bindung kommt (Ramagopal et al. 2017). Außerdem gibt es Hinweise, dass den Effektor-T-Zellen ( $T_{EFF}$ ) und den  $T_{Reg}$  eine besondere Rolle in der Wirkungsweise dieses Antikörpers zukommt (Selby et al. 2013, Simpson et al. 2013). Ein Großteil der Wirkung von gegen CTLA-4 gerichteten Antikörpern wird auch durch die Interaktion des Fc-Teils mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren erklärt (Arce Vargas et al. 2018, Ingram et al. 2018). So nimmt man an, dass es durch Quervernetzung der Antikörper mit Monozyten und Makrophagen aus der Umgebung des Tumors über deren Fc $\gamma$ -Rezeptor IIIA und den Mechanismus der Antikörper-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) zur Elimination v. a. von  $T_{Reg}$  kommt (Boutros et al. 2016), auch wenn Sharma und Kollegen zeigen konnten, dass es bei bestimmten Tumorentitäten nicht zu einer Depletion von FOXP3<sup>+</sup>  $T_{Reg}$  kommt (Sharma et al. 2019).

#### **b. PD-1 und PD-L1 bzw. PD-L2**

Einen inhibierenden Effekt auf die T-Zell-Funktion hat auch die Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 auf diversen Immunzellen sowie Tumorzellen (Freeman et al. 2000), bzw. PD-L2, der vorwiegend auf APCs vorkommt (Latchman et al. 2001).

PD-1 ist ein transmembranöses Protein der Immunglobulin-Superfamilie, das im Gegensatz zu CTLA-4 nicht nur auf aktivierten T-Zellen (Ishida et al. 1992), sondern auch auf anderen aktivierten Immunzellen wie B-, NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen vorkommt (Gordon et al. 2017, Keir et al. 2008, Pardoll 2012). Sogar auf Tumorzellen, wie z. B. Melanomzellen, kann PD-1 exprimiert werden und zum Tumorwachstum beitragen (Kleffel et al. 2015).

PD-L1 ist wie CTLA-4 ein Rezeptor, der zum einen konstitutiv an der Oberfläche exprimiert und zum anderen in Folge externer Stimuli induziert wird (Freeman et al. 2000). Eine konstante Expression findet sich besonders auf Zellen myeloischen Ursprungs wie dendritischen Zellen, Makrophagen und „myeloid-derived suppressor cells“ (MDSC), aber auch auf T-, B- und NK-Zellen sowie aktivierten Endothelzellen (Zou und Chen 2008). Auf Tumorzellen kann es in Folge inflammatorischer Stimuli zur induzierten Expression kommen (Pardoll 2012), was auch als adaptive Immunresistenz (s. u.) aufgefasst werden kann (Sharma et al. 2017a). So kann die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen bspw. unter dem Einfluss des von T-Zellen sezerniertem IFN- $\gamma$  über den JAK/STAT/IRF1 Signalweg und Aktivierung des PD-L1-Promotors (Garcia-Diaz et al. 2017, Ribas und Wolchok 2018) oder durch TNF $\alpha$  (Lim et al. 2016) induziert werden. Andererseits kann es auch in direkter Folge tumorbedingter Mutationen wie des Tumorsuppressors „phosphatase and tensin Homolog“ (PTEN) zur Expression von PD-L1 kommen (Parsa et al. 2007) und auch die Amplifikation der chromosomalen Region 9p24.1, wie

sie häufig beim nodulär-sklerosierenden Hodgkin Lymphom vorkommt, ist ebenfalls mit einer Überexpression von PD-L1 und PD-L2 assoziiert (Goodman et al. 2017). PD-L2 wird im Allgemeinen v. a. auf aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen exprimiert (Bardhan et al. 2016). Die Interaktion zwischen PD-1 und seinen Liganden verhindert durch unterschiedliche Mechanismen eine suffiziente T-Zell-Antwort (Freeman et al. 2000, Latchman et al. 2001, Zou und Chen 2008). So kommt es u. a. zu T-Zell-Exhaustion (Blank et al. 2019), Produktion von IL-10, T-Zell-Anergie, Apoptoseinduktion von T-Zellen sowie zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber zytotoxischen T-Zellen (CTLs) (Zou und Chen 2008).

Gegen PD-1 gerichtete Antikörper wie Nivolumab oder Pembrolizumab sind in der Lage, die Interaktionen des Rezeptors mit seinen Liganden zu verhindern und so T-Zell-Antworten zu stimulieren, die zur Tumortherapie genutzt werden können (Brahmer et al. 2010, Patnaik et al. 2015, Robert et al. 2015, Topalian et al. 2012). Daneben zeigen auch anti-PD-L1 Antikörper antitumorale Wirksamkeit (Brahmer et al. 2012, Herbst et al. 2014, Powles et al. 2014).

Insgesamt unterscheiden sich die verschiedenen immunmodulierenden Antikörper neben ihren Zielstrukturen und der Affinität auch in der Antikörpersubklasse, was funktionelle Unterschiede bedingt (Mahoney et al. 2015). Ipilimumab (anti-CTLA-4) und Atezolizumab (anti-PD-L1) sind vom Subtyp IgG1, während Nivolumab und Pembrolizumab (beide anti-PD-1) IgG4-Antikörper sind. Für IgG4-Antikörper ist bekannt, dass sie für alle Fc-Rezeptoren mit Ausnahme von Fc $\gamma$ -Rezeptor I eine niedrigere Affinität als die anderen IgG-Subklassen aufweisen (Aalberse und Schuurman 2002). Folglich kommt es über IgG4 im Vergleich zu IgG1 weniger zur Komplement-vermittelten Zytotoxizität, Antikörper-vermittelten Phagozytose und ADCC (Crescioli et al. 2016), sodass die Wirkung der IgG4-Antikörper v. a. durch die direkte Blockade ihrer Zielstruktur erklärt wird.

### **c. Weitere immunmodulatorische Rezeptoren**

Neben CTLA-4 und PD-1 mit seinen Liganden bieten sich andere immunmodulierende Rezeptoren wie „T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3“ (TIM-3) (England et al. 2018, Sakuishi et al. 2010), „lymphocyte-activation gene 3 protein“ (LAG-3) (Woo et al. 2012) und „T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains“ (TIGIT) als Zielstrukturen für Immuncheckpoint-Inhibition an (Anderson et al. 2016, Burugu et al. 2018). Deren Nutzen wird v. a. im Bereich von Kombinationstherapien gesehen, da deren alleinige Modulation z. T. nicht zu einer ausreichenden T-Zell-Stimulation führt, bei gleichzeitiger Anwendung mit den bereits in der Klinik verwendeten Immuncheckpoint-Inhibitoren jedoch eine Verstärkung der T-Zell-Antwort erreicht werden kann (Sakuishi et al. 2010, Woo et al. 2012).

Außer den Rezeptoren auf T-Zellen nehmen auch Rezeptoren auf bspw. Makrophagen und NK-Zellen Einfluss auf die Immunregulation im Kontext von Tumoren (Burugu et al. 2018, DeNardo et al. 2019, Huntington et al. 2020). So kann z. B. durch therapeutische Aufhebung des inhibitorischen Effekts von

„inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIRs) die NK-Zell-Aktivität gesteigert werden (Andre et al. 2018, Ben-Shmuel et al. 2020).

Andererseits kann eine Verstärkung der Immunantwort auch über co-stimulatorische Rezeptoren wie CD137, OX40, „Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein“ (GITR), CD27, CD28 oder den „inducible T cell co-stimulator“ (ICOS) erreicht werden (Sanmamed et al. 2015).

### **Anwendungsspektrum und Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren**

Nach der Zulassung von Ipilimumab beim metastasierten Melanomen erweiterte sich das Spektrum sowohl der Tumorentitäten als auch der eingesetzten Antikörpern stetig und Immuncheckpoint-Inhibitoren konnten sich in der modernen Tumorthherapie etablieren (Kruger et al. 2019, Ribas und Wolchok 2018, Tang et al. 2018, Waldman et al. 2020). So umfasst ihr Anwendungsspektrum inzwischen eine breite Palette an Tumoren vom nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) (Borghaei et al. 2015) über das Nierenzellkarzinom (Motzer et al. 2018) und das Urothelzellkarzinom (Sharma et al. 2017b) bis zu Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Ferris et al. 2016) und des Ösophagus (Kato et al. 2019). Aber auch bei weiteren Tumoren wie bspw. Mikrosatelliten-instabilen Tumoren, dem Magenkarzinom, kolorektalen Tumoren, dem hepatozellulären Karzinom oder dem Merkelzellkarzinom werden diese erfolgreich eingesetzt (Gong et al. 2018). Des Weiteren sticht unter den Anwendungsbereichen bei Lymphomen wie dem folliculären Lymphom (Westin et al. 2014) oder dem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom („diffuse large B-cell lymphoma“, DLBCL) (Hude et al. 2017) die Indikation von Immuncheckpoint-Inhibitoren beim Chemo- sowie Strahlentherapie-refraktären und rezidierten Hodgkin Lymphom hervor (Ansell et al. 2015).

Das Ansprechen von Immuncheckpoint-Therapien variiert dabei in Abhängigkeit von der Tumorentität deutlich und reicht von 87% beim Hodgkin Lymphom bis zu 15% bei Kopf-Hals-, gastroösophagealen und Blasentumoren (Ribas und Wolchok 2018). Die besonders hohe Ansprechrate auf die Therapie mit PD-1-Inhibitoren v. a. beim nodulär-sklerosierenden Hodgkin Lymphom lässt sich durch die Amplifikation der chromosomalen Region 9p24.1 mit Überexpression von PD-L1 und PD-L2 (s. o.) erklären (Goodman et al. 2017, Ribas und Wolchok 2018).

Für die Therapie des Melanoms konnte gezeigt werden, dass Pembrolizumab der Monotherapie mit Ipilimumab überlegen ist (Robert et al. 2015) und eine Verbesserung der Ansprechraten durch Kombinationstherapien von anti-CTLA-4 und anti-PD-1 gerichteten Antikörpern erreicht wird (Larkin et al. 2015). Außerdem ergeben sich auch Möglichkeiten der Kombination mit anderen immuntherapeutischen Ansätzen oder konventionellen Tumorthérapien wie Chemo- oder Radiotherapie (Patel und Minn 2018).

### **Nebenwirkungen von Immuncheckpoint-Inhibitoren**

Im Allgemeinen unterscheiden sich die Nebenwirkungen je nach angewandter immuntherapeutischer Strategie (Weber et al. 2015), was auf das Eingreifen an unterschiedlichen Punkten der Immunregulation

zurückzuführen ist. Die Nebenwirkungen von Immuncheckpoint-Inhibitoren sind besonders auf eine verstärkte Autoreaktivität zurückzuführen und spielen sich entsprechend v. a. an immunologisch relevanten Organen wie der Haut, dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge ab (Martins et al. 2019). Neben dermatologischen Nebenwirkungen (Exanthem, Pruritus, Xerosis cutis) sind Kolitis, Lebertoxizität, Pankreatitis, Pneumonitis, Erkrankungen der Nieren, Hypophysitiden, neurologische und ophthalmologische Nebenwirkungen sowie Fatigue als häufigste Nebenwirkung von Bedeutung (Fecher et al. 2013, Martins et al. 2019, Naidoo et al. 2015). Für Ipilimumab konnte gezeigt werden, dass Nebenwirkungen grundsätzlich bei einem Großteil der behandelten Patienten (ca. 72%) auftreten und dosisabhängig sind (Bertrand et al. 2015). Weil Ipilimumab besonders zu einer Aktivierung von Lymphozyten in Lymphknoten und damit einer breit angelegten Immunantwort führt, erweisen sich die Nebenwirkungen im Vergleich zu anti-PD-1-Antikörpern, die ihre Wirkung v. a. am Tumor entfalten, als schwerwiegender (Boutros et al. 2016), auch wenn das Nebenwirkungsspektrum selbst ähnlich ist (Robert et al. 2015). Da die Nebenwirkungen hauptsächlich immunvermittelt entstehen, wird ihnen auch mittels Immunmodulation bspw. mit Steroiden oder gegen TNF $\alpha$  gerichteten Antikörpern begegnet (Friedman et al. 2016, Kähler et al. 2016, Martins et al. 2019).

### **1.3 Zellbasierte Therapien: adoptiver Zelltransfer**

#### **Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL)**

Neben den antikörperbasierten Therapien umfasst das Feld der onkologischen Immuntherapien auch zellbasierte Therapien. Im Rahmen des adoptiven Zelltransfers („adoptive cell transfer“, ACT) werden Immunzellen *ex vivo* moduliert und anschließend reinfundiert (June et al. 2015, Met et al. 2019, Rosenberg und Restifo 2015).

Um tumorinfiltrierende Lymphozyten („tumor-infiltrating lymphocytes“, TIL) therapeutisch zu nutzen, werden die im entnommenen Tumorgewebe enthaltenen Lymphozyten *ex vivo* kultiviert, die T-Zell-Klone mit antitumoraler Reaktivität identifiziert, expandiert und dem Patienten wieder infundiert (Rosenberg und Restifo 2015). Dabei geht der Reinfusion der tumorspezifischen Lymphozyten i. d. R. eine Depletion der Lymphozyten bspw. durch Cyclophosphamid und Fludarabin voraus, wodurch die Effizienz der Therapie gesteigert werden kann (Dudley et al. 2002). Klinische Anwendung fand diese Methode erstmals beim metastasierten Melanom in den 1990er Jahren (Dudley et al. 2002). Auch wenn inzwischen Immuncheckpoint-Inhibitoren zur Therapie des metastasierten Melanoms zur Verfügung stehen, kann der adoptive Zelltransfer von TIL eine Therapieoption bei Patienten darstellen, die einen Tumorprogress aufweisen (Rohaan et al. 2018). Auch bei anderen Tumorentitäten wie dem HPV-assoziierten fortgeschrittenen Zervixkarzinom (Stevanovic et al. 2015), dem Nierenzellkarzinom (Andersen et al. 2018) oder dem NSCLC (Ben-Avi et al. 2018) zeigte die Anwendung von TIL Erfolg, auch wenn die Ansprechraten hinter denen beim Melanom zurückblieben (Rohaan et al. 2018).

## **TCR-modulierte T-Zellen**

Aufbauend auf dem Konzept der TIL mit ihren Rezeptoren, welche tumor-assoziierte Antigene (TAA) erkennen, und mit Hilfe der Möglichkeiten der Genmodifikation können individuell auf den Patienten abgestimmte tumorspezifische T-Zellen hergestellt werden. Dabei können MHC-bindende TCR oder chimäre Antigenrezeptoren („chimeric antigen receptors“, CAR) in die patienteneigenen T-Zellen eingebracht werden (Rosenberg und Restifo 2015).

Voraussetzung für die Erkennung der entsprechenden Zielstruktur durch TCR-transgene T-Zellen ist die Präsentation des Tumorantigens im Zusammenhang mit einem geeigneten, zum TCR korrespondierenden MHC-Komplex, was auch als MHC-Restriktion bezeichnet wird. Aufgrund der großen genetischen Variationsbreite von MHC-Molekülen müssen entsprechend verschiedene, jeweils korrespondierende TCRs für die Erkennung eines Antigens bei unterschiedlichen Patienten entwickelt werden. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass die Affinität der TCRs zu ihrem Zielantigen von ausgesprochener Bedeutung für die Effizienz der Therapie ist (Audehm et al. 2019).

Erstmals kamen TCR-modulierte T-Zellen, die das HLA-A\*0201 gebundene Peptid „melanoma antigen recognized by T cells 1“ (MART-1) erkannten, beim metastasierten Melanom zur klinischen Anwendung (Morgan et al. 2006). In der Folge konnten weitere für den adoptiven T-Zell-Transfer geeignete Antigene wie NY-ESO-1 oder KRAS G12D und entsprechende TCRs identifiziert werden (Robbins et al. 2015, Tran et al. 2016) und so insb. mit dem auf vielen Tumoren exprimierten NY-ESO-1 ein breiteres Anwendungsspektrum erschlossen werden (Thomas et al. 2018).

Das Repertoire an beschriebenen TCRs beschränkt sich jedoch nicht auf solide Tumoren, sondern umfasst auch bspw. Leukämien (Audehm et al. 2019, Klar et al. 2014, Mall et al. 2016). So ist der T-Zell-Rezeptor TCR2.5D6 in der Lage, akute myeloische Leukämie (AML)-Zellen zu erkennen, wenn diese MPO<sub>5</sub> über HLA-B\*07:02 präsentieren (Klar et al. 2014).

## **CAR-T-Zellen**

Im Gegensatz zu TCR-transgenen T-Zellen können CAR-modulierte T-Zellen ihre Zielantigene unabhängig von MHC-Restriktion erkennen (June et al. 2018, Lim und June 2017). Ein CAR setzt sich aus der antigenbindenden Domäne und einem Abschnitt zur Signalübertragung zusammen, die über eine sog. Hinge-Region miteinander verbunden sind (Met et al. 2019). Die antigenbindende Domäne umfasst dabei i. d. R. ein „single-chain variable Fragment“ (scFv), welches meistens von einem murinen Antikörper abgeleitet ist, und die Signaldomäne wird vom transmembranösen und intrazellulären Abschnitt von CD3 $\zeta$  gebildet (Met et al. 2019). Inzwischen wurden jedoch auch CARs mit komplett humanem scFv konstruiert (Sommermeyer et al. 2017), was deren Immunogenität senkt. Die Erkennung einer Zielstruktur führt dann zur Stimulation der Zelle (Lim und June 2017, Met et al. 2019).

CARs können allerdings nur oberflächliche Tumorantigene als Zielstrukturen erkennen, sodass die Fülle an potentiellen intrazellulären Antigenen nicht ausgeschöpft wird (June et al. 2018, Lim und June 2017). Entsprechend finden CAR-T-Zellen aktuell v. a. bei hämatologischen Neoplasien wie verschiedenen

Lymphomen (Brudno und Kochenderfer 2018, Neelapu et al. 2017) sowie der akuten und chronischen lymphatischen Leukämie klinische Anwendung (Grupp et al. 2013, Porter et al. 2011). Insb. CD19 eignet sich nach langjähriger klinischer Erfahrung mit dieser Zielstruktur für den Antikörper Rituximab gut als Zielantigen, da es ein spezifischer Marker der B-Zell-Linie ist und nicht auf anderen Zellen vorkommt (June et al. 2018). Um CARs auch bei soliden Tumoren anwenden zu können, müssen neben geeigneten tumorspezifischen Zielantigenen Wege gefunden werden, die Zellen besser an ihren Zielort zu lenken und die Durchdringung des Tumor mit den Zellen bzw. deren Expansion im Tumorgewebe zu verbessern (Lim und June 2017).

### **Nebenwirkungen des adoptiven T-Zell-Transfers**

Die Nebenwirkungen des adoptiven T-Zell-Transfers sind größtenteils darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um zelluläre Therapien handelt. In diesem Zusammenhang sind auch Nebenwirkungen aufgrund der T-Zell-depletierenden Vorbehandlung mit Zytostatika zu beachten.

Für die Behandlung mit TCR-modulierten T-Zellen ist insb. das Guillain-Barré-Syndrom hervorzuheben (Joseph et al. 2019). Das Nebenwirkungsprofil von CAR-T-Zellen umfasst v. a. das Zytokin-Freisetzungssyndrom („cytokine release syndrome“, CRS) und Neurotoxizität (June et al. 2018, Neelapu et al. 2018), wobei es Hinweise gibt, dass es unter bestimmten CARs weniger häufig zu diesen Nebenwirkungen kommt (Ying et al. 2019). Klinisch kann sich ein CRS mit Fieber, Fatigue und Myalgien bis hin zu respiratorischer Insuffizienz und Koagulopathie äußern (Neelapu et al. 2018). Als hierfür ursächlich wird eine massive Ausschüttung von IL-1 und IL-6 durch insb. Makrophagen angesehen (Giavridis et al. 2018, Norelli et al. 2019).

## **1.4 Therapeutische Vakzine und onkolytische Viren**

### **Therapeutische Vakzine**

Die Entwicklung einer therapeutischen Vakzine für Tumorerkrankungen basiert auf den gleichen Prinzipien wie prophylaktische Impfungen, die eine Immunantwort auf zugeführte Antigene induzieren, und nutzt entweder tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene (TSA) (Sahin et al. 2017). Während TAA auch auf anderen Geweben vorkommen und auf Tumoren entweder überexprimiert werden oder in deren Entwicklung eine Rolle spielen, finden sich TSA ausschließlich auf Tumorzellen (Barroso-Sousa und Ott 2018, Fridman et al. 2017). TSA können im Rahmen einer Infektion mit onkogenen Viren wie HPV oder Hepatitis B erworben werden und sind damit nicht patientenspezifisch (Barroso-Sousa und Ott 2018). Andererseits können sie aber auch durch somatische Mutationen oder epigenetische Veränderungen entstehen, wofür sich der Begriff „Neoantigene“ etabliert hat (Desrichard et al. 2016, Fridman et al. 2017). Die einzige klinische Anwendung einer Tumorkvakzine findet sich aktuell beim Prostatakarzinom, für das Sipuleucel-T zugelassen ist (Kantoff et al. 2010). Nichtsdestotrotz besteht auch Potential für eine erfolgreiche Anwendung bei weiteren Tumorentitäten

(Schwartzentruber et al. 2011), insb. unter Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (Barroso-Sousa und Ott 2018, Sahin et al. 2017), wobei an unterschiedlichen Punkten der Immunantwort eingegriffen wird, was eine wechselseitige Verstärkung ermöglicht.

### **Onkolytische Viren**

Den onkolytischen Viren liegt die Idee zugrunde, Viren so zu modifizieren, dass sie spezifisch Tumorzellen infizieren und deren Apoptose induzieren. Neben dem direkten Zelluntergang kommt der Immunantwort, die zum indirekten Zelluntergang beiträgt, eine besondere Rolle zu. Durch die vermehrte Freisetzung von Antigenen im Rahmen der viral bedingten Zelllyse werden Immunzellen stimuliert, was zur Eradikation des Tumors beiträgt (Kaufman et al. 2015). Zurzeit ist allerdings nur das onkolytische Virus Talimogene laherparepvec (T-Vec) für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen Melanoms durch die FDA zugelassen (Fountzilias et al. 2017).

## **2. Determinanten für das Ansprechen immunbasierter Tumorthapien**

### **2.1 Immunologische Grundlagen der Tumorbiologie**

Zum Verständnis, wann Immuntherapien erfolgreich sein können, ist grundsätzliches Wissen über die Interaktion von Tumorzellen und Immunantwort notwendig. Man geht davon aus, dass Tumor- und Abwehrzellen in einem wechselseitigen Verhältnis zueinander stehen (Dunn et al. 2002, O'Donnell et al. 2019). Das Immunsystem ist in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren, gleichzeitig können sich Tumorzellen aber auch einer gegen sie gerichteten Immunantwort entziehen (Dunn et al. 2002, Hanahan und Weinberg 2011). So entwickelt sich deren Interaktion von einem immunkontrollierten Zustand, auch als Eliminations-Phase bezeichnet, hin zu einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen, auch Escape-Phase genannt (Dunn et al. 2002, O'Donnell et al. 2019). In der dazwischenliegenden Equilibrium-Phase kommt es zur Selektion der gegen die Immunantwort resistenten Zellen als wesentliche Voraussetzung für die weitere Tumorentwicklung (Dunn et al. 2002, O'Donnell et al. 2019).

In diesem Sinne kann das Immuninfiltrat im Tumor und dessen genaue Charakterisierung auch als Prädiktor für ein besseres Überleben bei unterschiedlichen Tumoren herangezogen werden (Galon et al. 2006, Sato et al. 2005, Yamada et al. 2010). So bestimmen bspw. TIL die Prognose verschiedener solider Tumore (Gooden et al. 2011), was u. a. zur Einführung des sog. Immuno-Scores beim kolorektalen Karzinom führte, der auf der Dichte und Verteilung von CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen im Zentrum des Tumors und an dessen Rand basiert (Nishino et al. 2017b). Auch wenn in einzelnen Studien nur für CD8<sup>+</sup> Zellen, nicht jedoch für CD3<sup>+</sup> Zellen, eine Korrelation mit dem Überleben gefunden wurde (Sato et al. 2005), stellte eine Metaanalyse von Gooden und Kollegen auch den Nutzen von CD3<sup>+</sup> T-Zellen heraus (Gooden et al. 2011). Besondere Relevanz scheint jedoch dem Verhältnis zwischen CD8<sup>+</sup> Zellen

und T<sub>Reg</sub> zuzukommen (Sato et al. 2005) und auch die über CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Immunantwort (Tran et al. 2014, Borst et al. 2018) sowie Gedächtnis-T-Zellen, die durch Immuncheckpoint-Blockade reaktiviert werden können, spielen eine entscheidende Rolle (Chen und Mellman 2017).

Neben den TIL sind weitere Faktoren wie die tertiären lymphatischen Strukturen, Makrophagen und das Tumormikromilieu von prognostischer Relevanz (Fridman et al. 2017). Die Präsenz von Neoantigenen, die stark von der Tumorentität abhängt (Schumacher und Schreiber 2015), beeinflusst ebenfalls das Überleben, da sie gegen den Tumor gerichtete zytotoxische T-Zellen induzieren kann (Brown et al. 2014). In Zusammenfassung der für den Tumor und sein Immuninfiltrat relevantesten Eigenschaften wurde auch der Begriff „cancer-immune set point“ eingeführt (Chen und Mellman 2017). Dieser beschreibt das Zusammenspiel aus dem Tumorgenom bzw. dessen epigenetischen Veränderungen, der individuellen Genetik des Patienten und der initialen gegen den Tumor gerichteten Immunantwort (Chen und Mellman 2017). Dabei unterscheiden Chen und Mellman drei Phänotypen der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem, wodurch eine suffiziente, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort verhindert wird: «immune-desert phenotype», «immune-excluded phenotype» und «inflamed phenotype» (Chen und Mellman 2017). Auf ähnliche Weise postulieren O'Donnell und Kollegen vier Mikromilieutypen, die sich neben dem Tumormutationsgrad am inflammatorischen Infiltrat im Sinne aktivierter Gene des IFN $\gamma$ -Signalweges orientieren (O'Donnell et al. 2019). Neben dem Primärtumor weisen Tumorzellen in Metastasen zusätzliche Veränderungen auf, was u. a. eine Abnahme der CD8/CD4-Ratio auf TIL im Vergleich zum Primärtumor bedingt (Müller et al. 2016).

## **2.2 Resistenz im Rahmen immunbasierter Therapien**

Wie bei anderen Formen von Tumortherapien wird auch bei Immuntherapien ein ausbleibendes Ansprechen als Resistenz bezeichnet. Im klinischen Kontext kann Resistenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie beobachtet werden: jegliches Ansprechen kann ausbleiben oder eine Resistenz wird nach anfänglichem Ansprechen im Therapieverlauf beobachtet. Trotz einheitlicher klinischer Präsentation können dabei unterschiedliche Mechanismen der Interaktion zwischen Tumor und Immunantwort bzw. dem Mikromilieu zugrundeliegen (Sharma et al. 2017a). Aus tumorbiologischer Sicht wird das vollständige Ausbleiben jeglicher Immunantwort, häufig als primäre Resistenz bezeichnet, von der adaptiven und der erworbenen Resistenz differenziert (Sharma et al. 2017a). Im Unterschied zur immunologischen primären Resistenz liegt der adaptiven Resistenz ein Unterwandern der Immunantwort durch den Tumor zugrunde, wobei auch im zweiten Fall das klinische Therapieansprechen von Beginn an ausbleiben kann (Sharma et al. 2017a). Wenn allerdings nicht alle Tumorzellen in gleicher Weise an die immunologische Antwort angepasst sind (Dunn et al. 2002, O'Donnell et al. 2019), kann es im Rahmen der Therapie zur Selektion resistenter Zellen kommen, was sich klinisch als sekundäre Resistenz präsentiert und eine von Anfang an existente Resistenz maskiert (Sharma et al. 2017a).

Für ein mangelndes Ansprechen des Tumors auf Immuntherapien können sowohl tumorbedingte als auch die Immunantwort betreffende Faktoren, die wiederum ebenfalls durch den Tumor geprägt sind, verantwortlich sein (Nowicki et al. 2018, Pitt et al. 2016, Sharma et al. 2017a). Einer Resistenz können dabei folgende Mechanismen zugrundeliegen:

- a. Aufgrund fehlender Tumorimmunogenität kommt es nicht zu einer adäquaten T-Zell-Infiltration:

Ein geringe Immunogenität des Tumors kann dadurch bedingt sein, dass der Tumor nur wenige Mutationen und somit starke Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe aufweist oder dass die Antigenpräsentation intrazellulärer, mutierter Proteine bspw. durch einen Defekt im Proteasom, eingeschalteten Transportern oder MHC-I-Komplex bzw.  $\beta$ 2-Mikroglobulin gestört ist (Nowicki et al. 2018, Zaretsky et al. 2016). Ein Verlust der Antigenpräsentation aufgrund des Fehlens von  $\beta$ 2-Mikroglobulin stellt einen Mechanismus erworbener Resistenz beim adoptivem Transfer von T-Zellen, die den TCR zur Antigenerkennung nutzen, dar, was für die Therapie mit TIL gezeigt wurde (Restifo et al. 1996). Während  $\beta$ 2-Mikroglobulin für die Antigenpräsentation im Rahmen der CAR-Therapie keine Rolle spielt, kann hier eine Veränderung des Zielproteins zu Therapieresistenz führen, was man mit dualen CARs zu verhindern versucht (Ruella et al. 2016).

- b. Die T-Zell-Anwort wird durch entsprechende Mutationen des Tumors unterdrückt bzw. unterwandert (Nowicki et al. 2018, Pitt et al. 2016, Sharma et al. 2017a):

Beispiele für eine tumorbedingte reduzierte T-Zell-Infiltration sind die Aktivierung des  $\beta$ -catenin/Wnt-Signalweges mit Suppression der Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder die konstitutive Aktivierung des „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) -Weges, die ein immunsuppressives Zytokinmilieu mit Dominanz von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und IL-8 schafft, wodurch Infiltration und Funktionalität der T-Zellen eingeschränkt werden (Nowicki et al. 2018, Sharma et al. 2017a). Auch ein Verlust des Tumorsuppressors PTEN führt über Aktivierung des Phosphoinositid-3-kinase (PI3K)-Signalweges zur vermehrten Produktion von VEGF und zur reduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration (Nowicki et al. 2018, Sharma et al. 2017a). Andererseits können sich Tumorzellen der IFN $\gamma$ -dominierten T-Zell-Antwort durch Mutationen mit Funktionsverlust an verschiedenen Stellen der IFN $\gamma$ -Signalkaskade, wie dem IFN $\gamma$  Rezeptor 1 oder der mit diesem assoziierten Januskinasen 1 (JAK1) und JAK2, entziehen (Gao et al. 2016, Zaretsky et al. 2016).

Außerdem ist zu beachten, dass bei unterschiedlichen immuntherapeutischen Ansätzen und Tumorentitäten z. T. verschiedene Mechanismen Resistenzen bedingen. So geht man bspw. davon aus, dass eine verstärkte Expression eines Subclusters von MAGE-A Proteinen in Melanomen durch Autophagie-Suppression auf primäre Resistenz einer gegen CTLA-4, aber nicht gegen PD-1 gerichteten Therapie hinweist (Shukla et al. 2018).

- c. Der Tumor schafft sich ein immunsuppressives Mikromilieu (Pitt et al. 2016):

Ein Tumor ist in der Lage, MDSCs und T<sub>reg</sub> zu rekrutieren, die Einfluss auf die lokale Immunfunktion nehmen, und Gene zu aktivieren, welche das tumorale Mikromilieu verändern (Nowicki et al. 2018). So

werden VEGF und IL-10 ausgeschüttet und Gene für mesenchymale Transition, Chemotaxis von Monozyten, Makrophagen und MDSCs sowie Wundheilung induziert (Nowicki et al. 2018). Des Weiteren trägt z. B. die Aktivität des Enzyms Indol-2,3-dioxygenase (IDO) auf myeloischen Zellen und Tumorzellen zum Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan bei, sodass diese proliferierenden T-Zellen nicht mehr zur Verfügung steht, wobei die entstehenden Produkte zusätzlich immunsuppressive Eigenschaften aufweisen (Pitt et al. 2016). Neben Tumorzellen und MDSCs sind auch Fibroblasten wichtiger Bestandteil des Mikromilieus. Deren Expression von TGF $\beta$  verdrängt bspw. T-Zellen aus dem Tumorparenchym, was das Ansprechen von Immuntherapien verhindern kann (Mariathasan et al. 2018).

- d. Unter dem selektiven Druck von Immuntherapien kann es zur Hochregulation anderer inhibierender Rezeptoren auf Lymphozyten wie bspw. TIM-3 kommen (Koyama et al. 2016, Sharma et al. 2017a).

Aufgrund der Vielfalt an möglichen Resistenzmechanismen kommt der differenzierten Analyse des Tumorgewebes und einer daran ausgerichteten Therapie große Bedeutung zu. Wie Resistenzmechanismen an unterschiedlichsten Stellen in der Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen bzw. dem Mikromilieu ansetzen, tun dies auch unterschiedliche Therapien. In diesem Sinne gilt es den Resistenzmechanismen durch Kombinationen von unterschiedlichen, nicht ausschließlich immuntherapeutischen Tumortherapien zu begegnen (Patel und Minn 2018).

### **2.3 Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens bei Immuntherapien**

Immuntherapien und insb. die Immuncheckpoint-Therapien führen nur bei einem Teil der Patienten, der je nach Tumorentität unterschiedlich groß ausfällt, zu suffizientem Ansprechen mit einem insgesamt breiten und kontinuierlichen Spektrum an Therapieantworten (Ribas und Wolchok 2018). Gleichzeitig kann es im Rahmen der Therapie v. a. bei älteren Patienten sogar zum raschen Fortschreiten der Tumorerkrankung, einer sog. „Hyperprogression“, kommen (Champrat et al. 2017). Außerdem sind Immuntherapien häufig mit gravierenden Nebenwirkungen (June et al. 2018, Martins et al. 2019), die schnelle Entscheidungen bezüglich des weiteren klinischen Vorgehens erfordern, sowie hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Dies erfordert, die Therapieeffizienz individuell im Voraus abschätzen bzw. möglichst frühzeitig korrekt einordnen zu können.

Informationen über den Tumor und seine Zusammensetzung, die Hinweise auf das Ansprechen geben können, erhält man in erster Linie durch die histologische Analyse von Tumorgewebe. Faktoren, denen als biologische Indikatoren für das therapeutische Ansprechen auf Immuntherapien prädiktiver Wert zukommt, werden auch als Biomarker bezeichnet, da ihr Nachweis ein Ansprechen wahrscheinlich macht. Als Biomarker für das Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren wurden bisher u. a. die Anzahl der DNA-Mutationen, die Zahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Expression von PD-L1 im Tumor untersucht (Topalian et al. 2016), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

## **DNA-Mutationslast**

Es ist bekannt, dass die Häufigkeit von DNA-Mutationen zwischen den Tumorentitäten stark differiert (Alexandrov et al. 2013). Eine Vielzahl von Mutationen kommt bspw. beim Melanom (Cancer Genome Atlas 2015) oder dem Adenokarzinom der Lunge vor (Cancer Genome Atlas Research 2014). Eine höhere Mutationslast kann zu einer stärkeren Antigenität des Tumors führen und macht ein Ansprechen auf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren wahrscheinlicher, auch wenn es dieses nicht garantiert (McGranahan et al. 2016, Samstein et al. 2019). Antigenität und Ansprechen hängen stark davon ab, ob die Mutationen auch zu strukturellen Proteinveränderungen im Sinne von Neoantigenen führen, die von Immunzellen erkannt werden können (Chen und Mellman 2017).

Das bessere Ansprechen in Abhängigkeit von der Mutationslast erklärt auch den Nutzen von Immuntherapien bei Mismatch-Reparatur-defekten Tumoren (Le et al. 2015), welche entsprechend deutlich mehr Mutationen aufweisen (Lengauer et al. 1998), und führte zur Anerkennung des Defekts als Prädiktor für das Ansprechen auf anti-PD1-Therapien durch die FDA (Topalian et al. 2016). Außerdem scheinen auch Mutationen in bestimmten anderen Genen sowie epigenetische Veränderungen das Ansprechen von Immuntherapien wesentlich zu beeinflussen (Goltz et al. 2018, Riaz et al. 2016, Sade-Feldman et al. 2018).

## **TIL und T-Zell/Tumorzell-Ratio**

Das Vorhandensein von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumor ist i. d. R. per se mit einem besseren Überleben (Galon et al. 2006, Gooden et al. 2011, Sato et al. 2005, Yamada et al. 2010) sowie mit dem Ansprechen auf Immuncheckpoint-Blockade (Topalian et al. 2016) korreliert. Besonders die vor Therapiebeginn am invasiven Tumorrand vorliegenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind von prognostischer Relevanz, was für Pembrolizumab beim Melanom gezeigt werden konnte (Tumeh et al. 2014). Aber auch ein hoher prätherapeutischer Anteil an stark PD-1 bzw. CTLA-4 exprimierenden Zellen nimmt Einfluss auf den Erfolg einer gegen PD-1 gerichteten Therapie, unter der aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (Daud et al. 2016a). Außerdem trägt die Präsenz von über MHC-Klasse-II präsentierten Neoantigenen und deren induzierte Immunantwort zum Therapieansprechen bei (Alspach et al. 2019, Kreiter et al. 2015), wobei neben der absoluten Zahl an T-Zellen auch dem Verhältnis zwischen T-Zellen und Tumorzellen Bedeutung zukommt (Huang et al. 2017).

## **PD-L1 Expression (auf TIL und Tumorzellen)**

Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und TILs ist nicht nur für sich genommen mit einem verlängerten Überleben bei unterschiedlichen Tumoren korreliert (Schalper et al. 2014, Taube et al. 2012), sondern ihr kommt bei ausgewählten Tumorentitäten wie dem NSCLC auch prädiktiver Wert bzgl. des Therapieansprechens auf Immuncheckpoint-Inhibitoren zu (Herbst et al. 2014, Topalian et al. 2012, Topalian et al. 2016). Während beim Melanom eine fehlende PD-L1-Expression im Biopsiematerial eine suffiziente Antwort nicht grundsätzlich ausschließt (Daud et al. 2016b), wurde im

Fälle des NSCLC der Einsatz von Pembrolizumab durch die FDA an den Nachweis von mind. 50% PD-L1<sup>+</sup> Tumorzellen geknüpft (Reck et al. 2016). Dabei ist zu beachten, dass es z. B. unter Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors („epidermal growth factor receptor“, EGFR) zur konstitutiven Expression von PD-L1 kommen kann, ohne dass dies auf immuntherapeutisches Ansprechen hinweist (Nowicki et al. 2018).

### **Scoring Systeme am Beispiel von IMPRES**

Wie für Mutationslast und PD-L1-Expression gezeigt, ist das Antwortverhalten auf Immuntherapien in wesentlichem Maße von der Tumorentität abhängig. Für das Melanom wurde der IMPREScore entwickelt, um die vielfältigen, die Prognose bestimmenden Aspekte für die klinische Anwendung zusammenzufassen (Auslander et al. 2018). Auch wenn dieser noch einer Validierung bedarf, weist er dennoch auf die Notwendigkeit einer tumorspezifischen Vorhersage hin.

## **3. Bildgebungsmodalitäten im Rahmen von Immuntherapien bei malignen Tumoren**

### **3.1 Anforderungen an die Bildgebung bei immunbasierten Tumortherapien**

Für die Bildgebung im Rahmen immunbasierter Tumortherapien sind v. a. zwei Aufgaben denkbar: die Beurteilung des Therapieansprechens und die Vorhersage des Ansprechens vor Behandlung.

Um das Therapieansprechen zu bewerten, stehen, wie auch bei anderen Therapieformen, verschiedene Methoden zur Verfügung. Den Goldstandard stellt die Biopsie mit histologischer Beurteilung dar, welche von genetischen und epigenetischen Analysen, bspw. für IFN $\gamma$ -mRNA (Ayers et al. 2017) oder den Transkriptionsfaktor TCF7, begleitet werden kann (Sade-Feldman et al. 2018), die auf das zu erwartende Ansprechen hinweisen können. Da das Biopsieren einen operativen Eingriff darstellt, wären alternative nicht-invasive Methoden mit gleichem Informationsgehalt wünschenswert. In diesem Zusammenhang wird der sog. „liquid biopsy“ großes Zukunftspotential vorausgesagt. Dass dies auch für den Bereich der Immuntherapien gilt, konnten Gros und Kollegen zeigen: auch wenn der Anteil PD-1<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut gegenüber einer Tumorbiopsie deutlich geringer ist und damit schwer zu detektieren, können dennoch Neoantigen-spezifische Lymphozyten auf im Tumor ansässige CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Lymphozyten schließen lassen (Gros et al. 2016). Da die „liquid biopsy“ nicht nur Zellen, sondern auch zellfreie DNA nachweisen kann, ist sie in der Lage, auch andere relevante Biomarker wie eine dem Tumor zugrundeliegende Mikrosatelliten-Instabilität oder eine hohe Mutationslast zu identifizieren (Georgiadis et al. 2019). Andererseits können Biomarker wie PD-L1 und die Expression potentieller Zielstrukturen auch mittels Bildgebung detektiert werden (Heskamp et al. 2015). Da bekannt ist, dass besonders die Verteilung der T-Zellen im Tumor bzw. an dessen Rand von entscheidender Bedeutung für das Ansprechen ist (Tumeh et al. 2014), kommt derartiger räumlicher Information, wie sie nicht-invasiv besonders durch die Bildgebung gewonnen werden kann, besondere Relevanz zu.

### **3.2 Konventionelle Bildgebungsmethoden**

Bei der Beurteilung des Ansprechens auf unterschiedliche Tumorthapien mittels Bildgebung bilden Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Sonographie die Basis. Als Bewertungsgrundlage bei soliden Tumoren dienen v. a. die „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ (RECIST) in ihrer überarbeiteten Version (Eisenhauer et al. 2009, Schwartz et al. 2016). Dadurch dass die meisten Immuntherapien nicht wie andere Therapien den Tumor primär direkt schädigen, sondern dies indirekt über eine induzierte Immunantwort tun, kann das Therapieansprechen nicht allein durch das Tumolvolumen beurteilt werden (Seymour et al. 2017). Das dabei möglicherweise auftretende Phänomen der Pseudoprogression beschreibt, dass es zunächst im Rahmen eines Immuninfiltrates zu einer Volumenzunahme des Tumors kommt, auf die erst im Verlauf das Schrumpfen des Tumors als Zeichen des Therapieansprechens folgt (Chiou und Burotto 2015). Auch wenn dieses Phänomen selten auftritt, ist es dennoch wichtig, dieses von einem Tumorprogress zu unterscheiden, um die weitere Therapie besser zu steuern. Bei der Therapie mit Pembrolizumab trat es, definiert durch irRC (s. u.), bei 7% der Patienten auf, 2,8% zeigten außerdem sog. „late pseudoprogression“ (Hodi et al. 2016). Nishino und Kollegen detektierten Pseudoprogression bei 4 der 107 untersuchten Patienten (Nishino et al. 2017a). Zusammenfassend wird von einer Rate von ca. 10% beim Melanom und 5% beim NSCLC ausgegangen (Nishino et al. 2017b).

Um also den besonderen Erfordernissen im Rahmen von Immuntherapien wie Pseudoprogression oder verzögertem Ansprechen (Beaver et al. 2018) nachzukommen, wurde eine speziell darauf eingehende Version der RECIST erstellt, die sog. „immune RECIST“ (iRECIST; Seymour et al. 2017), welche insb. das progressionsfreie Überleben besser abschätzt (Park et al. 2021). Bei dieser definieren nur noch neue Läsionen einen Progress, nicht jedoch die Größenzunahme einer vorbekannten Läsion, welche nun vielmehr durch eine weitere Bildgebung verifiziert werden muss (Persigehl et al. 2020, Seymour et al. 2017). Außerdem wurden für die Therapie des metastasierten Melanoms mit Ipilimumab „immune-related response criteria“ (irRC) vorgeschlagen (Wolchok et al. 2009), denen u. a. Konzepte der WHO-Kriterien (Miller et al. 1981) zugrundeliegen. Hier wird im Gegensatz zu den iRECIST nicht jede Läsion einzeln beurteilt, sondern alle Läsionen addiert (Wolchok et al. 2009). Beim Vergleich von konventionellen RECIST-Kriterien und irRC zeigte sich, dass erstere den Nutzen von Pembrolizumab in ca. 15% unterschätzen (Hodi et al. 2016), was die Notwendigkeit einer therapieadaptierten Bewertung der Bildgebung betont. Als Pendant zu den iRECIST für solide Tumoren wurde deshalb auch die Lugano Klassifikation für Lymphome im Rahmen von Immuntherapien angepasst (Cheson et al. 2016).

### **3.3 PET/CT-Bildgebung**

Mit der Positronenemissionstomographie („positron emission tomography“, PET), i. d. R. in Kombination mit CT, steht neben Szintigraphie und Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie („single photon emission computed tomography“, SPECT) eine nuklearmedizinische Technologie zur

Verfügung, mit der die räumliche Darstellung des untersuchten Gewebes mit dessen funktioneller Beurteilung verknüpft werden kann. Je nach Methodik werden hierbei u. a. das Fluor-18-Deoxyglucose (<sup>18</sup>FDG)-PET, das immuno-PET und die Reporter-gen-basierte Bildgebung unterschieden, die im Folgenden näher thematisiert werden.

### **<sup>18</sup>FDG-PET**

Das <sup>18</sup>FDG-PET, welches metabolische Aktivität darstellt, ist zum Staging und der Verlaufskontrolle im Rahmen von Tumorerkrankungen bereits etabliert. Zur Beurteilung werden dabei v. a. die „European Organisation for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC)-Kriterien (Young et al. 1999) und die „PET Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ (PERCIST) (O et al. 2016, Wahl et al. 2009) herangezogen. Auch im Kontext von Immuntherapien kann das <sup>18</sup>FDG-PET als funktionelle Bildgebung genutzt werden (Wong et al. 2017), auch wenn sein Einsatz insofern eingeschränkt ist, als dass eine Differenzierung zwischen Tumorzellen und therapiebedingten Immunzellen anhand der metabolischen Aktivität schwierig scheint (Laing et al. 2010). Es gibt jedoch Hinweise, dass mittels <sup>18</sup>FDG-PET ein Ansprechen auf Immuntherapien bei unterschiedlichen Tumorentitäten bereits zu einem frühen Zeitpunkt mit guter Sensitivität nachgewiesen werden kann (Chen et al. 2020, Dimitrakopoulou-Strauss 2019, Sachpekidis et al. 2020, Seban et al. 2020, Seith et al. 2018). Sachpekidis und Kollegen konnten für Patienten mit metastasiertem Melanom und unterschiedlicher Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren zeigen, dass die Differenzierung der Patienten bezüglich des metabolischen Benefits anhand der „PET Response Evaluation Criteria for Immunotherapy“ (PERCIMT)-Kriterien besser mit dem progressionsfreien Überleben korreliert als die Anwendung der EORTC Kriterien (Sachpekidis et al. 2020). Außerdem konnte sowohl präklinisch (Schwenck et al. 2020) als auch klinisch, wenn auch bei kleinen Fallzahlen, für das Melanom (Anwar et al. 2018, Cho et al. 2017) und das NSCLC (Takada et al. 2019) gezeigt werden, dass anhand einer prätherapeutischen Bildgebung auch Aussagen über das Therapieansprechen möglich sind. Der allgemeine prädiktive Wert von Ausgangsparametern einer <sup>18</sup>FDG-PET/CT-Untersuchung vor Therapiebeginn ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Ayati et al. 2021). Weitere Limitationen ergeben sich außerdem v. a. bei der Differenzierung immunbasierter Phänomene wie der Pseudoprogression (Cho et al. 2017, Wong et al. 2017).

Außer <sup>18</sup>FDG können andere radioaktiv markierte Zellsubstrate wie Fluor-18-arabinofuranosylguanin (<sup>18</sup>F-AraG), das sich besonders stark in aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen anreichert, zur PET-Bildgebung verwendet werden (Levi et al. 2019, Ronald et al. 2017). Ein möglicher prädiktiver Wert dieser Methode konnte im Rahmen einer gegen PD-1 gerichteten Therapie im Mausmodell herausgestellt werden (Levi et al. 2019). Des Weiteren besteht beim adoptiven Zelltransfer die Möglichkeit, die infundierten Zellen z. B. mit <sup>89</sup>Zr-DFO (Lee et al. 2020) zu markieren.

## **Immuno-PET**

Beim immuno-PET wird die Antigenspezifität eines Antikörpers bzw. eines Derivats zur Markierung von Zielstrukturen genutzt, was eine vielfältige Anwendung (Dammes und Peer 2020, Wu 2009) sowie eine gute Auflösung bei großer Sensitivität (Wu und Olafsen 2008) ermöglicht. Durch Humanisierung muriner Antikörper konnte deren Antigenität für die Anwendung am Menschen stark gesenkt werden, was Voraussetzung für die Etablierung dieser Technologie als nuklearmedizinisches Verfahren war (Wu 2009). Parallel trug die Entwicklung pharmakokinetisch vorteilhafter, kleinerer Konstrukte, deren Clearance aus dem Blut durch das Fehlen einer Fc-Region sowie renale Filtration aufgrund des geringeren Molekulargewichts beschleunigt wird, dazu bei, das immuno-PET weiter für die klinische Anwendung zu optimieren (Wu 2009). Als Zielstrukturen kommen grundsätzlich alle durch Antikörper und deren Derivate erkannten Moleküle in Frage. Im Kontext von Immuntherapien können Antikörper und Derivate auf diese Weise einerseits von Effektorzellen sezernierte Moleküle und andererseits immuntherapeutisch stimulierte Zellen wie T-Zellen direkt anhand geeigneter Oberflächenmoleküle visualisieren (s. u.; Krekorian et al. 2019). Auch wenn das immuno-PET bisher im klinischen Kontext hauptsächlich in Studien angewendet wird, ist sein Zukunftspotential dennoch vielversprechend (Bensch et al. 2018, Markovic et al. 2018, Niemeijer et al. 2018, Pandit-Taskar et al. 2020, Xing et al. 2019).

## **Reporter-gen-basierte Bildgebung**

Das Konzept der Reporter-gen-basierten Bildgebung beruht darauf, genetisch modulierte, mit einem Markergen versehene Zielzellen zu detektieren. Dabei sind Kombinationen mit unterschiedlichen Bildgebungsmodalitäten möglich, sodass neben nuklearmedizinischen Verfahren wie PET und SPECT auch optische Bildgebungsmethoden eingesetzt werden können (Li et al. 2018). Da für die Herstellung von TCR- bzw. CAR-modulierten T-Zellen ebenfalls Gene moduliert werden müssen, eignet sich eine derartige Bildgebung besonders für diese immuntherapeutischen Strategien, auch wenn diese aktuell vorwiegend im Tiermodell eingesetzt werden (Dobrenkov et al. 2008, Emami-Shahri et al. 2018, McCracken et al. 2015, Vedvyas et al. 2016). Als Reporter kommen bspw. Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase-codierende Gene zur Anwendung, deren in der Folge exprimiertes Enzym mit einem zugeführten Substrat interagiert, dessen Produkt sich visualisieren lässt (Dobrenkov et al. 2008, Keu et al. 2017). Ein besonderer Vorteil besteht darin, die Bildgebung im Verlauf zu wiederholen (Keu et al. 2017, Vedvyas et al. 2016). Dass diese Methode auch klinisch sicher angewandt werden kann, konnte für Interleukin-13 zetakine CAR-T-Zellen zur Behandlung von hochmalignen Gliomen gezeigt werden (Keu et al. 2017).

Des Weiteren besteht im Rahmen des adoptiven Zelltransfers die Möglichkeit, das Konzept der Reporter-gen-basierten Bildgebung mit dem des immuno-PET zu kombinieren. Die Zellen können über ihre Effektorfunktion hinaus genetisch so verändert werden, dass sie ein Zielprotein für eine immuno-PET-basierte Bildgebung an der Oberfläche exprimieren. Folglich können bspw. T-Zellen, die einen

TCR mit murinem Abschnitt (TCR $\mu$ ) enthalten, von einem entsprechenden Antikörper suffizient an ihrer Wirkungsstelle erkannt werden (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017).

## 4. T-Zell-basierte Bildgebung bei Immuntherapien

### 4.1 Rationale von T-Zell-Tracern und immuno-PET im Kontext von Immuntherapien

Da konventionelle Tumortherapien insb. durch direkte Schädigung des Tumors wirken, wird i. d. R. das Tumolvolumen zur Bewertung des Ansprechens herangezogen (Eisenhauer et al. 2009, Schwartz et al. 2016). So können Tumoren z. B. mittels CT direkt oder über eine funktionelle Bildgebung wie z. B. FDG- oder PSMA-PET beim Prostatakarzinom (von Eyben et al. 2018) dargestellt werden. Da es allerdings bei Immuntherapien zu einer therapiebedingten Anreicherung von Effektorzellen im Tumor kommt, kann eine volumetrische Bestimmung zu einem frühen Zeitpunkt nur schwer zur Therapiebewertung herangezogen werden (Laing et al. 2010). Um gleichzeitig das gesamte Spektrum an immuntherapeutisch behandelten Tumoren mit einer Bildgebung zu erfassen, macht es Sinn, den Fokus von der Darstellung des Tumors auf andere therapeutische Parameter, die ebenfalls ein Ansprechen anzeigen können, zu verlagern. Aufgrund der Breite des Feldes und den unterschiedlichen Konzepten von Immuntherapien bietet sich dazu insb. die Visualisierung der zellulären Therapieakteure an. So können bspw. T-Zellen (Krekorian et al. 2019) oder NK-Zellen (Varani et al. 2019) entweder indirekt über sezernierte Moleküle oder direkt anhand von Oberflächenmolekülen z. B. mittels immuno-PET dargestellt werden.

Das Ziel, insb. T-Zellen darzustellen, fußt auf zwei Konzepten: T-Zellen sind zum einen direkte Effektorzellen für zellbasierte Immuntherapien sowie bei der Immuncheckpoint-Blockade (Ribas und Wolchok 2018, Rosenberg und Restifo 2015) und zum anderen wird ihnen eine Rolle als Biomarker für das Therapieansprechen zugeschrieben (Topalian et al. 2016).

Im Rahmen der unterschiedlichen immuntherapeutischen Konzepte spielen verschiedenste T-Zell-Subpopulationen eine Rolle (Trzonkowski et al. 2009). Neben CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daud et al. 2016a, Tumei et al. 2014) kommt auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine besondere Stellung zu (Alspach et al. 2019, Davids et al. 2016, Kreiter et al. 2015, Mattes et al. 2003, Tran et al. 2014) und besonders das Zusammenwirken von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann für den Therapieerfolg essentiell sein (Borst et al. 2018, Church et al. 2014, Hoepner et al. 2013, Sommermeyer et al. 2016). Immuntherapien scheinen je nach Anwendungsgebiet unterschiedlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der T-Zell-Population zu nehmen. Während es unter der erfolgreichen Therapie mit Ipilimumab nach allogener Stammzelltransplantation zu einer Abnahme der Zahl der CD4<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> kommt (Davids et al. 2016), scheint die Verwendung eines CTLA-4-Blockers bei unterschiedlichen soliden Tumoren keinen Einfluss auf die Zahl an T<sub>Reg</sub> zu nehmen (Sharma et al. 2019). Außerdem ist das Zusammenspiel aus Zellen unterschiedlicher Aktivierungszustände essentiell. So nehmen neben den Effektorzellen auch Gedächtniszellen entscheidend Anteil am Erfolg von Immuntherapien (Chen und Mellman 2017). Das

immuno-PET kann diesbezüglich aufgrund seiner Antigenpezifität T-Zellen im Allgemeinen bzw. entsprechende Subpopulationen zuverlässig detektieren und visualisieren.

#### **4.2 Detektion von durch Effektorzellen sezernierten Molekülen**

Mittels immuno-PET können neben den Zellen selbst auch von Effektorzellen sezernierte Moleküle wie bspw. Granzym B, IFN $\gamma$  oder IL-2 als Zielmoleküle dargestellt werden (Gibson et al. 2018, Larimer et al. 2017, LaSalle et al. 2020, Markovic et al. 2018). Für Granzym ist bekannt, dass es unter Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Johnson et al. 2003, Rooney et al. 2015) und beim Ansprechen auf Immuncheckpoint-Blockade (Herbst et al. 2014, Ji et al. 2012) hochreguliert wird. Die entscheidende Bedeutung der Präsenz von IFN $\gamma$  im Tumormilieu für das Therapieansprechen insb. bei PD-1 Blockade (Ayers et al. 2017) macht dieses ebenfalls zu einem vielversprechenden Marker. So konnten immuno-PET-basierte Bildgebungen für Granzym B bzw. IFN $\gamma$  unter Immuncheckpoint-Blockade bzw. therapeutischer Vakzinierung im *in vivo*-Tumormodel auf ein späteres Ansprechen hinweisen (Gibson et al. 2018, Larimer et al. 2017). Außerdem wurde bereits eine <sup>99m</sup>Tc-IL2 SPECT/CT-Bildgebung an drei mit Ipilimumab bzw. Pembrolizumab behandelten Patienten durchgeführt (Markovic et al. 2018).

#### **4.3 Immuno-PET von T-Zell-Oberflächenmolekülen**

##### **Immuncheckpoint-Moleküle**

Neben der indirekten Detektion von Effektorzellen über sezernierte Moleküle können diese auch direkt bspw. über die von ihnen exprimierten Immuncheckpoint-Moleküle dargestellt werden. So können CTLA-4 (Ehlerding et al. 2017, Ehlerding et al. 2019, Higashikawa et al. 2014), PD-1 (England et al. 2017, England et al. 2018, Natarajan et al. 2017, Niemeijer et al. 2018) oder LAG-3 (Burova et al. 2019) als Zielstrukturen dienen, wobei auch z. T. die therapeutischen Antikörper im Sinne einer theranostischen Anwendung genutzt werden. Der Expressionsnachweis von PD-L1 mittels immuo-PET (Chatterjee et al. 2017, Heskamp et al. 2015, Niemeijer et al. 2018) kann prätherapeutisch auch im Sinne eines Biomarkers für das Therapieansprechen (Herbst et al. 2014, Reck et al. 2016, Topalian et al. 2012, Topalian et al. 2016) fungieren.

Gegen PD-1 und PD-L1 gerichtete Tracer wurden auch bereits in klinischer Anwendung erprobt (Bensch et al. 2018, Niemeijer et al. 2018, Xing et al. 2019). Auf diese Weise konnte bei Patienten mit NSCLC die Verteilung der exprimierten Immuncheckpoint-Moleküle nachvollzogen werden (Niemeijer et al. 2018). Bei der ersten klinischen Anwendung eines <sup>99m</sup>Tc-anti-PD-L1 Nanobodys konnte die tumorale Traceraufnahme nach zwei Stunden mit der Immunhistochemie (IHC)-basierten PD-L1-Expression korreliert werden (Xing et al. 2019). Bensch und Kollegen stellten an 22 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren den prädiktiven Wert einer PET-Bildgebung mit <sup>89</sup>Zr-Atezolizumab vor Therapiebeginn mit selbigem Immuncheckpoint-Inhibitor für das Therapieansprechen heraus (Bensch et al. 2018). Hierbei korrelierte die Traceraufnahme im Tumorgewebe mit dem Ansprechen unabhängig

von Tumorentität und -masse und es konnte eine Überlegenheit gegenüber IHC- oder auf RNA-Sequenzierung basierter Methoden festgestellt werden (Bensch et al. 2018).

### **Moleküle auf T-Zell-Subpopulationen**

Außerdem können für bestimmte T-Zell-Subpopulationen spezifische Oberflächenmoleküle wie CD4 (Freise et al. 2017, Kanwar et al. 2008, Tavaré et al. 2015) oder CD8 (Griessinger et al. 2020, Kristensen et al. 2020, Olafsen et al. 2015, Pandit-Taskar et al. 2020, Rashidian et al. 2017, Seo et al. 2018, Tavaré et al. 2014, Tavaré et al. 2015, Tavaré et al. 2016) mittels immuno-PET erfasst werden. Für die Visualisierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass daraus auf das Therapieansprechen geschlossen werden kann, wobei insb. die Signalverteilung von Relevanz ist (Rashidian et al. 2017). Außerdem wurde ein anti-CD8 Minibody, der zuvor *in vitro* und *in vivo* bei Transfer von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) in NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ* (NSG) Mäuse weder zu T-Zell-Aktivierung noch Depletion geführt hatte (Olafsen et al. 2015), an sechs Patienten ohne gravierende direkte Nebenwirkungen in Folge der Injektion angewandt (Pandit-Taskar et al. 2020).

### **Konstant exprimierte pan-T-Zell-Marker**

Im Gegensatz zu den für bestimmte Subpopulationen von T-Zellen spezifischen Markern bieten pan T-Zell-Marker die Möglichkeit, T-Zellen in ihrer vollen Breite abzubilden, was ihren Einsatzbereich auf einen Großteil immuntherapeutischer Ansätze ausweitet (Borst et al. 2018, Church et al. 2014, Hoepner et al. 2013, Sommermeyer et al. 2016). Als konstant auf T-Zellen exprimierte Zielstrukturen für ein immuno-PET wurden bereits der TCR (Griessinger et al. 2015) und CD3 (Beckford Vera et al. 2018, Larimer et al. 2016, Pektor et al. 2020, Waaijer et al. 2020) im Tiermodell getestet.

## **5. T-Zell-Funktionalität bei bildgebenden Verfahren im Kontext von Immuntherapien**

### **5.1 Anforderungen an T-Zell-Tracer im Rahmen von Immuntherapien**

Da bei der T-Zell-Bildgebung Therapieakteure visualisiert werden, ergeben sich neuartige Anforderungen an die Sicherheit der Tracer. Während Tumor-Tracer ihre Zielstrukturen lediglich nicht aktivieren sollten und durch Kopplung mit entsprechenden Radioisotopen sogar zur Radiotherapie eingesetzt werden, bei der ein Zelluntergang der detektierten Zellen erwünscht ist (von Eyben et al. 2018), dürfen T-Zell-Tracer die Funktion ihrer Zielzellen nicht beeinflussen.

Besonders im Kontext des immuno-PET, bei dem Antikörper bzw. deren Konstrukte als Tracer eingesetzt werden, ist die Überprüfung möglicher funktioneller Effekte des Tracers auf die Therapie von großer Bedeutung, da monoklonale Antikörper depletierende Effekte auf T-Zellen und weitere Immunzellen haben können (Cobbold et al. 1984, Loubaki et al. 2013), die im Kontext von

Immuntherapien von therapeutischer Relevanz sein können. Und auch wenn sezernierte Moleküle wie IFN $\gamma$  oder TNF als Zielstrukturen dienen, ist durch deren Blockade ein entsprechender Funktionsverlust denkbar (Kaplan et al. 1998, Shealey et al. 2008).

Abbildung 2 gibt einen Überblick an Anforderungen, die u. a. bei der Entwicklung eines T-Zell-Tracers zu beachten sind. Eine hohe Spezifität des Tracers für die zu detektierenden Zellen ist zunächst grundlegend. Es wird eine möglichst starke Anreicherung des Tracers im Zielgewebe und schnelle Clearance aus den übrigen Geweben sowie dem Blut angestrebt (Wu und Olafsen 2008). Von Vorteil ist im Kontext von Immuntherapien außerdem eine starke Expression der Zielstruktur insb. auf aktivierten T-Zellen, da diese die Effektorzellen der antitumoralen Immunantwort darstellen (Pardoll 2012, Rosenberg und Restifo 2015). Als weitere allgemeine Forderung bei der Entwicklung eines immunbasierten Tracers spielt eine hohe Affinität des Tracers zur Zielstruktur eine entscheidende Rolle (Wu 2009). Speziell bei der Visualisierung von Therapieakteuren im Rahmen von Immuntherapien kommt hinzu, dass das Binden des Tracers nicht zu einer Veränderung der Funktion der erkannten T-Zellen führen darf (Mayer et al. 2018). Dies schließt bspw. ein, dass weder Apoptose noch Proliferation von T-Zellen induziert werden und der Tracer keinen Einfluss auf deren Aktivierungsgrad oder Zytotoxizität nimmt (Mayer et al. 2018).



**Abbildung 2. Anforderungen an T-Zell-Tracer im Kontext von Immuntherapien.**

## 5.2 Funktionalitätstestung von T-Zell-Tracern in der Literatur

Auch wenn bereits eine große Zahl an Tracern untersucht wurde, wurde die Funktion der T-Zellen in diesem Zusammenhang nur in wenigen, überwiegend präklinischen Modellen geprüft.

Für TCR-modulierte murine T-Zellen zeigten Griessinger und Kollegen *in vitro*, dass ein cOVA-TCR-spezifischer Antikörper bei Bindung an die Zielstruktur unter Komplexbildung internalisiert wird, sodass der TCR nicht mehr an der Oberfläche zur Antigenerkennung zur Verfügung steht und es erst nach 24 Stunden zu dessen oberflächlicher Reexpression kommt (Griessinger et al. 2015). Außerdem beeinflussen sowohl die Radioaktivität des Tracers als auch die Wahl des Chelators die Viabilität der Zielzellen (Griessinger et al. 2015). Dass neben Labeling-bedingten Komponenten auch der antigenspezifische Teil eines Antikörpers bzw. Derivates Einfluss auf die T-Zell-Funktionalität nimmt, wurde für einen gegen die murinisierte Domäne eines in humane T-Zellen eingebrachten TCR gerichteten Antikörper und sein F(ab')<sub>2</sub> Fragment herausgestellt (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017). Dabei erwies sich das F(ab')<sub>2</sub> Fragment im Gegensatz zum Antikörper als größtenteils nicht funktionell einschränkend (Mall et al. 2016). Außerdem konnte bei der *in vivo*-Testung von humanen <sup>89</sup>Zr-DFO gelabelten CAR-T-Zellen eine Einschränkung der Zellproliferationskapazität festgestellt werden (Lee et al. 2020).

Unabhängig vom Kontext der Immuntherapien wurde für die immuno-PET-basierte Anwendung eines gegen murines CD4 gerichteten cys-Diabodys gezeigt, dass es *in vitro* zu einer dosisabhängigen Einschränkung von T-Zell-Proliferation und IFN $\gamma$ -Produktion kommt (Freise et al. 2017). Auch *in vivo* wurde bei einer Tracerdosis von 40  $\mu$ g in den inguinalen Lymphknoten, nicht aber in der Milz, eine reduzierte Proliferationskapazität festgestellt (Freise et al. 2017). Des Weiteren kam es einen Tag nach Tracerinjektion zu einer ebenfalls dosisabhängigen Abnahme der CD4-Expression in unterschiedlichsten lymphatischen Organen, welche sich jedoch nach drei Tagen wieder größtenteils normalisierte (Freise et al. 2017). Ein gegen murines CD3 gerichteter Antikörper beeinflusste zwar *in vivo* die Gesamtzahl an Lymphozyten in der Milz nicht, allerdings wurde dabei eine Abnahme der CD4<sup>+</sup> Fraktion sowie eine veränderte Zusammensetzung der T-Zell-Populationen beobachtet (Beckford Vera et al. 2018). Auch wenn für die bisher bereits an Patienten angewandten Tracer keine schwerwiegenden kurzfristigen Nebenwirkungen festgestellt wurden (Bensch et al. 2018, Markovic et al. 2018, Niemeijer et al. 2018, Pandit-Taskar et al. 2020, Xing et al. 2019), gilt es dennoch auch längerfristige Wirkungen auf den Therapieerfolg, die im Rahmen der Tracerapplikation entstehen können (Mayer et al. 2018), genau zu beobachten und durch eingehende Analyse der Zielstrukturen und Tracer im Vorfeld möglichst auszuschließen.

## 6. Konstant exprimierte pan-T-Zell-Marker und deren Funktion

Als Zielstrukturen für eine immuno-PET-basierte Bildgebung, die auf den meisten T-Zell-Subpopulationen exprimiert werden, bieten sich im Sinne einer pan-T-Zell-Darstellung bspw. CD2,

CD3, CD5 und CD7 an. Im Gegensatz zu den anderen Markern ist CD5 weniger spezifisch für T-Zellen, sondern kommt auch auf B-Zellen vor (Mageed et al. 2012), sodass es hier nicht weiter untersucht wurde. CD3, das bereits als Zielstruktur zur T-Zell-Bildgebung verwendet wurde (Beckford Vera et al. 2018, Larimer et al. 2016), sowie CD2 und CD7 wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung als Zielstrukturen für eine T-Zell-basierte Bildgebung im Kontext von Immuntherapien untersucht (s. a. Mayer et al. 2018). Auf die bereits bekannten Funktionen dieser Oberflächenmoleküle wird im Folgenden genauer eingegangen.

## 6.1 CD3

CD3 ist ein hoch spezifisches Oberflächenmolekül von T-Zellen, das als Korezeptor für den TCR fungiert. Bei der Antigenerkennung durch den TCR kommt es durch Interaktion mit CD3 zur T-Zell-Stimulation (Kuhns et al. 2006, Mariuzza et al. 2020). Der von extrazellulär zugängliche CD3-Komplex setzt sich aus einer  $\epsilon$ -Einheit in Kombination mit einer  $\gamma$ - bzw.  $\delta$ -Kette zusammen, während die  $\zeta$ -Kette im Rahmen der TCR-Antigenerkennung v. a. an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt ist (Kuhns und Badgandi 2012). Neben T-Zellen wird die zytoplasmatische Domäne von CD3 $\epsilon$  auch von NK-Zellen des peripheren Blutes exprimiert (Lanier et al. 1992). Rooney und Kollegen beobachteten eine Hochregulation von CD3 $\epsilon$  auf NK- bzw. zytotoxischen T-Zellen in unterschiedlichsten Tumoren (Rooney et al. 2015).

Gegen CD3 gerichtete Antikörper nehmen im Allgemeinen unspezifischen Einfluss auf die T-Zell-Funktion, der in Abhängigkeit vom Antikörper und dessen Dosis variieren kann (Anasetti et al. 1992, Chang et al. 1982, Holter et al. 1985, Van Wauwe et al. 1980). OKT3, ein muriner gegen humanes CD3 $\epsilon$  gerichteter monoklonaler Antikörper vom Typ IgG2a, der im Folgenden als Positivkontrolle verwendet wurde, wird einerseits aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften bei schweren Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin angewendet (Bonney-Berard und Revillard 1996, Hooks et al. 1991, Knop et al. 2005). Andererseits kann er bei bestimmten Konzentrationen T-Zell-Proliferation und IFN $\gamma$ -Produktion stimulieren und auch F(ab')<sub>2</sub> bzw. F(ab) Fragmente sind, wenn auch bei deutlich höheren Konzentrationen, dazu in der Lage (Chang et al. 1982, Van Wauwe et al. 1980). Aufgrund dieser Eigenschaften lässt sich erklären, dass OKT3 im Folgenden bei den *in vitro*-Experimenten sowohl zur Apoptoseinduktion als auch zur Stimulation von T-Zell-Proliferation im Sinne einer Positivkontrolle verwendet wurde.

Auch für sich alleine nicht T-Zell-stimulierende Antikörper wurden unter bestimmten Bedingungen als mitogen beschrieben (Holter et al. 1985). So können auch andere gegen CD3 gerichtete Antikörper außer OKT3 durch deren Modulation der T-Zell-Funktion therapeutisch bspw. bei Graft-versus-Host-Erkrankung („graft-versus-host-disease“, GvHD) (Anasetti et al. 1992) oder Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden (Kuhn und Weiner 2016). Selbst gegen CD3 gerichtete F(ab')<sub>2</sub> bzw. F(ab) Fragmente erwiesen sich *in vivo* in unterschiedlichsten Anwendungsgebieten als Modulatoren der T-Zell-Funktion (Juraska et al. 2018, Kohm et al. 2005, Sarangi et al. 2008).

## 6.2 CD2

Auch bei CD2 handelt es sich um ein auf Immunzellen exprimiertes Protein mit Rezeptorfunktion. CD2 wird auf T-Zellen, Thymozyten (Howard et al. 1981) und NK-Zellen, bei z. T. unterschiedlicher Funktions- und Regulationsweise exprimiert (Scott et al. 1989). Zudem kommt es bei unterschiedlichsten Tumorentitäten zu einer gesteigerten Expression von CD2 auf NK- und zytotoxischen T-Zellen (Rooney et al. 2015).

CD2 setzt sich aus drei Immunglobulin-artigen Domänen (T11.1, T11.2 und T11.3) zusammen, die jeweils durch Antikörper erkannt werden können (Meuer et al. 1984). T11.1 dient der Interaktion mit CD58 und T11.3 wird ausschließlich unter T-Zell-Aktivierung oberflächlich und damit einem Antikörper zugänglich exprimiert (Bierer und Hahn 1993, Meuer et al. 1984). Durch Interaktion zwischen CD2 und CD58 kommt es zur Adhäsion der die Rezeptoren exprimierenden Zellen als Bestandteil der Aktivierung von T-Zellen (Bierer et al. 1988, Hahn et al. 1993, Hunig et al. 1987, Moingeon et al. 1989) und NK-Zellen (Bryceson et al. 2006, Rolle et al. 2016).

Für gegen CD2 gerichtete Antikörper ist beschrieben, dass die Anwendung von gegen T11.1 bzw. T11.2 gerichteten Antikörpern im Gegensatz zur gleichzeitigen Verwendung mit einem gegen T11.3 gerichteten Antikörper nicht zur T-Zell-Stimulation führt (Meuer et al. 1984). Die Applikation eines gegen murines CD2 gerichteten Antikörpers und seines F(ab)<sub>2</sub> Fragmentes während des Antigenprimings führte allerdings zum Funktionsverlust von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten *in vivo* (Gückel et al. 1991). Dabei scheint es insb. zur Depletion von über den TCR/CD3-Komplex aktivierten T-Zellen zu kommen (Dumont et al. 1998, Xu et al. 2004).

Die im Folgenden bezüglich ihrer Eignung als T-Zell-Marker getesteten Antikörper der Klone OKT11 (Verbi et al. 1982) und UMD2 (Kozarsky et al. 1993) binden an das Epitop T11.1. Auch wenn für OKT11 (anti-CD2)-IgG in *in vitro*-Experimenten eine supprimierende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation beschrieben wurde, erwies sich diese jedoch als dosisabhängig (Van Wauwe et al. 1981), weshalb dieser hier dennoch zur T-Zell-Bildgebung getestet wurde.

## 6.3 CD7

Das Oberflächenprotein CD7 findet sich auf T-Zellen, NK-Zellen sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen (Stillwell und Bierer 2001) und zeigt dabei einen z. T. sehr variablen Expressionsgrad in Abhängigkeit vom T-Zell-Subtyp (Aandahl et al. 2003). Die stark CD7 exprimierende CD8<sup>+</sup> Population an T-Zellen umfasst v. a. naive und Gedächtniszellen, welche im Gegensatz zu den nur gering CD7 exprimierenden bzw. CD7<sup>-</sup> Zellen weniger Granzym A und Perforin bilden, sich jedoch durch eine deutlich höhere Proliferationskapazität auszeichnen (Aandahl et al. 2003). CD3<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup> PBMC, die 9% der PBMC ausmachen, bestehen überwiegend aus CD4<sup>+</sup> Helfer-Gedächtniszellen (Reinhold et al. 1996). Insgesamt ist deshalb davon auszugehen, dass CD7<sup>-</sup> Zellen auf einen späten

Zeitpunkt der Immunantwort hinweisen (Aandahl et al. 2003, Reinhold et al. 1996). Im Kontext von Tumoren ist besonders die Expression von CD7 auf Lymphomen hervorzuheben.

Über die Funktion von CD7 ist bis jetzt nur wenig bekannt. Während der T-Zell-Entwicklung ist CD7 an Interaktionen unter T-Zellen und mit B-Zellen beteiligt, im Verlauf scheint es als Kostimulator zu fungieren (Stillwell und Bierer 2001). Im Tiermodell bedingte seine Abwesenheit keine wesentlichen Einschränkungen der T-Zell-Funktion (Bonilla et al. 1997, Lee et al. 1998), wobei allerdings unter Antigenstimulation mit OVA-Peptid eine eingeschränkte Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen festgestellt werden konnte (Lee et al. 1998). Im Folgenden wurden die gegen CD7 gerichteten Antikörper der Klone T3-3A1 und 4H9 untersucht.

## **Problemstellung**

Trotz stetiger Zunahme der immuntherapeutischen Anwendungsgebiete in der Onkologie besteht weiterhin ein Defizit an suffizienten, leicht klinisch praktikablen Methoden zur Vorhersage und Beurteilung des Therapieansprechens mit all seinen Facetten wie spätes Ansprechen oder Pseudoprogression. Die immuno-PET-basierte Bildgebung, welche eine hohe Affinität des Tracers zur Zielstruktur mit hoher räumlicher Auflösung kombiniert (Wu und Olafsen 2008), erscheint durch Visualisierung der T-Zellen als Effektorzellen geeignet, diese Lücke zu schließen. In diesem Sinne wurden verschiedene Oberflächenmarker von T-Zellen (CD2, CD3 und CD7) bezüglich ihrer Eignung als Zielstrukturen zur Tracerentwicklung untersucht. Der Prüfung potentieller funktioneller Effekte kam dabei zentrale Bedeutung zu, da durch eine rein diagnostische Bildgebung im Kontext von Immuntherapien der Therapieerfolg nicht beeinflusst werden sollte.

## Material

### 1. Puffer, Medien, Antikörper für die Durchflusszytometrie und weitere Reagenzien

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Anwendung</b>
<b>Durchflusszytometrie</b>		
Ammoniumchlorid-Kalium (ACK)-Lysepuffer	s. Herstellerangaben (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. A1049201)	Erythrozytenlyse <i>ex vivo</i>
FACS-Puffer	Herstellung aus: - DPBS (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 14190144) - 1% v/v 20 min bei 58 °C inaktiviertes fetales Kälberserum ( $\Delta$ FCS; Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 11573397)	Waschschritte
Fixierpuffer (1 % Paraformaldehyd)	Herstellung aus 4% Formaldehyd (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 15670799) in DPBS	Fixierung
Bindungspuffer	Herstellung aus - 10 mM HEPES (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 15630106) - 140 mM NaCl (Sigma Aldrich; S9888) - 2.5 mM CaCl <sub>2</sub> (Sigma Aldrich; C1016) pH 7.4	Untersuchung auf Apoptose
Stripping-Puffer	Herstellung aus: - DMEM (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 11584486) - 0,2% v/v BSA bei pH 3.5	Untersuchung auf Internalisierung
<b>ELISA</b>		
Coating-Puffer	Herstellung aus - 100 mM NaHCO <sub>3</sub> und - 30 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O bei pH 9.5	Coating
Waschpuffer	Herstellung aus DPBS und 0,02% v/v Tween20 (Sigma Aldrich; P1379)	Waschschritte
<b>T<sub>CM</sub>-Isolationspuffer</b>	Herstellung aus - DPBS - 0.2% v/v $\Delta$ FCS	Magnetische Zellseparation (MACS-Isolation) von T <sub>CM</sub>

	- 2 mM EDTA (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 15575020)	
<b>RetroNectin-Lösung</b>	DPBS, 12 µg/mL RetroNectin (Takara; T100B)	Coating für Transduktion
<b><i>89Zr-Labeling</i></b>	<i>durchgeführt von Nahid Yusufi, Lisa Russell und Francesco de Rose von der Klinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar</i>	
<i>Natriumacetat, Natriumbikarbonat, Elutionspuffer, Phosphatpuffer</i>		

**Tabelle 2. Puffer.**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Anwendung</b>
AIM-V	s. Herstellerangaben (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 12055091)	Lösung von hIL-2, hIL-7 und h-IL-15
cRPMI (“complete RPMI”)	RPMI (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 21875091) mit - 10% v/v ΔFCS - Natriumpyruvat (1 mM; Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 11360070) - L-Glutamin (2 mM; Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 25030081) - nicht-essentielle Aminosäuren (10 mM; Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 12084947) - Penicillin-Streptomycin (100 IU/mL; Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 15140122)	Kultur von ML2-Tumorzellen
Hybridom-Medium	RPMI mit - 5% v/v ultra low IgG ΔFCS (Thermofisher Scientific; Katalog-Nr. 16250078) - L-Glutamin (2 mM) - nicht-essentielle Aminosäuren (10 mM) - Penicillin/Streptomycin (100 IU/mL)	Kultur von Hybridomzellen
T-Zell-Medium	RPMI mit - 5% v/v ΔFCS - 5% v/v 20 min bei 58 °C inaktiviertes, von gesunden Spendern gewonnenes Humanserum (ΔHS) - Natriumpyruvat (1 mM) - L-Glutamin (2 mM)	Kultur von PBMC und T <sub>CM</sub>

	- nicht-essentielle Aminosäuren (10 mM) - HEPES (10 mM) - Penicillin/Streptomycin (100 IU/mL) und Gentamycin (16 µg/mL; Sigma-Aldrich; G1397)	
cDMEM ("complete DMEM")	DMEM mit gleichen Zusätzen wie cRPMI (s. o.)	Kultur von RD114-Zellen
Bindungsmedium	DPBS mit 2% v/v bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich; 05470)	Blockierung von RetroNectin-gecoateten Platten für Transduktion
Einfriermedium	ΔFCS mit 10% v/v DMSO (Sigma-Aldrich, D8418)	Einfrieren von Zellen
"Cell loading Medium"	DPBS mit 2% v/v ΔFCS	CTV-Färbung

**Tabelle 3. Medien.**

<b>Antikörper Durchflusszytometrie</b>	<b>Klone</b>	<b>Firma</b>
α-hCD2	RPA-2.10; 39C1.5	BioLegend, San Diego, USA BD Biosciences, San Jose, USA
α-hCD3	UCHT-1; HIT3a	BD Biosciences
α-hCD4	RPA-T4	BD Biosciences
α-hCD5	BL1a	Beckman Coulter
α-hCD7	8H8.1	Beckman Coulter
α-hCD8	RPA-T8	BD Biosciences
α-hCD14	M5E2	BD Biosciences
α-hCD20	2H7	BD Biosciences
α-hCD25	BC96	Thermofisher Scientific
α-hCD33	WM53	BD Biosciences
α-hCD45	J.33	BD Biosciences
α-hCD45RA	HI100	BD Biosciences
α-hCD45RO	UCHL1	BD Biosciences
α-hCD56	CMSSB	Thermofisher Scientific
α-hCD62L	DREG-56	BD Biosciences
α-hCD127	A019D5	BioLegend

$\alpha$ -mTCR $\beta$ (TCRmu)	H57-597	BD Biosciences
goat $\alpha$ -mIgG (minimal x-reactivity)	polyklonal	BioLegend
Isotypkontrollen	MOPC-21, X40	BD Biosciences

**Tabelle 4. Antikörper für die Durchflusszytometrie.**

<b>weitere Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	Desinfektion
Biocoll-Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland	Isolation von PBMC
Trypanblau	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	Zellfärbung für Mikroskopie
humane Zytokine (hIL-2, h-IL-7 und h-IL-15)	PeproTech, London, Vereinigtes Königreich	Zytokine zur T-Zell-Stimulation
TransIT-293 Transfektionsreagenz	Mirus, Madison, USA	Transfektion
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Apoptosefärbung
Annexin V	BD Biosciences	Apoptosefärbung
Isopropanol	Merck	Einfrierbehälter
Isofluran	CP Pharma, Burgendorf, Deutschland	Anästhesie von Mäusen
Milchpulver	Sigma-Aldrich	ELISA: Blockierung
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1 M)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany	ELISA: Abstoppen der Substratreaktion
Protaminsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, France	Transduktion
<i>Protein A Sepharose</i>	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>	<i>Aufreinigung von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten</i>
<i>Desferrioxamine (DFO-Bz-NCS)</i>	<i>Macrocyclics, Dallas, USA</i>	<i>Konjugation der F(ab')<sub>2</sub> Fragmente für <sup>89</sup>Zr-Labeling</i>
<i>Zirkonium-89 (<sup>89</sup>Zr)</i>	<i>BV Cyclotron VU, Amsterdam</i>	<i>Radioaktives Labeling von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten</i>

**Tabelle 5. Weitere Reagenzien.** Kursiv sind die Reagenzien dargestellt, die durch Nahid Yusufi, Lisa Russelli und Francesco de Rose von der Klinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar verwendet wurden.

## 2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilwerkbank	ThermoFisher Scientific
Auflichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Lancing, Vereinigtes Königreich
Kühlschränke (4 °C) und Gefrierschränke (-20 °C und -80 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Zellkulturinkubatoren	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Mixer	Karl Roth
Zentrifugen	Hettich, Kirchlingern, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000	ThermoFisher Scientific
Nanophotometer	Implen, München, Deutschland
Sunrise Fotometer	Tecan, Männedorf, Schweiz
Tierbestrahlungskammer	Gulmay, Krefeld, Deutschland
Inveon small animal PET/CT Scanner	Siemens, Knoxville, USA
Gammacounter 2480Wizard2	PerkinElmer, Waltham, USA
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences
Pipettierhelfer	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µL, Multipette)	Eppendorf

**Tabelle 6. Geräte.**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkulturflaschen (T25, T75 und T175)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturtestplatten (6-, 12-, 24- und 96-well; U- und F-Boden)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Nunc MaxiSorp ELISA-Platten	ThermoFisher Scientific
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Karl Roth
Sterile serologische Pipetten	Greiner Bio-One
Spritzenfilter (0,45 µm)	TPP
Reaktionsgefäße „Safe-Lock Tubes“ (1,5 und 2,0 mL)	Eppendorf

Kryoröhrchen	ThermoFisher Scientific
Amicon Ultra-0.5 Zentrifugen- filtereinheiten mit Ultracel-50 Membran	Merck Millipore, Burlington, USA
Zellsiebe 40 µm	ThermoFisher Scientific
PE Fluorescence Quantification Kit	BD Biosciences
Pacific Blue Monoclonal Antibody Labeling Kit	ThermoFisher Scientific
CellTrace Violet Cell Proliferation Kit	ThermoFisher Scientific
Human IFN-Enzyme-linked immunosorbent assay Set	BD Biosciences
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
AccuCheck Counting Beads	ThermoFisher Scientific
QiAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
<i>F(ab')<sub>2</sub> Preparation Kit</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>

**Tabelle 7. Verbrauchsmaterialien.** Kursiv sind die Materialien dargestellt, die durch Nahid Yusufi, und Lisa Russelli von der Klinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar verwendet wurden.

### 3. Zellmaterial und getestete Antikörper

#### 3.1 Zellmaterial

Aus dem Blut gesunder Spender wurden PBMC isoliert, welche entweder kultiviert oder aus denen weiter zentrale Gedächtnis-T-Zellen („central memory T-Zellen“, T<sub>CM</sub>) gewonnen wurden. T<sub>CM</sub> wurden anschließend mit dem MPO<sub>5</sub>-spezifischen T-Zell-Rezeptor TCR2.5D6 sowie ggf. iRFP („red fluorescent protein“) (TCR2.5D6(iRFP) T<sub>CM</sub>) bzw. als Kontrolle ausschließlich mit iRFP (iRFP T<sub>CM</sub>) transduziert (Klar et al. 2014, Mall et al. 2016).

Als Tumormodell zur T-Zell-Funktionalitätsprüfung wurde die humane AML-Zelllinie ML2 verwendet. Die mit HLA-B\*07:02 und enhanced GFP („green fluorescent protein“) transduzierte Zelllinie (ML2-B7) wird von TCR2.5D6 T-Zellen erkannt, was für ML2 HLA-B\*15:01 und enhanced GFP transduzierte Tumorzellen (ML2-B15) nicht der Fall ist (Klar et al. 2014, Mall et al. 2016).

Mit Ausnahme des „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) und der *ex vivo*-Biodistribution der Tierversuche wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Transduktionen wurden gemäß S2-Richtlinien durchgeführt. Im Allgemeinen wurde, wenn nicht anders erwähnt, bei 500 g für 5 min unter Raumtemperatur zentrifugiert.

### 3.2 Getestete Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente

Zunächst wurden verschiedene monoklonale Antikörper mit Spezifität für humanes CD2, CD3 und CD7 getestet (Tab. 8). Bei diesen handelt es sich ausschließlich um murine Antikörper, um eine Kreuzreaktivität im *in vivo*-Mausmodell zu verhindern.

Als Kontrollen wurden murine Isotypantikörper der Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b (alle Thermofisher Scientific) sowie OKT3 (anti-CD3, Thermofisher Scientific) als Positivkontrolle verwendet.

Des Weiteren wurde ein gegen CD7 gerichteter Nanobody (zur Verfügung gestellt durch Nick Devoogdt, Vrije Universität Brüssel) auf Induktion von Zellapoptose an von PBMC abgeleiteten T-Zellen untersucht.

Zielstruktur	Antikörperklon (Isotyp)	Firma/Zulieferer	Artikel-Nr.
<b>CD2</b>	OKT11 (mIgG1)	Hybridom (s. u.) Caprico Biotechnologies, Norcross, USA	100201
	UMCD2 (mIgG2a)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab194406
<b>CD3</b>	BC3 (mIgG2b)	BioLegend	830301
	VIT3b (mIgG1)	Universität Wien	-
	OKT3 (mIgG2a)	BioLegend	317302
<b>CD7</b>	T3-3A1 (mIgG1 und mIgG2a)	Hybridom (s. u.) Bio-Techne, Minneapolis, USA	NBP2-54901
	4H9 (mIgG2a)	Caprico Biotechnologies, Norcross, USA	103001

**Tabelle 8. Getestete Antikörper für die Zielstrukturen CD2, CD3 und CD7.**

## Methodik

### 1. Zellisolation, -kultur und Transduktion

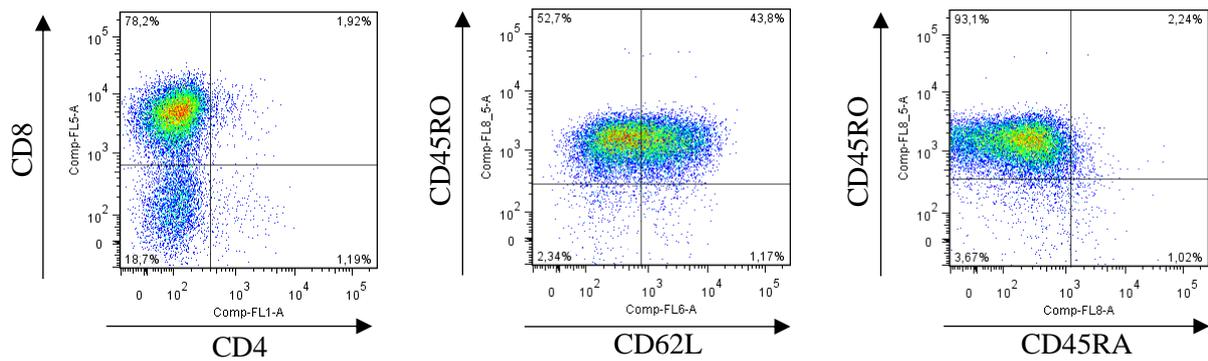
#### Isolation von PBMC

PBMC wurden mit Hilfe von Biocoll-Trennlösung aus frischem humanem Spenderblut isoliert. Dazu wurde das Blut zunächst mit RPMI im Verhältnis 1:1 gemischt und 35 mL der entstandenen Suspension vorsichtig auf 15 mL in einem 50 mL Falcon vorgelegte Trennlösung geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 880 g ohne Bremse wurde die Lymphozyten enthaltende Zwischenphase abgenommen und mit RPMI gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. u.) wurden die PBMC dann entweder direkt stimuliert und kultiviert oder weiter zur Isolation von T<sub>CM</sub> genutzt.

#### Isolation von CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>CM</sub>

Für die *in vivo*-Experimente und zur Bestimmung der Zytotoxizität von T-Zellen *in vitro* wurde eine Subpopulation von PBMC, nämlich CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> verwendet, die mit dem TCR2.5D6 transduziert wurden (Mall et al. 2016, Mayer et al. 2018). Von CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>, die CD62L und CD45RO exprimieren, nicht aber CD45RA (CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>CM</sub>), ist bekannt, dass sie sich für die Expansion im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers *in vivo* besonders eignen (Berger et al. 2008, Busch et al. 2016).

Für deren Isolation wurden mit Hilfe magnetischer Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben in einem ersten Schritt die CD4<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> Zellen depletiert und danach die CD62L<sup>+</sup> Zellen angereichert (Mall et al. 2016, Mayer et al. 2018). Zur Markierung mit CD4-APC/CD45RA-APC wurden  $3 \times 10^8$  PBMC in 800 µL Isolationspuffer suspendiert und je 100 µL anti-CD4-APC und anti-CD45RA-APC Antikörper hinzugefügt. Die Zellen wurden so 15 Minuten bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert und dann mit Isolationspuffer gewaschen, bevor sie anschließend in 80 µL Isolationspuffer mit 20 µL anti-APC beads (Miltenyi Biotec) pro  $10^7$  Zellen resuspendiert wurden. Nach erneutem Inkubieren und Waschen wurden die in Isolationspuffer suspendierten Zellen auf eine LD Säule (Miltenyi Biotec) aufgebracht und zusammen mit weiteren 500 µL Isolationspuffer durch diese gemäß den Herstellerangaben hindurchgedrückt. Die hindurchgeflossene Fraktion (CD4<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) wurde im Folgenden weiterverwendet. Je  $10^7$  Zellen wurden in 80 µL Isolationspuffer und 20 µL anti-CD62L-PE Antikörper suspendiert und inkubiert wie oben beschrieben. Es folgten Waschschrte (s. o.) und die Inkubation mit 80 µL Isolationspuffer und 20 µL anti-PE beads (Miltenyi Biotec) pro  $10^7$  Zellen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 500 µL Isolationspuffer aufgenommen und auf eine MS Säule (ebenfalls Miltenyi Biotec) aufgegeben. Im Gegensatz zur vorangegangenen Depletion wurde nun das Eluat (CD4<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup>) gewonnen, gezählt und aktiviert. Der Erfolg der Isolation wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (Abb. 3).



**Abbildung 3. Isolation von  $CD8^+CD62L^+CD45RO^+CD45RA^-$   $T_{CM}$ .** Unter den lebenden Zellen wurde der Erfolg der  $T_{CM}$ -Isolation anhand der Marker CD8, CD45RO, CD62L und CD45RA bestimmt.

### T-Zell-Aktivierung und Kultur

Nach der Isolation wurden die PBMC bzw.  $T_{CM}$  bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in T-Zell-Medium suspendiert. Während das Medium für PBMC mit 50 ng/mL OKT3 und 30 IU/mL hIL-2 versetzt wurde, enthielt das  $T_{CM}$ -Medium zuvor gewaschene CD3/CD28 Beads (ThermoFisher Scientific) in einem Verhältnis von 1:1 (25  $\mu$ L Lösung an Beads pro  $1 \times 10^6$  Zellen) und 30 IU/mL hIL-2 (Mayer et al. 2018). Die PBMC wurden in geeignete Zellkulturflaschen gefüllt, während  $2 \times 10^6$  Zellen  $T_{CM}$  pro Vertiefung auf einer 12-well Platte ausgesät wurden. Die Zellen wurden dann für zwei Tage im Inkubator bei 37 °C und 0,05%  $CO_2$  gelagert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit hIL-7 und hIL-15 (jeweils 5 ng/mL in AIM-V) bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL T-Zell-Medium in Zellkulturflaschen geeigneter Größe kultiviert. Auf diese Weise wurden von den ursprünglich isolierten PBMC die T-Zellen angereichert, welche im Folgenden als von PBMC abgeleitete T-Zellen bezeichnet werden.

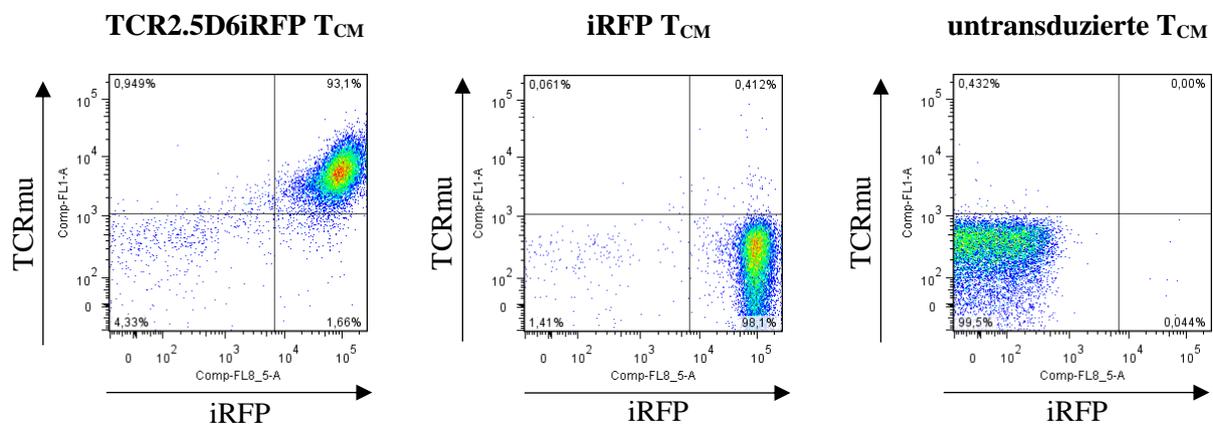
### Retrovirale Transduktion von $T_{CM}$

#### a. Transfektion

Zur Virusproduktion wurden die semiadhärenten RD114 Zellen verwendet, die in cDMEM kultiviert wurden und in deren Genom bereits die Genabschnitte “gag-pol” und “env” integriert sind. Am Vorabend bzw. mindestens sieben Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von  $15 \times 10^4$  Zellen/mL cDMEM auf einer vorbehandelten 6-well-Platte ausgesät (3,2 mL/well). Für die Transfektion wurden 9  $\mu$ L des zuvor gut durchgemischten Transfektionsreagenz TransIT-293 mit 200  $\mu$ L serumfreiem DMEM gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im folgenden Schritt wurde 1  $\mu$ g DNA des Vektors pMP71 hinzugefügt, der jeweils das zu transduzierende Gen TCR2.5D6iRFP bzw. iRFP enthielt (Klar et al. 2014, Mall et al. 2016, Mayer et al. 2018). Nach effizientem Durchmischen wurde die Suspension 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise 200  $\mu$ L auf die RD114 Zellen gegeben. Nach zwei Tagen konnte der Retrovirus enthaltende Überstand zur Transduktion verwendet werden.

## b. Transduktion von T<sub>CM</sub>

Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden zwei aufeinander folgende Transduktionen durchgeführt. Am Tag vor der ersten Transduktion wurden unbehandelte 24-well-Platten mit 400 µL RetroNectin-Lösung pro Well benetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das RetroNectin abgenommen und 500 µl steril filtriertes Bindungsmedium zur Blockierung aufgebracht. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde jedes Well zweifach mit 2 mL DPBS (2,5% v/v HEPES) gewaschen, bevor je  $1 \times 10^6$  T<sub>CM</sub> darauf ausgesät wurden. Die Zellen waren zuvor vorbereitet worden, indem je  $1 \times 10^6$  in 1 mL T-Zell-Medium mit 50 IU/mL hIL-2, 1% HEPES und 4 µg/mL Protaminsulfat (Konzentrationen jeweils für ein Endvolumen von 2 ml berechnet) suspendiert wurden. Anschließend wurde auf die ausgesäten Zellen pro Well 1 mL gefilterter Virusüberstand getropft. Die Platte wurde dann für 90 Minuten bei 820 g und 32 °C ohne Bremse zentrifugiert und anschließend in den Zellinkubator gestellt. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1:2 gesplittet und alle Transduktionsschritte wie oben beschrieben wiederholt. Einen weiteren Tag später wurde das Medium durch T-Zell-Medium mit hIL-7 und hIL-15 (jeweils 5 ng/mL) bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL ersetzt und die Zellen kultiviert. Die Transduktionseffizienz wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Menge an Virushüllbestandteilen im Überstand mittels QiAmp Viral RNA Mini Kit und Messung der RNA Konzentration am NanoDrop ermittelt, um die Zellen vor Injektion in die Tiere auf das Sicherheitslevel S1 herunterzustufen.



**Abbildung 4. Transduktion von T<sub>CM</sub>.** Nach der Transduktion wurden TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub>, iRFP T<sub>CM</sub> und untransduzierte T<sub>CM</sub> hinsichtlich ihrer Expression von TCRmu und auf Fluoreszenz durch iRFP untersucht.

## Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein gut durchmisches, kleines Volumen Zellsuspension in 4%-iger Trypanblau-Lösung verdünnt, um vitale von apoptotischen Zellen zu differenzieren. Zur Zählung der aus frisch abgenommenem Blut isolierten PBMC wurde eine zusätzlich mit 3% Essigsäure

zur Erythrozytenlyse versetzte Trypanblau-Lösung verwendet. Nach Einbringen der gefärbten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer wurde die Zellkonzentration  $c$  wie folgt berechnet:

$$c \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Anzahl an lebenden Zellen in allen Kammern}}{\text{Anzahl an Kammern}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellen wurden die zentrifugierten Zellen in 1 mL Einfriermedium suspendiert, in Kryotubes gefüllt und anschließend in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß (ThermoFisher Scientific) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für zwei Tage gelagert. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen zunächst in einem Wasserbad erwärmt. Nach dem Lösen des gefrorenen Teils von der Gefäßwand wurde die Suspension zu 10 mL RPMI hinzugegeben. Nach Zentrifugation wurden die abgesetzten Zellen in einem geeigneten Medium aufgenommen und in Kulturflaschen gefüllt.

### **Kultivieren von ML2-Zellen**

Die Tumorzelllinie ML2 wurde in cRPMI bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL kultiviert.

## **2. Präparation der getesteten Antikörper und $\text{F(ab}')_2$ Fragmente**

### **Antikörpertransfer in neutrales Medium**

Viele der kommerziell erworbenen Antikörper sind wegen der besseren Haltbarkeit in DPBS mit Natriumazid ( $\text{pH} \sim 7.4$ ) gelöst. Um durch den sauren Aspekt von Natriumazid bedingte Effekte auf die T-Zell-Funktionalitätsversuche zu vermeiden, wurde das Medium zuvor durch reines DPBS ersetzt. Dazu wurden Zentrifugenfiltereinheiten verwendet, die durch ihr molekulares Gewichtslimit von 50 kDa Antikörper zurückhalten. Die Antikörperlösung wurde auf eine auf ein Reaktionsgefäß aufgesteckte Filtereinheit gegeben. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1300 rpm wurde das Reaktionsgefäß durch ein neues ersetzt und 400  $\mu\text{l}$  steriles DPBS zum Waschen auf die Filtereinheit gegeben. Auf eine erneute Zentrifugation folgte wiederum ein Austausch des Reaktionsgefäßes, wobei die Filtereinheit diesmal andersherum auf das Reaktionsgefäß aufgesteckt wurde, sodass der in der Filtereinheit gesammelte Antikörper aus dieser entfernt und nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1300 rpm im Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Danach war die gesamte Menge an Antikörper in einem Volumen von etwa 40  $\mu\text{l}$  konzentriert und konnte durch entsprechendes Hinzufügen von sterilem DPBS auf die gewünschte Konzentration gebracht werden. Die exakte Proteinkonzentration wurde anschließend mittels Nanophotometer bestimmt und die Antikörper bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Kultivierung von Hybridomzelllinien und Gewinn von Antikörpern**

Die Antikörper der Klone OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) wurden außerdem aus dem Überstand der Hybridomzelllinien P3X63Ag8 (Sigma Aldrich) und HB-2 (ATCC, Manassas, USA) isoliert (Mayer et al. 2018), die in Hybridom-Medium kultiviert und alle zwei bis drei Tagen gesplittet wurden, um beste Wachstumsbedingungen zu schaffen. Als ein Gesamtvolumen von sieben Litern erreicht war, wurde kein weiteres Medium hinzugefügt und so die Apoptose der Zellen herbeigeführt, unter welcher es zur Freisetzung der produzierten Antikörper kommt. Andrew Flatley vom Helmholtz-Zentrum München reinigte die in den Überständen enthaltenen Antikörper auf.

### **Produktion von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten**

Nahid Yusufi und Lisa Russelli von der Klinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar stellten aus OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) Antikörpern (OKT11 (anti-CD2)-IgG und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG) F(ab')<sub>2</sub> Fragmente her (Mayer et al. 2018). Dazu verwendeten sie ein „F(ab')<sub>2</sub> Preparation Kit“ auf Basis des Disulfidbrücken schneidenden Pepsins. Die Reinheit der Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurde mittels Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („size-exclusion high performance liquid chromatography“; SE-HPLC) ermittelt (s. Abb. S5A-B in Mayer et al. 2018).

### **Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten**

OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente sowie OKT3 (anti-CD3) Antikörper (OKT3 (anti-CD3)-IgG) wurden mittels „Pacific Blue Monoclonal Antibody Labeling Kit“ gemäß den Herstellerangaben mit Pacific Blue markiert, um deren Dissoziationskonstanten möglichst präzise zu bestimmen (Mayer et al. 2018). So wurde für die Konjugationsreaktion 1 M Natriumbicarbonatlösung in deionisiertem Wasser (pH 8–9) vorbereitet, 10 µl zu 100 µl Antikörper oder F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Konzentration: 1 mg/mL in DPBS) hinzugegeben und in ein Färbereagenz enthaltendes Reaktionsgefäß gefüllt. Über eine Stunde wurde dann das Reaktionsgefäß alle zehn bis 15 Minuten gewendet, um ein vollständiges Vermischen sicherzustellen. Auf den Reinigungsschritt mit der beigelegten Säule, der zu massivem Proteinverlust führte, wurde entgegen den Herstellerangaben verzichtet. Die Fluoreszenz-markierten Antikörper bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden anschließend bei 4 °C gelagert und Proteinkonzentration sowie die durchschnittliche Anzahl an Fluoreszenzmolekülen pro Antikörper bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Markierungseffizienz) mittels Nanophotometer gemessen (Tab. 9).

### 3. Funktionelle *in vitro*-Charakterisierung von Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten

#### 3.1 Durchflusszytometrie

Unterschiedliche Zellmengen ( $1 \times 10^5$  -  $4 \times 10^6$ ) wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern bezüglich verschiedener Oberflächenantigene für die durchflusszytometrische Analyse angefärbt, wobei alle Schritte auf Eis durchgeführt wurden. Zu Beginn wurden die Zellen zentrifugiert und die Fc-Rezeptoren durch zehnmünütige Inkubation mit 50 µl ΔHS pro Probe blockiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen, die sich in 50 µl Volumen befanden, mit 1,5 µl der entsprechenden Antikörper (s. Tab. 4) sowie 7-AAD (finale Konzentration 5 ng/µl) versetzt. Durch Vortexen wurden die Proben effizient gemischt und anschließend für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit 100 oder 200 µl Fixierpuffer fixiert und dann am Durchflusszytometer LSRII analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJoSoftware7.6.5.

#### 3.2 Expressionsanalyse der Zielstrukturen auf PBMC-Subpopulationen

Frisch isolierte PBMC wurden bezüglich ihrer Oberflächenexpression von CD2, CD3 und CD7 auf unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen sowie diversen weiteren Blutzellen untersucht (Mayer et al. 2018). Dazu wurden parallele Färbungen für charakteristische Marker verschiedener Zellpopulationen und bezüglich CD2, CD3 sowie CD7 durchgeführt.

Für die Analyse der T-Zell-Subpopulationen wurden die CD3<sup>+</sup> Zellen zunächst im Hinblick auf die Expression von CD4 und CD8 untersucht, anhand von CD45RA und CD62L T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), T<sub>EFF</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), T<sub>EM</sub> (effector memory T-Zellen; CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) und T<sub>N</sub> (naive T-Zellen; CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) zugeordnet bzw. anhand von CD25 und CD127 als T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) identifiziert sowie im Hinblick auf ihre Expression von CD2, CD3 und CD7 untersucht. Dazu wurde die in der jeweiligen Zellpopulation durchflusszytometrisch ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität („mean fluorescence intensity“, MFI) der Fluorochrome der gegen CD2, CD3 und CD7 gerichteten Antikörper, welche einen Grad für die Anzahl der gebundenen Antikörper und damit die Dichte der durch sie erkannten Zielantigene darstellt, auf eine Isotypkontrolle normalisiert.

Auf gleiche Weise wurden Monozyten (CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>), B-Zellen (CD20<sup>+</sup>), NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>) und NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) hinsichtlich ihrer Expression von CD2, CD3 und CD7 mittels Antikörpern, die an die charakterisierenden Oberflächenmarker binden, untersucht.

#### 3.2 Quantifizierung der Oberflächenexpression der Zielantigene auf spezifisch aktivierten T<sub>CM</sub>

Des Weiteren wurden spezifisch aktivierte T<sub>CM</sub> bezüglich ihrer Expression von CD2, CD3 und CD7 analysiert (Mayer et al. 2018). Dazu wurden TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> mit ML2-B7 Tumorzellen bei 37 °C und 0,05% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten Koinkubationen von iRFP T<sub>CM</sub> mit ML2-B7 und TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> mit ML2-B15 Tumorzellen. Anschließend wurden die Proben mit

für die Zielstrukturen spezifischen Antikörpern angefärbt. Für eine quantitative Analyse wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Werte des geometrischen Mittels („geometric mean“, GM) der jeweiligen Oberflächenmarker zum GM von Quantifizierungsbeads in Relation gesetzt. Zur Vergleichbarkeit der Antikörper wurden die Werte zusätzlich mit der jeweiligen nanophotometrisch bestimmten durchschnittlichen Anzahl an Fluoreszenzmolekülen pro Molekül verrechnet.

### **3.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten**

T<sub>CM</sub> bzw. PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-12}$  -  $1 \times 10^3$  nM) von mit Pacific Blue markierten Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten (s. o.) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert, um ihre Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) zu bestimmen (Mayer et al. 2018). Dazu wurde zuvor eine Reihe an 1:10 Verdünnungen der Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente vorbereitet, um große Unterschiede im gefärbten Volumen zu vermeiden. Die gemessenen Werte der MFI der 7-AAD<sup>-</sup> Zellen wurden dann grafisch in Abhängigkeit von den Antikörper- bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Konzentrationen dargestellt und die  $K_d$  durch nicht-lineare Regressionsanalyse errechnet.

### **3.4 Untersuchung auf Internalisierung**

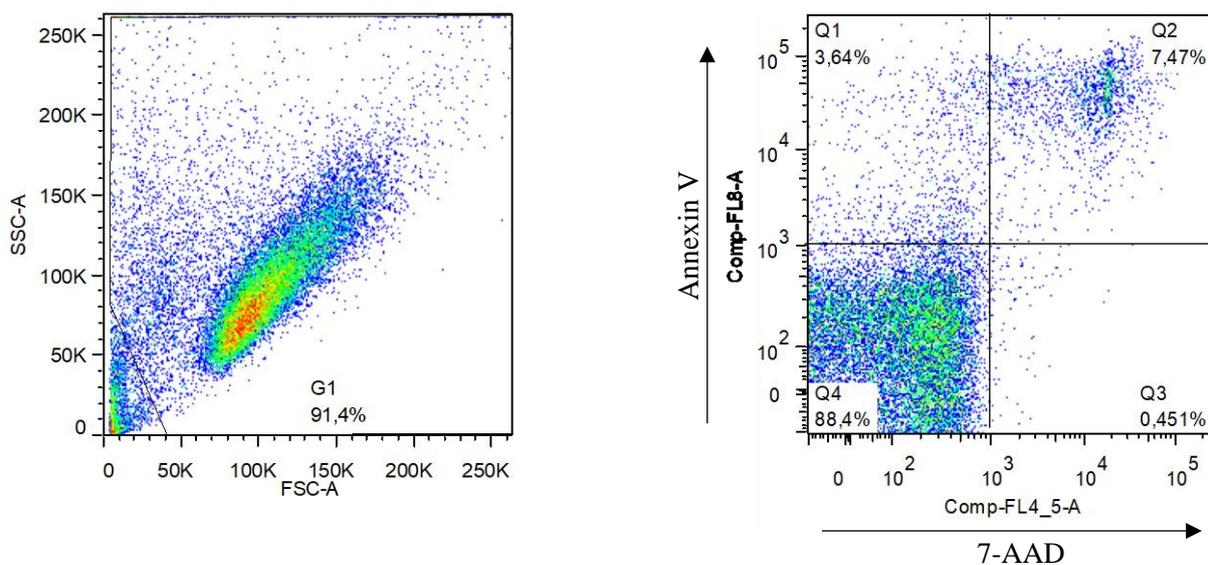
In Anlehnung an Li und Kollegen wurde die Internalisierung von Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten untersucht (Li et al. 2008). Dazu wurden  $1 \times 10^6$  von PBMC abgeleitete T-Zellen/mL, welche zuvor vom Kulturmedium in RPMI überführt wurden und für 5 Stunden bei 37 °C gelagert wurden, mit Antikörpern bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten (100 nM) für 0, 5, 10, 20 oder 240 Minuten inkubiert (Mayer et al. 2018). Als Kontrolle dienten Proben ohne Antikörper bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragmente. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen sofort auf Eis gegeben und mit eiskaltem DPBS zweimal gewaschen. Danach wurden die noch gebundenen Antikörper durch dreimaliges Anwenden von Stripping-Puffer auf einer leicht schüttelnden Plattform gelöst und erneut drei Waschschrte mit eiskaltem DPBS durchgeführt. In der Folge wurden die Zellen für die entsprechenden Zieloberflächenantigene CD2, CD3 und CD7 sowie 7-AAD angefärbt. Nach durchflusszytometrischer Messung wurde die MFI der mit Antikörpern oder F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Proben auf die MFI der unbehandelten Kontrolle normalisiert.

### **3.5 Untersuchung auf Zellapoptose**

Nach Koninkubation von PBMC abgeleiteter T-Zellen mit Antikörpern oder F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten wurden die Zellen mit den Apoptosemarkern Annexin V und 7-AAD in Anlehnung an Mall und Kollegen unter Berücksichtigung der Herstellerangaben angefärbt (Mall et al. 2016, Mayer et al. 2018), um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen. Während Annexin V bereits im apoptotischen Frühstadium an Phosphatidylserin bindet, welches aus der inneren in die äußere Schicht der Zellmembran verlagert wird

(Vermees et al. 1995), kann 7-AAD tote Zellen detektieren, indem es die Zellmembran durchdringt und unter Änderung der Fluoreszenzeigenschaften in die DNA interkaliert (Schmid et al. 1992).

$1 \times 10^6$  von PBMC abgeleitete T-Zellen/mL wurden mit verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 200 und 400 nM) der untersuchten Antikörper bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragmente für 18 Stunden inkubiert, mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die von PBMC abgeleiteten T-Zellen sowie die Testproteine in T-Zell-Medium mit hIL-7 und hIL-15 (jeweils 5 ng/mL) aufgenommen und in 96-well-Platten (70.000 Zellen/Vertiefung) unter den üblichen Zellkulturbedingungen (37 °C und 0,05% CO<sub>2</sub>) in Triplikaten koinkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände für die spätere Bestimmung der IFN $\gamma$ -Konzentration abgenommen. Die Zellen wurden geerntet, mit DPBS gewaschen und durch 10-minütige Inkubation mit 3  $\mu$ L Annexin V-APC und 0.5  $\mu$ g 7-AAD bei 25 °C im Dunklen angefärbt. Danach wurden pro Probe 100  $\mu$ L Bindungspuffer zum Abstoppen der Reaktion hinzugefügt und die Proben unmittelbar durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Auswertung mittels FlowJoSoftware wurde die als Zelldebris definierte linke untere Ecke im FSC-SSC-Format von den weiteren Analysen ausgeschlossen (Abb. 5; links). Als tote Zellen wurden die Annexin V oder 7-AAD positiven Zellen gewertet (Abb. 5; rechts).

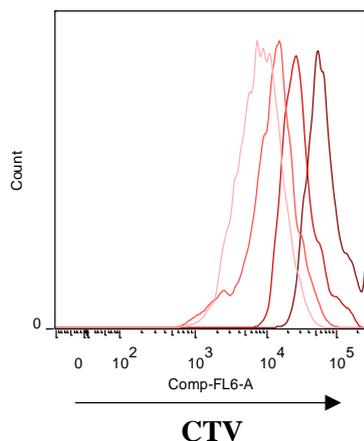


**Abbildung 5. Gating-Strategie zur Untersuchung auf Zellapoptose.** Alle mittels Durchflusszytometer aufgenommenen Zellen wurden in der FSC-SSC-Ansicht dargestellt und unter Ausschluss des Zelldebris im Gate G1 zusammengefasst (links). Diese wurden dann bezüglich ihres Färbeverhaltens für Annexin V (FL-8) und 7-AAD (FL-4.5) untersucht, wobei der Inhalt der Quadranten Q1-Q3 als tote Zellen definiert wurde (rechts).

### 3.6 Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Das T-Zell-Proliferationsverhalten wurde an mit OKT3 (anti-CD3)-IgG (30 ng/mL) und hIL-2 (50 U/mL) für 2–3 Tage stimulierten von PBMC abgeleiteten T-Zellen getestet (Mayer et al. 2018). Dazu

wurden die Zellen durch Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Proteine mit „CellTrace Violet“ (CTV) unter Verwendung eines „CTV Cell Proliferation Kits“ nach den Herstellerangaben angefärbt und die bei Zellteilung durch Verteilung der Proteine abnehmende Fluoreszenzintensität der Tochterzellen durchflusszytometrisch detektiert (Quah und Parish 2012; Abb. 6). Für die Zellfärbung wurde gemäß den Herstellerangaben eine 5  $\mu$ M Färbelösung aus der 5 nM Stocklösung, die durch Zugabe von 20  $\mu$ l DMSO zum gelieferten Reaktionsgefäß mit CTV hergestellt wurde, mit DPBS 2% FCS vorbereitet. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL von PBMC abgeleitete T-Zellen wurden darin suspendiert, für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit eisgekühltem „Cell loading Medium“ gewaschen. Die Zellen wurden in vorgewärmtem T-Zell-Medium mit hIL-7 und hIL-15 (jeweils 5 ng/mL) wieder aufgenommen und die Effizienz der Färbung als initialer MFI-Wert durchflusszytometrisch bestimmt. 5  $\times$  10<sup>4</sup> angefärbte Zellen wurden pro Well einer 96-well-Platte mit Antikörpern oder F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten (100 mM) inkubiert, wobei Triplikate angefertigt wurden. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Überstände zur IFN $\gamma$ -Bestimmung mittels ELISA abgenommen und die Zellen nach einmaligem Waschen mit 7-AAD enthaltendem FACS-Puffer angefärbt. Nach Fixation wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CTV-MFI-Werte der 7-AAD<sup>-</sup> Zellen wurden zu den anderen Zeitpunkten in Beziehung gesetzt (Abb. 6; Mayer et al. 2018).



**Abbildung 6. Untersuchung des T-Zell-Proliferationsverhaltens mittels CTV-Zellfärbung.** Durchflusszytometrisch zeigt sich eine Abnahme der emittierten Fluoreszenzintensität von CTV (FL-6) der Zellen vom Tag der Färbung (dunkelstes Rot) über 24, 28 bis 72 Stunden später (rosa).

### 3.7 ELISA

Die IFN $\gamma$ -Konzentration in den Überständen verschiedenster Koinkubationen wurde mit Hilfe eines „Human IFN-Enzyme-linked immunosorbent assay Sets“ wie in der Arbeitsgruppe üblich gemäß Herstellerangaben bestimmt (Klar et al. 2014, Mall et al. 2016).

Am Tag zuvor wurde zum Coating in jedes Well der ELISA-Platten 50  $\mu$ L Coating-Puffer mit anti-IFN $\gamma$  Capture Antikörper (1:250 Verdünnung) gefüllt und die Platten luftdicht verschlossen bei 4 °C inkubiert. Alle Inkubationsschritte am folgenden Tag dauerten eine Stunde bei Raumtemperatur. Zuerst wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 200  $\mu$ L 1% v/v Milchpulver in DPBS pro Well blockiert. Nach Inkubation und Waschen wurden pro Well je 50  $\mu$ L der zu untersuchenden Überstände

und entsprechende IFN $\gamma$ -Lösungen für die Standardkurve (Konzentrationen: 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL und 0 pg/mL in Duplikaten) aufgebracht und inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden 50  $\mu$ L 1% v/v Milchpulver mit biotinyliertem Detektionsantikörper und Streptavidin-Meerrettich Peroxidase Enzymekongugat (Verdünnung je 1:250) hinzugefügt und inkubiert. Auf siebenmaliges Waschen folgte die Zugabe von 100  $\mu$ L Substratlösung („TMB Substrate Reagent Set“) für die enzymatische Nachweisreaktion, wofür die Platte ca. 20 Minuten im Dunkeln inkubiert wurde. Sobald es auf den Feldern der Standardkurve zu einem graduellen blauen Farbumschlag der Lösung gekommen war, wurde die Substratreaktion mit 50  $\mu$ L 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 570 nm) mittels Sunrise Fotometer gemessen.

### 3.8 Quantitative Analyse der Zytotoxizität von T-Zellen

Unter Koinkubation von TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B7 Tumorzellen im Verhältnis 1:1 wurde der Einfluss von Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten (100 mM) auf die zytotoxische Effizienz von T-Zellen untersucht (24 Stunden bei 37 °C; Mayer et al. 2018). Als Kontrollen wurden TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub>/ML2-B15 und iRFP T<sub>CM</sub>/ML2-B7, ebenfalls in Triplikaten, verwendet. Auf diese Weise sollte eine unspezifische antitumorale Aktivität der T-Zellen ausgeschlossen und das Tumorstadium verifiziert werden.

Nach Ablauf der Koinkubation wurden die Überstände hinsichtlich der IFN $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit FACS-Puffer mittels 7-AAD angefärbt. Abschließend wurden pro Probe 175  $\mu$ l FACS-Puffer und 25  $\mu$ l „AccuCheck Counting Beads“ hinzugegeben. Bei der durchflusszytometrischen Messung wurden pro Probe mindestens 1500 Beads aufgenommen. Für die untersuchten Proben wurde die Anzahl 7-AAD<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> Tumorzellen sowie iRFP<sup>+</sup> Zellen als Hinweis auf die T-Zell-Zahl berechnet. Die jeweilige Zellzahl/ $\mu$ L wurde gemäß den Herstellerangaben nach folgender Formel berechnet:

$$\text{absolute Zellzahl} \left( \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen} \times \text{Counting Beads}/\mu\text{L}}{\text{Gesamtzahl gezählter Beads}}$$

Dabei wurde die Konzentration an Counting Beads aus der vom Hersteller angegebenen Konzentration des Reagenzes (Mikrosphären/ $\mu$ L) und dem Verdünnungsfaktor (hier 25  $\mu$ l / 200  $\mu$ l = 0,125; s. o.) bestimmt:

$$\text{Counting Beads}/\mu\text{L} = \frac{\text{Mikrosphären}/\mu\text{L} \times \text{Volumen der Beads}}{\text{Volumen der gesamten Probe}} = \text{Mikrosphären}/\mu\text{L} \times 0,125$$

## 4. *In vivo*-Testung von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten

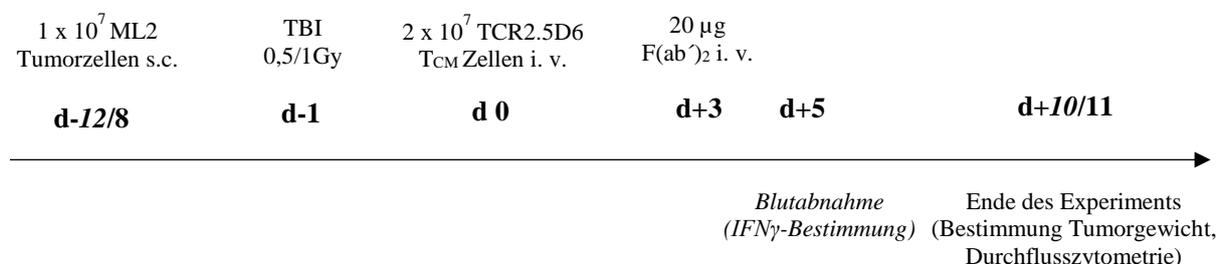
### 4.1 *In vivo*-Tumormodell

Die F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden *in vivo* an NSG-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) im Rahmen einer Tierversuchsgenehmigung durch die Regierung von Oberbayern getestet (Mayer et al. 2018). Das der Testung zugrundeliegende immuntherapeutische Tumormodell wurde bereits von Mall und Kollegen (Mall et al. 2016) sowie Yusufi und Kollegen (Yusufi et al. 2017) beschrieben (s. a. Abb. 7). Dabei erhielten die Tieren die Zellen bzw. F(ab')<sub>2</sub> Fragmente jeweils in 200 µL DPBS suspendiert. Die Mäuse wurden zunächst in jeder Flanke mit  $1 \times 10^7$  ML2-B7 bzw. ML2-B15 Tumorzellen subkutan beimpft, wobei im Verlauf solide Tumoren entstanden. Sobald diese tastbar waren, wurde deren Größe täglich mit einem Messschieber gemessen und deren Volumen durch das Produkt aus Längs- und Querdurchmesser abgeschätzt. Nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 0.5–1 Gy in einer Tierbestrahlungskammer (200kV, 15mA, Filter 5, Tischposition 500) wurden am achten Tag  $2 \times 10^7$  TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> i. v. über die Schwanzvene appliziert. Den Kontrollmäusen wurden iRFP T<sub>CM</sub> oder DPBS verabreicht. Drei weitere Tage später erfolgte die i. v. Gabe von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten (20 µg), entweder in reiner Form für die Funktionalitätstestungen bzw. mit <sup>89</sup>Zirkonium (<sup>89</sup>Zr) radiomarkiert für die Bildgebungsversuche, bei denen nach 48 Stunden PET/CT-Bilder aufgenommen wurden.

### 9.2 *In vivo*-Funktionalitätstestung der F(ab')<sub>2</sub> Fragmente

Bei den *in vivo*-Funktionalitätsversuchen erhielten die Mäuse nach der T-Zell-Injektion zusätzlich zweimal wöchentlich mit 80 Gy bestrahlte NSO-IL15 Zellen i. p. appliziert (Mayer et al. 2018), wofür Wang und Kollegen ein besseres Engraftment nachweisen konnten (Wang et al. 2011).

Außerdem wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die T-Zellen erst vier Tage später verabreicht wurden und die Tumoren damit bereits deutlich größer waren (Abb. 7, *kursiv*). Dabei wurde den Tieren am dritten Tag nach der T-Zell-Gabe, welcher mit der Tracerapplikation in den Bildgebungsversuchen korrespondiert, zudem Blut abgenommen, um die IFN $\gamma$ -Konzentration zu bestimmen.



**Abbildung 7. Zeitliche Abfolge der *in vivo*-Funktionalitätsexperimente.** *Kursiv* sind die Eckdaten des Funktionalitätsversuches mit späterer T-Zell-Injektion am 12. Tag nach Tumorzell-Gabe dargestellt.

### **9.3 PET/CT-Bildgebung**

Die Experimente mit PET/CT-Bildgebung wurden in Kooperation mit der Klinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Nahid Yusufi, Lisa Russelli und Francesco de Rose übernahmen dabei das Labeling der F(ab')<sub>2</sub> Fragmente mit <sup>89</sup>Zr. Sybille Reeder und Markus Mittelhäuser injizierten den Mäusen unter Anästhesie mit 1,5% Isofluran die radioaktiv markierten Tracer (10-20 µg F(ab')<sub>2</sub> Fragmente einer Radioaktivität von 0,7-1,5 MBq) und führten nach 48 Stunden die PET/CT-Bildgebung mittels „Inveon small animal PET/CT-Scanner“ durch. Genauere Angaben bezüglich der Bildakquisition sind vorbeschrieben (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017 und Mayer et al. 2018). Mit Hilfe des Inveon Research Workplace (Siemens, Knoxville, USA) wurden PET- und CT-Bilder anhand der axialen PET/CT-Projektion fusioniert, der Zerfall zurückgerechnet und die Traceraufnahme als Prozentsatz der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g, 1cc=1g) als 3D-Maximalintensitätsprojektionen (MIP) dargestellt (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017 und Mayer et al. 2018).

### **9.4 Ex vivo-Analysen**

Nach Sedierung mit Isofluran und Tod durch Genickbruch wurden den Tieren verschiedene Organe entnommen. Diese wurden gewogen und die enthaltenen Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Bei den Bildgebungsexperimenten wurde zusätzlich deren Radioaktivität ermittelt.

#### **Ex vivo-Analysen der murinen Organe mittels Durchflusszytometrie**

Nach Entnahme der murinen Organe wurde aus diesen mit 40 µm Zellsieben eine Zellsuspension in FACS-Puffer hergestellt. Um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurden die gewaschenen Zellen mit 2 ml ACK-Lysepuffer für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse mit entsprechenden Antikörpern angefärbt und in Hinblick auf die Präsenz von T-Zellen (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup> oder CD45<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup>), TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>iRFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup>) und Tumorzellen (CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>) analysiert. Als Maß für die Zellzahl diente der Anteil an den 7-AAD<sup>-</sup> Zellen.

#### **Biodistributionsanalyse**

Im Rahmen der Bildgebungsversuche wurden die Organe auch hinsichtlich ihrer Radioaktivität mittels Gammazähler untersucht. 1% der injizierten Aktivität diente als Standard für die Berechnung der % ID/g. Außerdem wurden die jeweiligen Organ-zu-Blut-Ratios errechnet.

## 5. Software und Statistik

Neben den bereits erwähnten Software-Programmen zur Auswertung der Durchflusszytometrie und der PET/CT-Bilder fanden GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad, San Diego, USA), Microsoft Office 2016 (Word, Excel und Powerpoint; Microsoft, Redmond, USA) und Windows EndNote X7.4 (Clarivate Analytics, Philadelphia, USA) Anwendung. Mit GraphPad Prism wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $\pm$  sd) und ungepaarte  $t$ -Tests berechnet, wobei  $p$ -Werte  $<0.05$  als statistisch signifikant gewertet wurden. Sabine Mall wies mit Hilfe einer Testversion der MiniTab Software (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA) die Normalverteilung der Versuchswerte zur Anwendbarkeit des  $t$ -Tests nach.

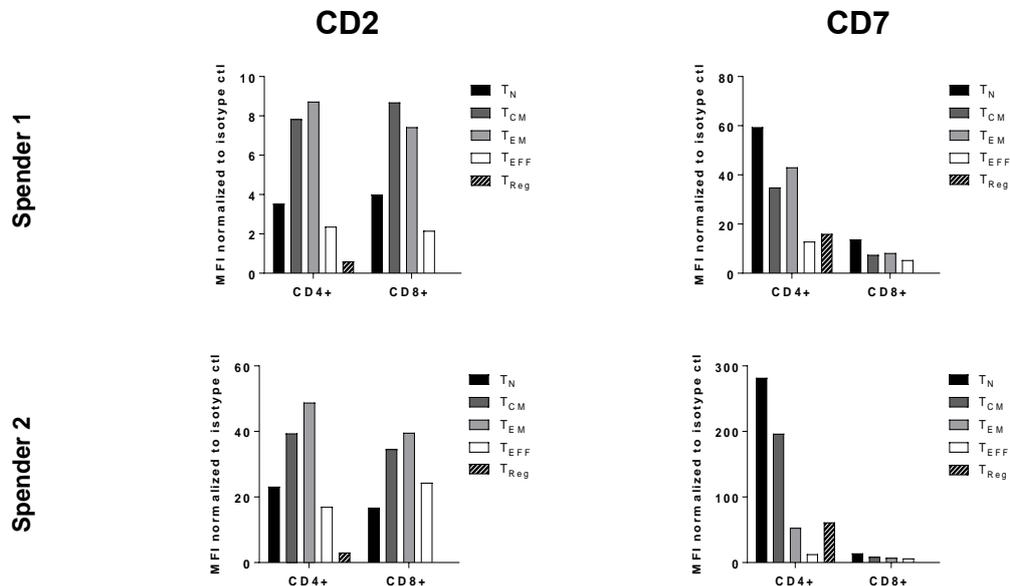
# Ergebnisse

## 1. Expressionsverhalten von CD2, CD3 und CD7

### 1.1 Expression auf Subpopulationen von frisch isolierten PBMC

Zunächst wurde die Expression von CD2, CD3 und CD7 auf diversen T-Zell-Subpopulationen sowie weiteren Zellpopulationen von frisch isolierten PBMC verschiedener gesunder Spender bestimmt (Abb. 1A, Abb. S2A-B, Abb. S3 und Tab. S1-S2 in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 8).

Wie für pan-T-Zell-Marker zu erwarten, waren alle untersuchten T-Zell-Populationen zu einem hohen Prozentsatz positiv für die aufgeführten Marker (Abb. S2 und Tab. S1-2 in Mayer et al. 2018). Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Populationen, wobei die Expression auf T<sub>Reg</sub> im Vergleich zu den anderen T-Zell-Subpopulationen geringer ausfiel (Abb. S2 und Tab. S1-2 in Mayer et al. 2018). Mit Ausnahme der CD8<sup>+</sup> T<sub>EFF</sub>, welche nur zu 53,8% positiv für CD3 waren, lag der Anteil CD3<sup>+</sup> Zellen unter allen T-Zell-Populationen zwischen 87,0 und 99,8% (Tab. S1-2 in Mayer et al. 2018). Alle Subpopulationen waren positiv für CD2 und CD7 bei einem Anteil von mindestens 87% (Abb. S2 und Tab. S1-2 in Mayer et al. 2018). Der Anteil CD7<sup>+</sup> T-Zellen war für T<sub>N</sub> mit 99,7% für CD4<sup>+</sup> und 99,0% für CD8<sup>+</sup> T-Zellen am größten, während sich der Anteil CD2<sup>+</sup> Zellen unter T<sub>N</sub>, T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>EFF</sub> weniger stark unterschied (Tab. S1-2 in Mayer et al. 2018).



**Abbildung 8. Expression von CD2 und CD7 auf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zweier Spender.** Analog zur Abb. 1 in Mayer et al. 2018 ist hier die Expression von CD2 und CD7 auf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen von zwei weiteren Spendern dargestellt. Die MFI von PE-gelabelten gegen CD2 bzw. CD7 gerichteten Antikörpern kommt normalisiert zur PE-Isotypkontrolle für nachfolgende CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen zur Darstellung: T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), T<sub>EFF</sub>

(CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), T<sub>EM</sub> (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>), T<sub>N</sub> (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) sowie T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>).

Auch wenn die prozentuale Expression von CD2, CD3 und CD7 zwischen den untersuchten T-Zell-Populationen nur geringfügig differierte, fielen bei der Analyse der Expressionsdichte hingegen Unterschiede auf (Abb. 1A in Mayer et al. 2018 und Abb. 8). Während für CD7 und CD3 jeweils T<sub>N</sub> die höchste Expressionsdichte unter den T-Zell-Subpopulationen aufwies, war die Expression von CD2 auf Gedächtnis-T-Zellen besonders hoch (Abb. 1A in Mayer et al. 2018 und Abb. 8).

Die Expressionsanalyse der drei Zielstrukturen auf weiteren von PBMC abgeleiteten Zellpopulationen ergab eine geringe Expression auf Monozyten und B-Zellen für alle drei Marker (Abb. S3 in Mayer et al. 2018). Für CD3<sup>+</sup> NK-Zellen ließ sich Expression sowohl von CD2 als auch von CD7 nachweisen (Abb. S3 in Mayer et al. 2018).

## 1.2 Expression auf spezifisch aktivierten T-Zellen

Im Anschluss wurde die Expression der Zielstrukturen auf spezifisch aktivierten T-Zellen untersucht, da sich durch den Prozess der spezifischen Aktivierung die Expression der Oberflächenmoleküle auf T-Zellen ändern kann. Dies wurde bereits für CD2 und CD3 $\epsilon$  im Kontext unterschiedlicher Tumorentitäten beschrieben (Rooney et al. 2015).

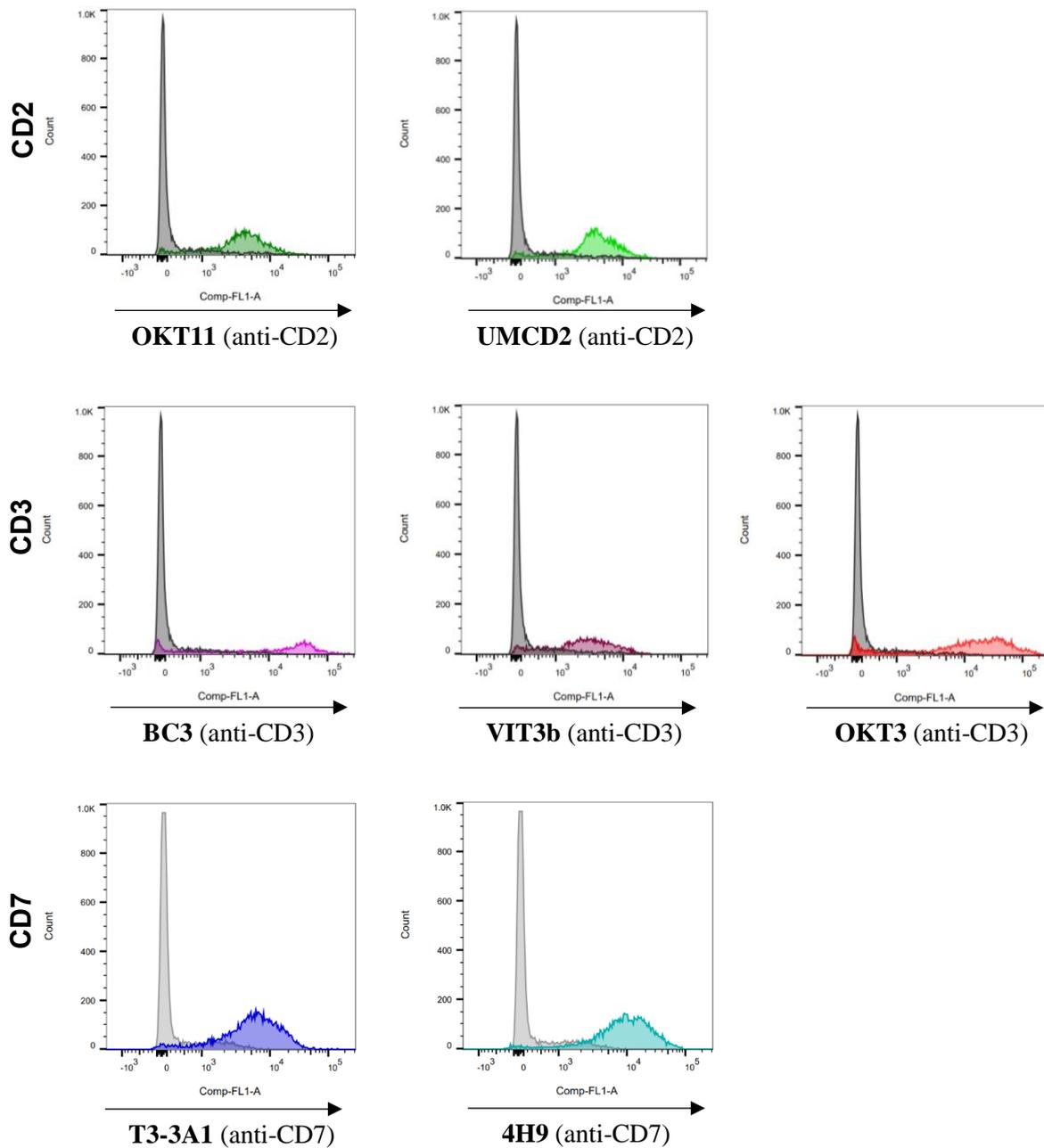
In diesem Sinne wurde die Expression der ausgewählten Zielantigene auf TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> bestimmt, welche mit ML2-B7 Tumorzellen koinkubiert waren (Abb. 1B in Mayer et al. 2018). Kombinationen aus iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B7 sowie TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B15 dienten als Kontrollen. Dabei wurde eine starke Hochregulation von CD2 auf den spezifisch aktivierten T-Zellen beobachtet (Abb. 1B in Mayer et al. 2018), was die Erkenntnisse von Rooney und Kollegen bestätigt (Rooney et al. 2015). Auch für CD7 zeigte sich ein derartiger, wenn auch quantitativ geringer ausfallender Effekt (Abb. 1B in Mayer et al. 2018). CD3 hingegen war im Vergleich zu nicht-aktivierten T-Zellen auf spezifisch aktivierten T-Zellen weniger stark exprimiert (Abb. 1B in Mayer et al. 2018).

## 2. Untersuchte Antikörper gegen die pan-T-Zell-Antigene CD2, CD3 und CD7

Nachdem sich die Zielstrukturen CD2, CD3 und CD7 aufgrund ihrer starken Expression auf diversen T-Zell-Subpopulationen als geeignete T-Zell-Marker erwiesen hatten, wurden gegen diese gerichtete murine Antikörper ausgewählt, die in der Folge hinsichtlich ihrer Eignung als inerte T-Zell-Tracer getestet werden sollten. Zunächst wurden Antikörper der Klone OKT11 (mIgG1; anti-CD2), UMCD2 (mIgG2a; anti-CD2), BC3 (mIgG2b; anti-CD3), VIT3b (mIgG1; anti-CD3), OKT3 (mIgG2a; anti-CD3), T3-3A1 (mIgG1; anti-CD7) und 4H9 (mIgG2a; anti-CD7) untersucht.

## 2.1 Bindung der untersuchten Antikörper an humane PBMC

Das Bindungsvermögen der ausgewählten Antikörper wurde an von PBMC abgeleiteten T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 9). Alle Antikörper erwiesen sich als bindend.

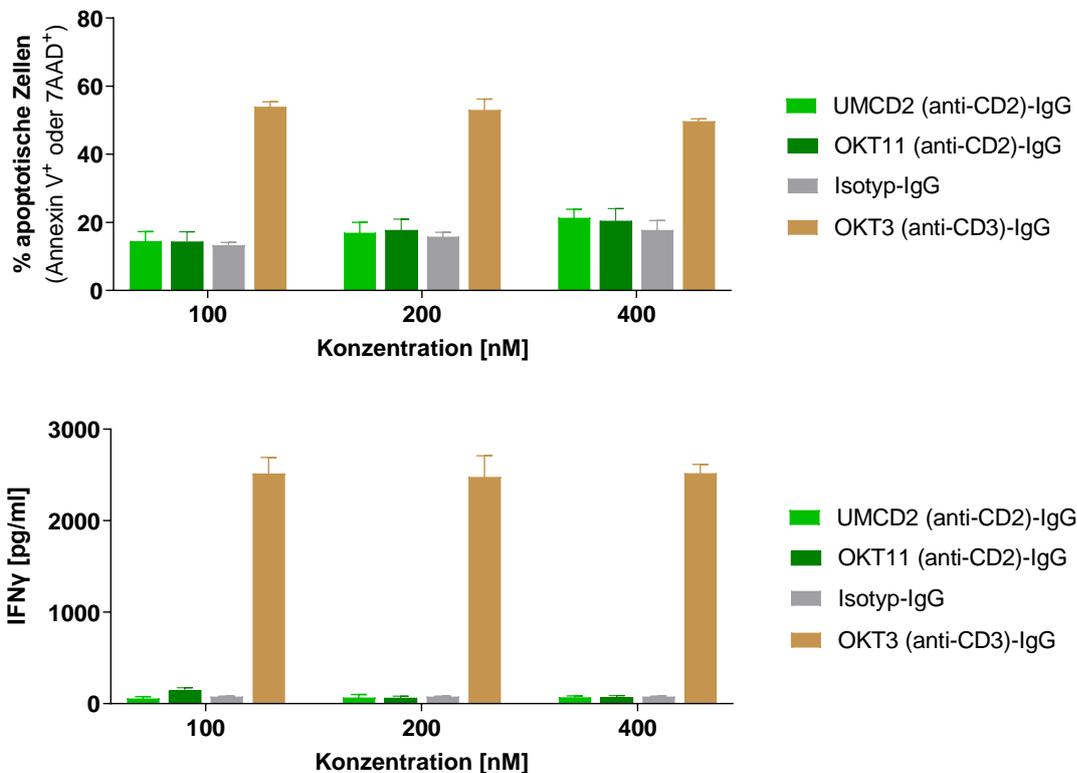


**Abbildung 9. Bindung der getesteten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD7 an ihre Zielzellen.** Die farbig ausgefüllten Histogramme zeigen die Bindung der untersuchten Antikörper an von PBMC abgeleitete T-Zellen. Als Kontrolle dienten entsprechende Isotypen (graue Histogramme).

## 2.2 Untersuchung der Induktion von Zellapoptose und IFN $\gamma$ -Produktion durch die ausgewählten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD7

Zur Abschätzung potentieller funktioneller Effekte der ausgewählten Antikörper auf T-Zellen wurde zunächst deren Potenzial zur Induktion von Apoptose untersucht und dabei die Konzentration an IFN $\gamma$  im Überstand bestimmt (Abb. S4 in Mayer et al. 2018 und Abb. 10).

Während die gegen CD2 und CD7 gerichteten Antikörper nicht zu einer im Vergleich zu den Isotypen erhöhten Apoptoserate an von PBMC abgeleiteten T-Zellen führten (Abb. S4A in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 10), verursachten alle untersuchten gegen CD3 gerichteten Antikörper (Klone BC3, VIT3b und OKT3) eine deutliche Zunahme an Annexin V<sup>+</sup> oder 7-AAD<sup>+</sup> Zellen (Abb. S4A in Mayer et al. 2018).



**Abbildung 10. Untersuchung von anti-CD2 Antikörpern hinsichtlich Apoptoseinduktion und IFN $\gamma$ -Produktion.** Es sind der Anteil apoptotischer Zellen (oben) und die korrespondierenden IFN $\gamma$ -Konzentrationen (unten) im Überstand nach Koinkubation von UMCD2 (anti-CD2) und OKT11 (anti-CD2) bzw. Isotyp und OKT3 (anti-CD3)-IgG (0,05% Natriumazid) mit von PBMC abgeleiteten T-Zellen dargestellt.

Außerdem wurden die IFN $\gamma$ -Konzentrationen in den Überständen bestimmt, welche mit dem Anteil detektierter apoptotischer Zellen korrelierten (Abb. S4A-B in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 10).

Während für die gegen CD2 und CD7 gerichteten Antikörper im Vergleich zur Isotypkontrolle keine Unterschiede detektiert wurden, induzierten alle gegen CD3 gerichteten Antikörper eine massive IFN $\gamma$ -Produktion (Abb. S4B in Mayer et al. 2018).

Aufgrund des starken apoptotischen Effekts auf unstimulierte, von PBMC abgeleitete T-Zellen durch alle gegen CD3 gerichteten Antikörper wurde CD3 als Zielstruktur für die T-Zell-Bildgebung ausgeschlossen und stattdessen OKT3 (anti-CD3)-IgG weiterhin für die *in vitro*-Versuche als Positivkontrolle verwendet (Mayer et al. 2018).

### 3. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten hinsichtlich deren Tracereigenschaften

Aufgrund des vorteilhaften Expressionsmusters von CD2 und CD7 auf spezifisch aktivierten T-Zellen in Zusammenschau mit den oben beschriebenen Funktionalitätsergebnissen wurde für jede Zielstruktur jeweils ein Antikörper für detailliertere funktionelle Analysen ausgewählt. Bei jeweils vergleichbaren Resultaten für die beiden gegen CD2 bzw. CD7 gerichteten Antikörper in Bezug auf die Induktion von Zellapoptose an nicht stimulierten von PBMC abgeleiteten T-Zellen wurden OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) als repräsentative Antikörper für die jeweilige Zielstruktur ausgewählt, da für diese die Gewinnung großer Mengen anhand von frei verkäuflichen Hybridomzelllinien möglich war.

Nach ihrer Isolation aus den Hybridomzellüberständen wurden aus den Antikörpern (OKT11 (anti-CD2)-IgG und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG) wegen ihrer vorteilhaften Pharmakokinetik *in vivo* auch F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub>) hergestellt (durchgeführt von Nahid Yusufi und Lisa Russelli, Klinik für Nuklearmedizin; Abb. S5A-B in Mayer et al.).

SE-HPLC (Größenausschluss-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; durchgeführt von Nahid Yusufi und Lisa Russelli, Klinik für Nuklearmedizin) und ELISA (durchgeführt von Andrew Flatley, Helmholtz-Zentrum München) zeigten für T3-3A1 (anti-CD7)-IgG die zwei Isotypsubklassen IgG1 und IgG2a (Abb. S5A-B in Mayer et al.). Deren Spezifität für CD7 wurde mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Blockierungsexperiments verifiziert (Abb. S5C in Mayer et al. 2018).

#### 3.1 Bindungsverhalten und Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Sowohl für die Antikörper OKT11 (anti-CD2)-IgG und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG als auch deren F(ab')<sub>2</sub> Fragmente konnte die Bindung an von PBMC abgeleitete T-Zellen gezeigt werden, wobei ähnliche K<sub>d</sub>-Werte um 10<sup>-8</sup> M bestimmt wurden (Abb. 2A in Mayer et al. 2018). Aufgrund der geringeren Anzahl an Aminogruppen bei F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten zeigten diese im Vergleich zu den Antikörpern eine geringere Markierungseffizienz (Tab. 9), was sich in einer insgesamt niedrigeren detektierten MFI niederschlug (Abb. 2A in Mayer et al. 2018).

Protein	Markierungseffizienz (Mittelwert $\pm$ sd)	Protein	Markierungseffizienz (Mittelwert $\pm$ sd)
IgG1	10,55 $\pm$ 0,70	IgG2a	9,19 $\pm$ 0,40
F(ab') <sub>2</sub> aus IgG1	9,22 $\pm$ 0,55	OKT3 (anti-CD3)- IgG	8,70 $\pm$ 0,23
OKT11 (anti-CD2)- IgG	9,58 $\pm$ 0,24	T3-3A1 (anti-CD7)- IgG	9,44 $\pm$ 0,29
OKT11 (anti-CD2)- F(ab') <sub>2</sub>	6,73 $\pm$ 0,39	T3-3A1 (anti-CD7)- F(ab') <sub>2</sub>	9,02 $\pm$ 0,17

**Tabelle 9. Markierungseffizienz für Pacific Blue der zur K<sub>a</sub>-Bestimmung verwendeten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente.**

### 3.2 Internalisierungsverhalten

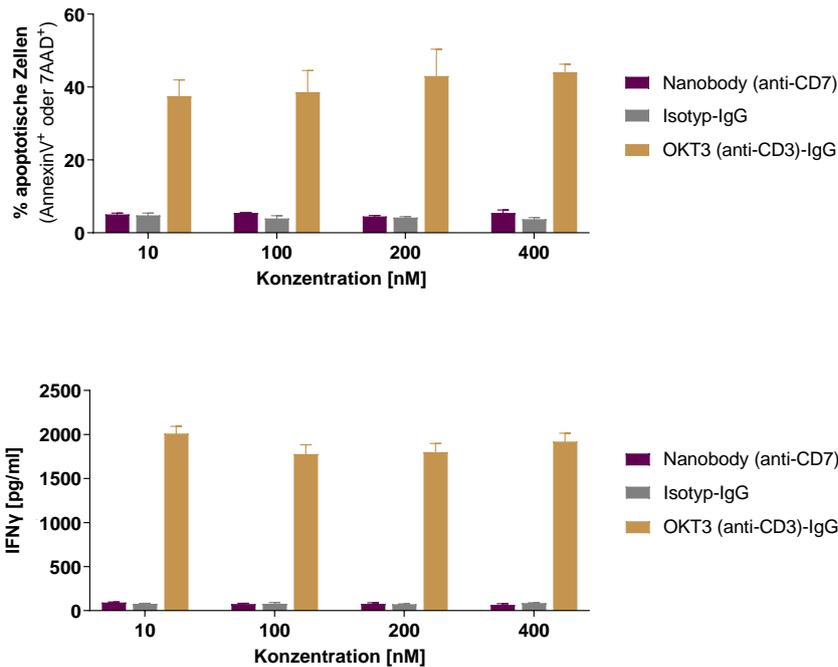
Als weitere Tracereigenschaft wurde die Neigung der Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente zu Internalisierung an kultivierten von PBMC abgeleiteten T-Zellen untersucht. Dabei fielen Unterschiede zwischen den untersuchten Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten auf. Während für OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> erst nach vier Stunden ein geringer Grad an Internalisierung detektiert wurde, wiesen die mit T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> behandelten Zellen bereits unmittelbar nach Proteinapplikation einen starken Abfall der an der Oberfläche zugänglichen CD7-Moleküle auf (Abb. 2B in Mayer et al. 2018). Zum Vergleich diente OKT3 (anti-CD3)-IgG, das im Zeitverlauf einen zunehmenden Grad an Internalisierung aufwies (Abb. 2B in Mayer et al. 2018).

## 4. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> hinsichtlich der *in vitro*-T-Zell-Funktionalität

### 4.1 Induktion von Zellapoptose und IFN $\gamma$ -Produktion

Für die funktionelle *in vitro*-Charakterisierung des Effektes der ausgewählten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurde zunächst deren Potential, an nicht-spezifisch aktivierten von PBMC abgeleiteten T-Zellen Apoptose auszulösen, untersucht. Zugleich diente erneut die in den Überständen bestimmte Konzentration an IFN $\gamma$  als Hinweis auf eine Aktivierung der Zellen.

Sowohl OKT11 (anti-CD2) als auch T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> zeigten im Vergleich zu den Isotypkontrollen keine Unterschiede bezüglich der detektierten apoptotischen Zellen bei allen untersuchten Konzentrationen (Abb. 3A in Mayer et al. 2018). Die mit OKT3 (anti-CD3)-IgG im Sinne einer Positivkontrolle behandelten Zellen hingegen wiesen einen deutlich erhöhten Anteil an Annexin V<sup>+</sup> oder 7-AAD<sup>+</sup> Zellen auf (Abb. 3A in Mayer et al. 2018 und Abb. 11). Außerdem wurde ein gegen CD7 gerichteter Nanobody (zur Verfügung gestellt durch Nick Devoogdt, Vrije Universität Brüssel) *in vitro* getestet. Auch für diesen konnte keine Apoptoseinduktion detektiert werden (Abb. 11).



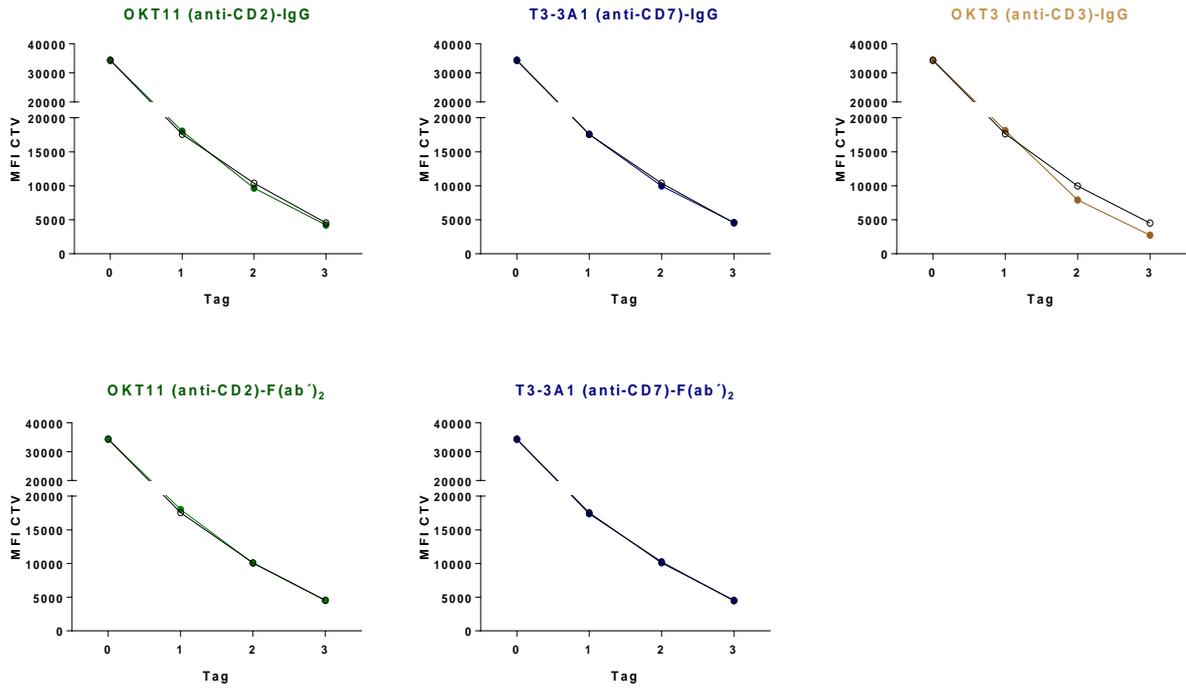
**Abbildung 11. Untersuchung eines anti-CD7 Nanobodys bezüglich Apoptoseinduktion und IFN $\gamma$ -Produktion.** Es sind der Anteil apoptotischer Zellen (oben) sowie IFN $\gamma$ -Konzentrationen (unten) nach Koinkubation von anti-CD7 Nanobody bzw. Isotyp- und OKT3 (anti-CD3)-IgG (jeweils n=3) mit von PBMC abgeleiteten T-Zellen als Mittelwert  $\pm$  sd gezeigt.

Mit den Analysen bezüglich des Anteils apoptotischer Zellen ließen sich die Ergebnisse der Bestimmung der IFN $\gamma$ -Konzentrationen in den korrespondierenden Überständen in Einklang bringen. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen der Isotypkontrolle und den untersuchten Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) ausgemacht werden (Abb. 3B in Mayer et al. 2018). Ebenso zeigten die mit anti-CD7 Nanobody behandelten nicht stimulierten T-Zellen keine gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion (Abb. 11). Die Koinkubation mit OKT3 (anti-CD3)-IgG hingegen führte zu einer stark gesteigerten Freisetzung von IFN $\gamma$  (Abb. 3B in Mayer et al. 2018 und Abb. 11). Die Experimente für T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> wurden in doppelten Dosen wiederholt, um eventuelle funktionelle Effekte einer der beiden enthaltenen Antikörpersubklassen zu identifizieren (Mayer et al. 2018). Dabei ergaben sich keine Unterschiede (Abb. S7A-C in Mayer et al. 2018).

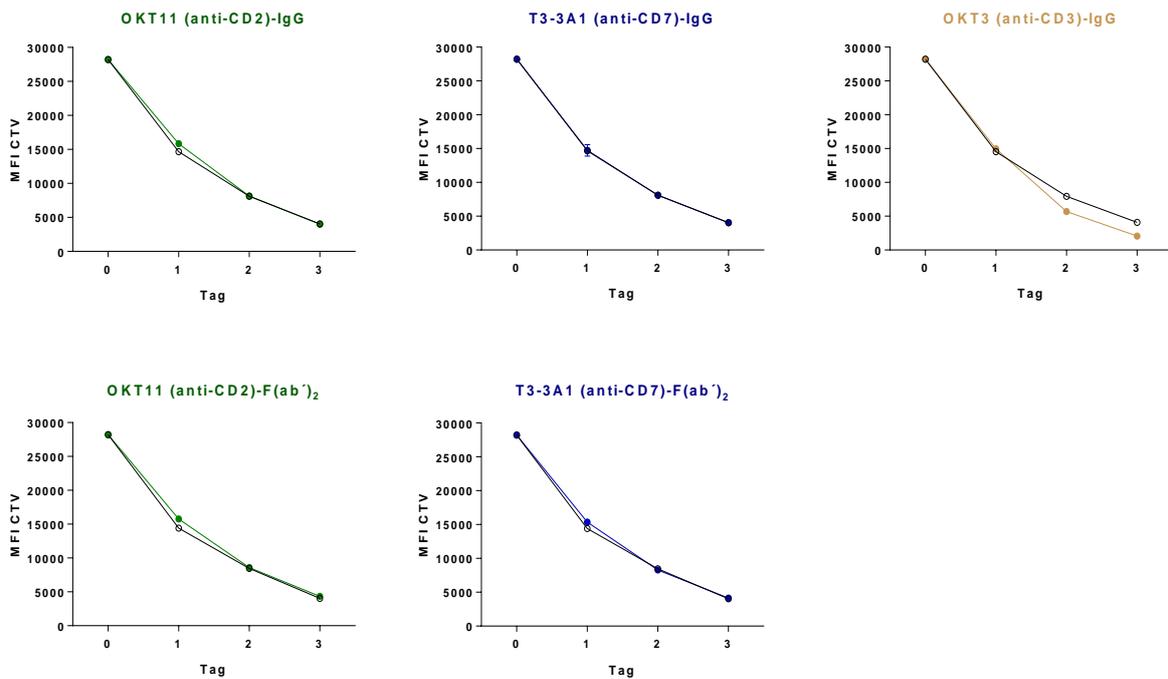
#### 4.2 T-Zell-Proliferationsverhalten

Als Nächstes wurden OKT11 (anti-CD2) sowie T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> bezüglich ihres Einflusses auf das Proliferationsverhalten zuvor stimulierter, von PBMC abgeleiteter T-Zellen untersucht.

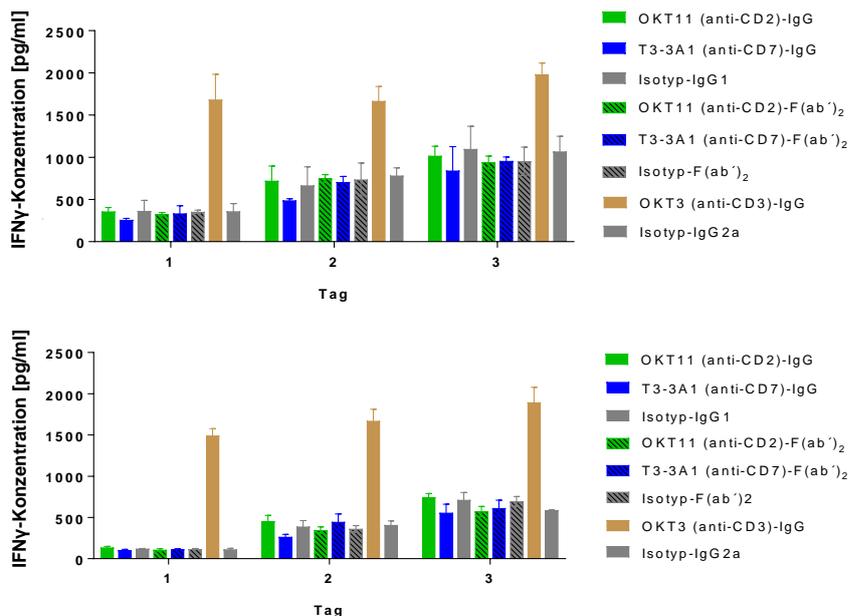
Wie bei der Untersuchung auf Induktion von Zellapoptose zeigten sich keine Unterschiede im Proliferationsverhalten der T-Zellen unter Anwesenheit von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb. 3C in Mayer et al. 2018 und Abb. 12-13). Im Gegensatz dazu führte OKT3 (anti-CD3)-IgG zu einer Steigerung der T-Zell-Proliferation (Abb. 3C in Mayer et al. 2018 und Abb. 12-13).



**Abbildung 12. Untersuchung des Proliferationsverhaltens von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub>.** Es ist das Proliferationsverhalten der untersuchten T-Zellen durch die Abnahme der CTV-MFI (jeweils Mittelwerte aus Triplikaten) dargestellt für die unterschiedlichen Koinkubationen im Vergleich zur entsprechenden Isotyp-Kontrolle (schwarz) für einen weiteren (Spender 1) als den in Mayer et al. 2018 veröffentlichten Spender.



**Abbildung 13. Untersuchung des Proliferationsverhaltens von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> für einen weiteren Spender.** Es ist das Proliferationsverhalten der untersuchten T-Zellen durch die Abnahme der CTV-MFI für die unterschiedlichen Koinkubationen im Vergleich zur entsprechenden Isotyp-Kontrolle (schwarz) für einen weiteren (Spender 2) als den in Mayer et al. 2018 veröffentlichten Spender dargestellt. Die MFI von CTV ist als Mittelwert aus einem Triplikat gezeigt.



**Abbildung 14. IFN $\gamma$ -Konzentrationen bei Proliferation von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter Koinkubation mit OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub>.** Es sind die korrespondierenden IFN $\gamma$ -Konzentrationen für Spender 1 aus Abb. 12 (oben) und Spender 2 aus Abb. 13 (unten) dargestellt.

Um auch geringere oder sich erst später in einer Reduktion der CTV-Färbung widerspiegelnde Effekte auszuschließen, wurde zusätzlich die IFN $\gamma$ -Konzentrationen in den Überständen bestimmt. Für mit OKT11 (anti-CD2) oder T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> behandelte Zellen wurde dabei keine gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion nachgewiesen (Abb. S6 in Mayer et al. 2018 und Abb. 14). OKT3 (anti-CD3)-IgG hingegen führte bereits nach 24 Stunden zu einer massiven IFN $\gamma$ -Produktion (Abb. S6 in Mayer et al. 2018 und Abb. 14). Dieser Effekt zeigte sich dann ab dem zweiten Tag auch in der CTV-Färbung (Abb. 3C in Mayer et al. 2018 und Abb. 12-13).

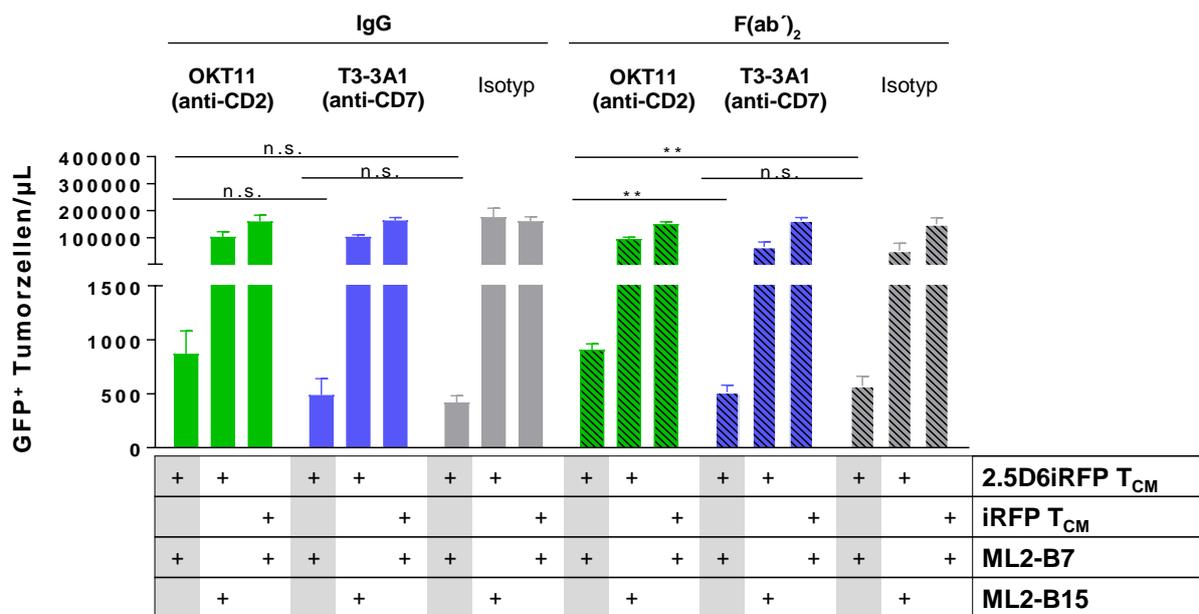
#### 4.3 Zytotoxizitätsverhalten von aktivierten T-Zellen

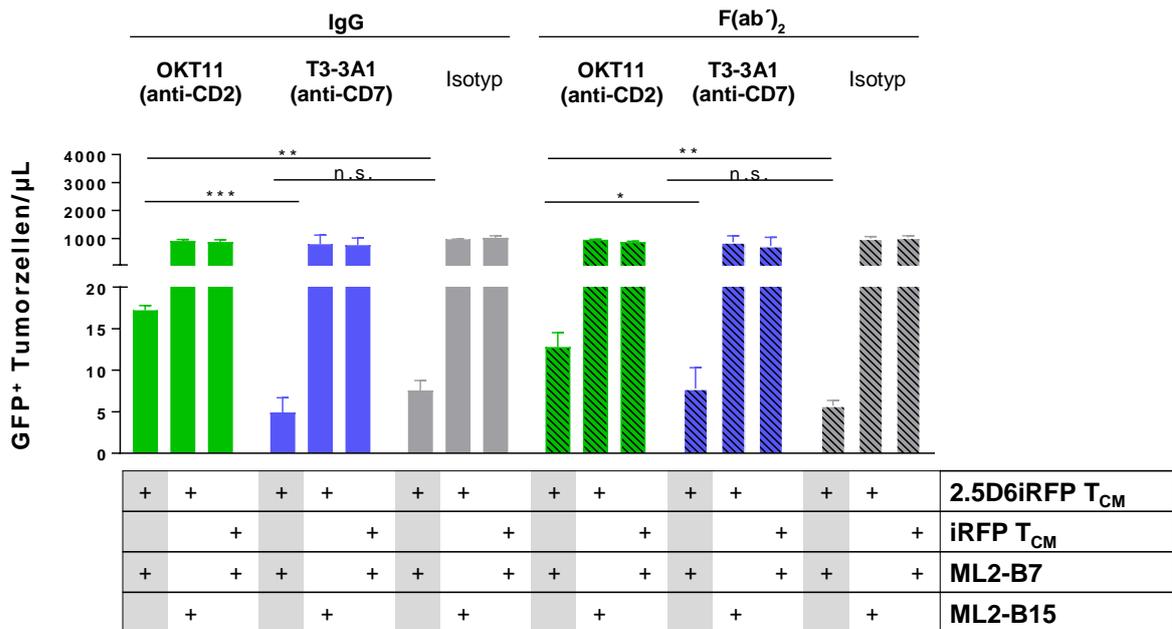
Im Rahmen der *in vitro*-Testung der ausgewählten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente sollten auch mögliche Effekte auf die Zytotoxizität stimulierter T-Zellen untersucht werden. Dies wurden durch eine Koinkubation von TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und GFP<sup>+</sup> ML2-B7 Tumorzellen unter Zugabe von OKT11 (anti-CD2) bzw. T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> getestet. Neben der Isotypkontrolle wurden als Kontrollen iRFP T<sub>CM</sub> mit ML2-B7 Tumorzellen und TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> mit GFP<sup>+</sup> ML2-B15 Tumorzellen koinkubiert.

Der zu erwartende Grad an T-Zell-Zytotoxizität zeigte sich in den mit Isotyp-IgG und F(ab')<sub>2</sub> behandelten Proben, wo die Koinkubation von TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B7 Tumorzellen zu einer starken Reduktion der Tumorzellkonzentration führte (Abb. 4A in Mayer et al. 2018 und Abb. 15). Gleichzeitig konnte anhand der Kontrollen iRFP T<sub>CM</sub>/ML2-B7 und TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub>/ML2-B15 eine unspezifische Stimulation der T-Zellen durch die zugegebenen Proteine ausgeschlossen werden (Abb. 4A in Mayer et al. 2018 und Abb. 15). Auch wenn die exakte detektierte Tumorzellkonzentration in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Spender-T-Zellen variierte, wurden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Effekts der untersuchten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente für alle drei Spender detektiert (Abb. 4A in Mayer et al. 2018 und Abb. 15). Während die gemessene Tumorzellkonzentration in der Koinkubation von TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B7 Tumorzellen unter T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> im Bereich der entsprechenden Isotypkontrollen lag, war diese unter OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> tendenziell erhöht (Abb. 4A in Mayer et al. 2018 und Abb. 15).

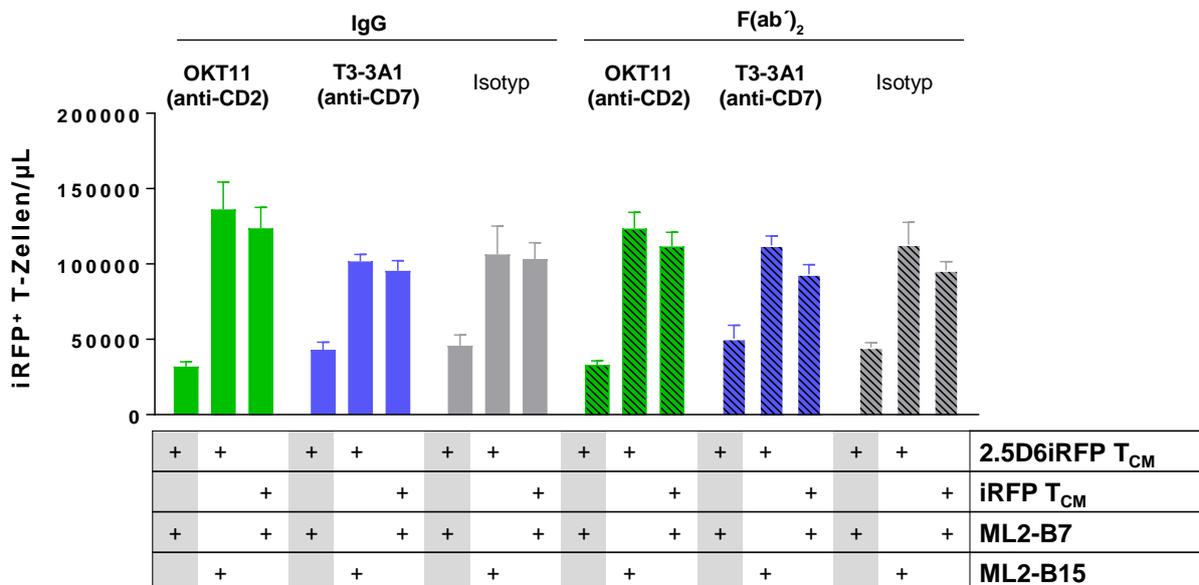
Die Analyse hinsichtlich der Konzentration iRFP<sup>+</sup> T-Zellen erbrachte Hinweise auf eine reduzierte T-Zell-Zahl in den Ansätzen mit OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> bei Koinkubation von TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> und ML2-B7 Tumorzellen (Abb. 16), was als Erklärung für die Beeinträchtigung des zytotoxischen Potenzials der T-Zellen dienen könnte, die zu einer höheren Tumorzellkonzentration im Vergleich zu Isotyp und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> führte (Abb. 4A in Mayer et al. 2018 und Abb. 15).

Außerdem konnten für die mit OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> behandelten Proben leicht erhöhte Konzentrationen an IFN $\gamma$  in den Überständen detektiert werden (Abb. 4B in Mayer et al. 2018).





**Abbildung 15. Zytotoxizität aktivierter T-Zellen unter Koinkubation mit ML2-Tumorzellen und T3-3A1 (anti-CD7) und OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub>.** Die Darstellung entspricht Abbildung R3 des Response Letters an Theranostics. Es sind die Ergebnisse zweier weiterer als dem in Mayer et al. 2018 publizierten Spender (oben bzw. unten) dargestellt. Für jede Kondition ist die Konzentration GFP<sup>+</sup> Tumorzellen/µL dargestellt. Die Ergebnisse der Triplikate sind als Mittelwert ± sd dargestellt. Ungepaarter t-Test: n.s. nicht signifikant, \* p<0.05, \*\* p<0.01 und \*\*\* p<0.001.



**Abbildung 16. T-Zell-Analyse bei der Untersuchung von T3-3A1 (anti-CD7) und OKT11 (anti-CD2)-IgG und F(ab')<sub>2</sub> hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Zytotoxizität.** Es sind die Konzentrationen iRFP<sup>+</sup> T-Zellen/µL für jede Kondition des in Mayer et al. 2018 publizierten Spenders

dargestellt. Die Ergebnisse der Triplikate sind als Mittelwert  $\pm$  sd dargestellt. Ungepaarter t-Test bezüglich der untersuchten Konditionen für 2.5D6iRFP TCM/ML2-B7: alle nicht signifikant.

## 5. Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten hinsichtlich der *in vivo*-T-Zell-Funktionalität

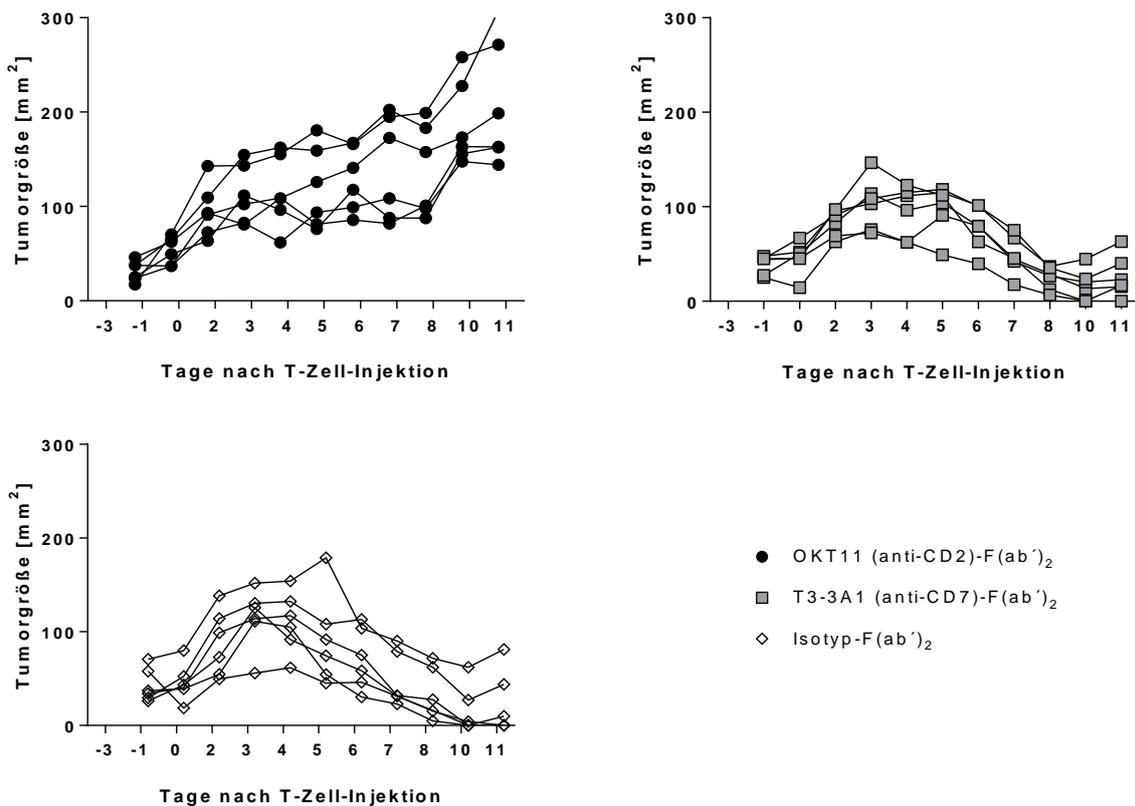
Darauf aufbauend wurde die Funktionalität von T-Zellen unter Präsenz von OKT11 (anti-CD2) bzw. T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten in einem immuntherapeutischen Tumormodell (Mall et al. 2016) *in vivo* geprüft. Aufgrund ihrer vorteilhafteren Pharmakokinetik wurden F(ab')<sub>2</sub> Fragmente verwendet. Da sich keine Konsequenz einer zusätzlichen *in vivo*-Testung der Vollantikörper, welche in den *in vitro*-Versuchen keine Unterschiede zu den F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten zeigten und den F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten in der klinischen Anwendung wegen ihrer längeren Eliminationszeit unterlegen sind, ergeben hätte, wurden diese nicht getestet.

Zusätzlich zu dem bei den Bildgebungsversuchen verwendeten Protokoll wurden die Auswirkungen von OKT11 (anti-CD2) bzw. T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten auf die Effektivität des adoptiven T-Zell-Transfers auch nach einer um vier Tage verzögerten T-Zell-Gabe bei bereits weiter fortgeschrittener Tumorgroße untersucht.

### 5.1 Funktionalitätstestung nach Bildgebungsprotokoll

Bei der in Analogie zu den Bildgebungsversuchen durchgeführten *in vivo*-Testung der T-Zell-Funktionalität unter OKT11 (anti-CD2), T3-3A1 (anti-CD7) und Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Gabe wurden die Mäuse am achten Tag nach ML2-B7-Tumorzell-Injektion mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelt (Mall et al. 2016, Abb. S1B in Mayer et al. 2018 und Abb. 7).

Dabei ging die gemessene Tumorgroße bei den Tieren, die T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment erhalten hatten, vier Tage nach Applikation der T-Zellen zurück (Abb. 7A in Mayer et al. 2018 und Abb. 17), was mit der von Mall und Kollegen beschriebenen Kinetik der Tumorelimination übereinstimmt (Mall et al. 2016). Eine solche Größenreduktion der ML2-B7 Tumoren wurde hingegen nicht bei den mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tieren beobachtet (Abb. 7A in Mayer et al. 2018 und Abb. 17). Stattdessen zeigte sich trotz zwischenzeitlicher Stagnation des Tumorwachstums nach T-Zell-Gabe schließlich ein kontinuierlicher Anstieg der Tumorgroße (Abb. 7A in Mayer et al. 2018 und Abb. 17). Für die ML2-B15 Kontrolltumoren konnte ein annähernd lineares Wachstum für alle drei Gruppen festgestellt werden (Abb. 7A in Mayer et al. 2018).

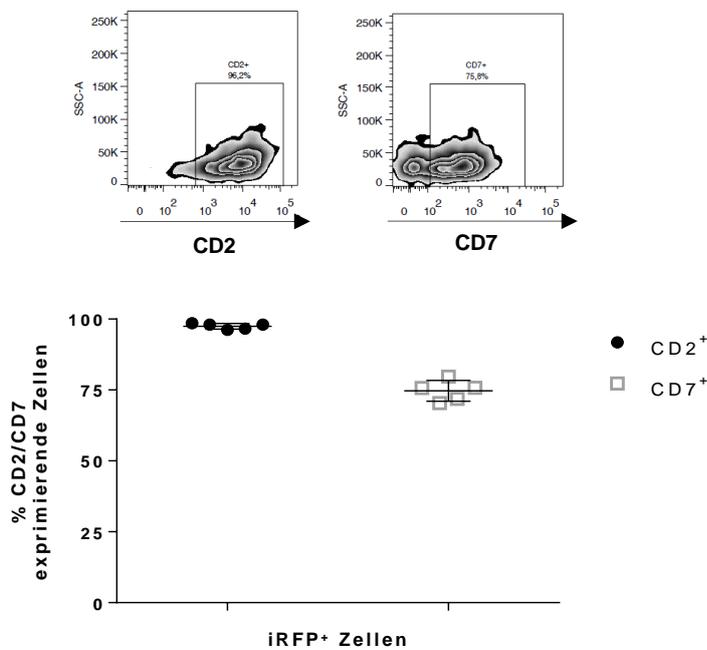


**Abbildung 17. Tumorwachstum der ML2-B7 Tumoren im Modell eines adoptiven T-Zell-Transfers unter OKT11 (anti-CD2), T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub>.** Die F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden am dritten Tag nach T-Zell-Injektion verabreicht. Es sind die Wachstumskurven der Tumorgröße in mm<sup>2</sup> der einzelnen Versuchstiere dargestellt, deren Mittelwerte in Abb. 7A in Mayer et al. 2018 gezeigt sind.

Diese Unterschiede in Bezug auf den Therapieerfolg des adoptiven T-Zell-Transfers für die mit OKT11 (anti-CD2) bzw. T3-3A1 (anti-CD7) und Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tiere zeigten sich auch am finalen Gewicht der ML2-B7 Tumoren (Abb. 7B in Mayer et al. 2018).

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen der Tumoren sowie weiterer Organe konnte als Grund hierfür eine deutlich reduzierte T-Zell-Zahl für die mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tiere zeigen (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). Neben den ML2-B7 Tumoren waren hiervon besonders die Milz und - wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß - das Blut betroffen (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). Im Knochenmark hingegen wurde keine derartige Abnahme der T-Zellen unter OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> festgestellt (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). Beim Vergleich der mit T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tiere wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Prozentsätzen an detektierten T-Zellen gefunden (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018).

In diesem Zusammenhang wurde auch die Expression von CD2 und CD7 auf iRFP<sup>+</sup> TIL der mit Isotyp-F(ab)<sup>2</sup> Fragment behandelten Tiere elf Tage nach T-Zell-Gabe untersucht, um Hinweise auf die Relevanz der beiden Zielantigene im Kontext des hier untersuchten Modells eines adoptiven T-Zell-Transfers *in vivo* zu erhalten. Dabei zeigte sich ein Anteil von  $97,5 \pm 0,9\%$  CD2<sup>+</sup> und  $74,7 \pm 3,7\%$  CD7<sup>+</sup> Zellen (Abb. 18).

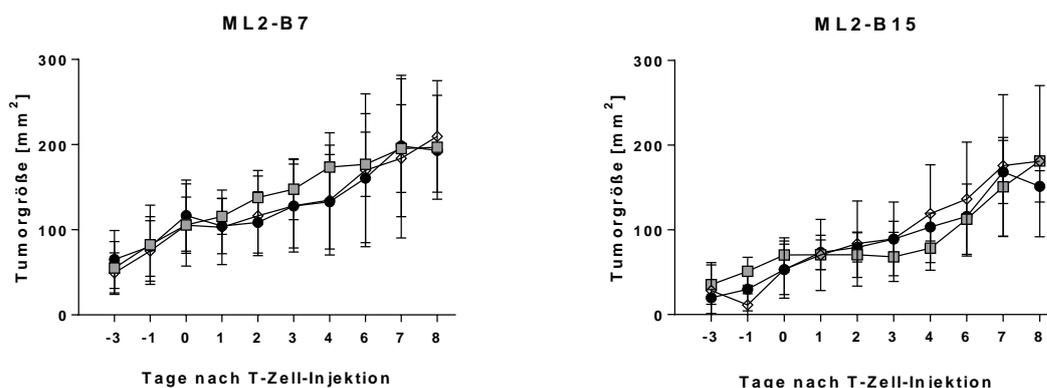


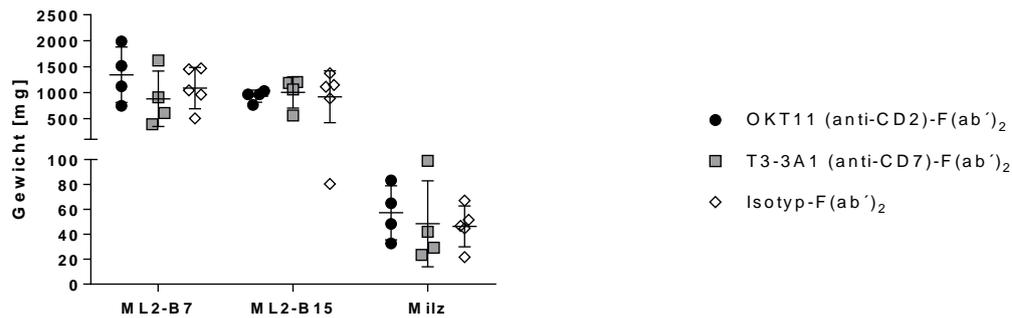
**Abbildung 18. Expression von CD2 und CD7 auf tumorinfiltrierenden T-Zellen.** Die Darstellung entspricht Abbildung R2 des Response Letters an Theranostics. Neben je einer repräsentativen Darstellung zur Bestimmung der Expression von CD2 bzw. CD7 (oben) auf tumorinfiltrierenden iRFP<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> T-Zellen der mit Isotyp-F(ab)<sup>2</sup> behandelten Tiere kommt der Anteil CD2<sup>+</sup> bzw. CD7<sup>+</sup> T-Zellen als Mittelwert  $\pm$  sd aller (n=5) Tiere zur Darstellung (unten).

## 5.2 Funktionalitätstestung bei verzögerter T-Zell-Gabe

Darüberhinaus wurde der Einfluss der verschiedenen F(ab)<sup>2</sup> Fragmente auf den antitumoralen Effekt transduzierter T-Zellen *in vivo* untersucht, wenn diese vier Tage später appliziert wurden (Abb. 7).

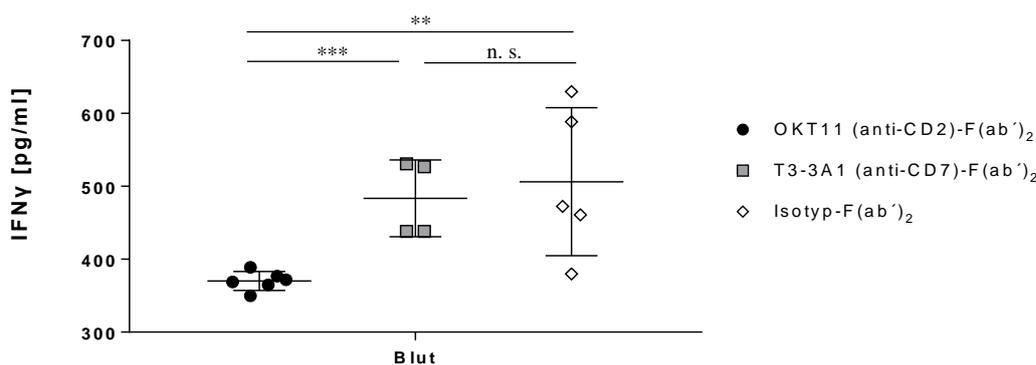
Die Entwicklung der gemessenen Tumorgöße und das Endgewicht der ML2-B7 Tumoren unterschieden sich dabei nicht von den ML2-B15 Kontrolltumoren (Abb. 19).



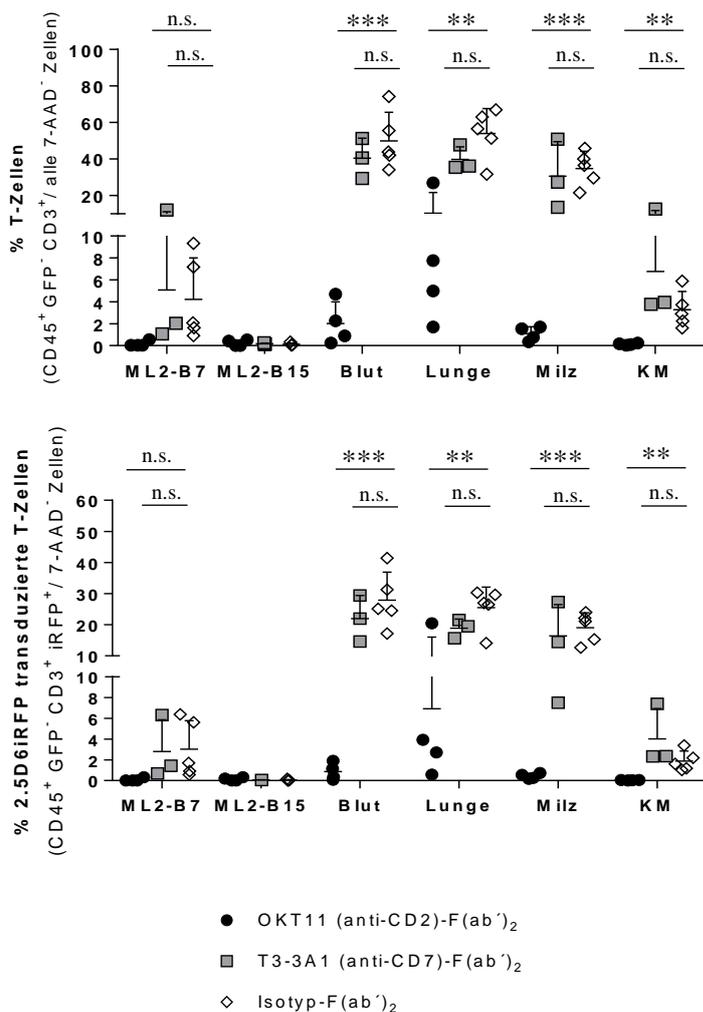


**Abbildung 19. Tumorgröße und -engewicht der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten bei verzögerter T-Zell-Injektion.** TCR2.5D6iRFP T-Zellen wurden zwölf Tage nach Injektion der ML2-B7 bzw. ML2-B15 Tumorzellen verabreicht. Die getesteten F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden wiederum am dritten Tag nach T-Zell-Gabe i.v. appliziert. Es sind die Wachstumskurven der Tumorgröße in mm<sup>2</sup> (oben) als Mittelwerte ± sd der mit OKT11 (anti-CD2) (n=4), T3-3A1 (anti-CD7) (n=4) und Isotyp (n=5)-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tiere für deren ML2-B7 (links) und ML2-B15 Tumoren (rechts) dargestellt. Außerdem wurde das Gewicht der Tumoren und der Milz am finalen elften Tag nach T<sub>CM</sub>-Gabe bestimmt (unten).

Um frühzeitige Effekte der applizierten F(ab')<sub>2</sub> Fragmente zu untersuchen, wurde den Mäusen zudem 48 Stunden nach Injektion der getesteten F(ab')<sub>2</sub> Fragmente Blut abgenommen, um die IFN $\gamma$ -Konzentration im Serum zu bestimmen. Dabei fiel auf, dass die IFN $\gamma$ -Spiegel für die mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Versuchstiere tendentiell unter denjenigen der Tiere, welche T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> erhalten hatten, lagen (Abb. 20).



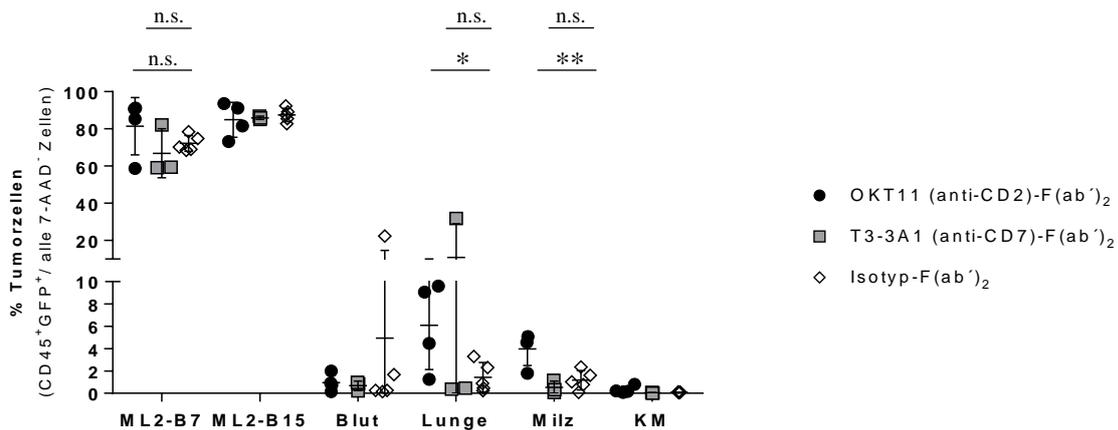
**Abbildung 20. IFN $\gamma$ -Serumkonzentrationen 48 Stunden nach Injektion von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten im Rahmen der *in vivo*-Funktionalitätstestung unter verzögerter T-Zell-Injektion.** Die mit Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tiere dienten als Kontrollen. Neben den IFN $\gamma$ -Serumkonzentrationen für die einzelnen Versuchstiere sind die Mittelwerte ± sd für die entsprechenden Gruppen dargestellt. Ungepaarter t-Test: n.s. nicht signifikant, \*\* p<0.01 und \*\*\* p<0.001.



**Abbildung 21. T-Zell-Analyse der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten nach verzögerter T-Zell-Injektion.** Die Tiere hatten TCR2.5D6iRFP T-Zellen zwölf Tage nach Injektion von ML2-B7 bzw. ML2-B15 Tumorzellen erhalten, die getesteten F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden weitere drei Tage später injiziert. Am achten Tag nach T-Zell-Gabe wurden die Tumoren, Blut, Lunge, Milz und Knochenmark (KM) entnommen und durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit von T-Zellen untersucht. Der Anteil CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T-Zellen (oben) bzw. CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>iRFP<sup>+</sup> TCR2.5D6 transduzierter T-Zellen (unten) ist als Mittelwert ± sd für die ausgewiesenen Gruppen dargestellt.

Bei der finalen Zellanalyse am achten Tag nach T-Zell-Injektion konnten für die mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment injizierten Tiere lediglich in Lunge, Blut und in sehr geringem Maße in der Milz T-Zellen detektiert werden (Abb. 21). Im Vergleich zu den mit T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tiere war hier der Anteil an T-Zellen deutlich reduziert (Abb. 21). In den ML2-B7 Tumoren und dem Knochenmark konnten hingegen bei den mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tieren keine T-Zellen detektiert werden, während diese Organe bei den beiden anderen Gruppen ebenfalls T-Zellen aufwiesen (Abb. 21).

Die durchflusszytometrische Analyse hinsichtlich Tumorzellen in den verschiedenen Organen wies solche neben den Tumoren auch in der Lunge und Milz der Tiere nach, welche OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment erhalten hatten (Abb. 22), was als Hinweis auf eine metastatische Aussaat der Tumorzellen interpretiert werden kann. Für die mit T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tiere ließen sich hingegen nur in einzelnen Tieren Tumorzellen in anderen Organen als den Primärtumoren detektieren (Abb. 22).



**Abbildung 22. Tumorzell-Analyse der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten bei verzögerter T-Zell-Injektion.** Die am achten Tag nach T-Zell-Gabe entnommenen Tumoren sowie weitere Organe wurden durchflusszytometrisch auf Tumorzellen untersucht. Der Anteil CD45<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Tumorzellen ist als Mittelwert ± sd für die jeweiligen Gruppen dargestellt. Ungepaarter t-Test: n.s. nicht signifikant, \* p<0.05 und \*\* p<0.01.

## 6. *In vivo*-Bildgebung mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten

### 6.1 PET/CT mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten

Um die Eignung der Zielstrukturen CD2 und CD7 für die Bildgebung im immuntherapeutischen Kontext zu prüfen, wurden in Kooperation mit der Klinik für Nuklearmedizin (insb. Nahid Yusufi, Calogero D'Alessandria, Sybille Reeder und Markus Mittelhäuser) <sup>89</sup>Zr-gelabelte OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (<sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> und <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub>) an Tieren getestet, welche entweder tumorspezifische TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> oder DPBS erhalten hatten (Abb. S1A in Mayer et al. 2018).

Hierbei wurden für beide Tracer aussagekräftige PET/CT-Bilder akquiriert, welche eine tumorspezifische Anreicherung von T-Zellen mit von zentral nach peripher abnehmender Signalstärke zeigen konnten (Abb. 5A in Mayer et al. 2018). In den ML2-B15 Kontrolltumoren sowie den ausschließlich mit DPBS injizierten Tieren kam es hingegen nicht zu einer sich vom umliegenden Gewebe abhebenden Traceranreicherung (Abb. 5A in Mayer et al. 2018).

Diese Ergebnisse konnten mit der Biodistributionsanalyse der entnommenen Organe korreliert werden (Abb. 5B-C in Mayer et al. 2018). Die % ID/g in den ML2-B7 Tumoren nach <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Gabe lag für die mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere um etwa das 4,6-fache über der in den ML2-B15 Tumoren (Tab. S3 in Mayer et al. 2018). Im Vergleich zu dem Tier, welches DPBS anstelle der T-Zellen erhalten hatte, betrug die Traceranreicherung in den ML2-B7 Tumoren das

ca. 3,4-fache (Tab. S3 in Mayer et al. 2018). Für  $^{89}\text{Zr-T3-3A1}$  (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente zeigte sich mit etwa 4,8-facher % ID/g in den ML2-B7 Tumoren zu den ML2-B15 Tumoren eine der den  $^{89}\text{Zr-OKT11}$  (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten vergleichbare Tracerakkumulation in den durch spezifische T-Zellen erkannten Tumoren (Tab. S4 in Mayer et al. 2018). Der Vergleich zwischen den Tieren, die TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> bzw. DPBS erhalten hatten, erbrachte eine ca. 6,1-fach höhere % ID/g in ML2-B7 Tumoren für die mit tumorspezifischen T-Zellen behandelten Tiere (Tab. S4 in Mayer et al. 2018). Bei etwas höherer % ID/g im Blut der mit  $^{89}\text{Zr-OKT11}$  (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tiere ergaben sich Organ-zu-Blut-Ratios ähnlicher Größenordnung in den untersuchten Tumoren für  $^{89}\text{Zr-OKT11}$  (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> und  $^{89}\text{Zr-T3-3A1}$  (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Abb. 5C in Mayer et al. 2018).

Für beide Tracer konnte außerdem im Vergleich zu dem Tier, welches DPBS erhalten hatte, eine verstärkte Aufnahme in der Milz festgestellt werden (Abb. 5B-C sowie Tab. S3 und S4 in Mayer et al. 2018), was auf die dortige Anwesenheit von T-Zellen schließen lässt. Die finale durchflusszytometrische Analyse der Milzen konnte jedoch nur in den mit  $^{89}\text{Zr-T3-3A1}$  (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tieren 7AAD<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (Abb. 5D in Mayer et al. 2018). Dabei lag der Anteil an T-Zellen in der Milz für mit  $^{89}\text{Zr-T3-3A1}$  (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment injizierte Tiere höher als in den ML2-B7 Tumoren (Abb. 5D in Mayer et al. 2018), was mit den entsprechenden % ID/g und Organ-zu-Blut-Ratios korrelierte (Abb. 5B-C in Mayer et al. 2018). In den Milzen der mit  $^{89}\text{Zr-OKT11}$  (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tiere konnten jedoch keine vitalen T-Zellen detektiert werden und auch in den ML2-B7 Tumoren lag der 7AAD<sup>+</sup> T-Zell-Anteil unter dem der Tiere, welche  $^{89}\text{Zr-T3-3A1}$  (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente erhalten hatten (Abb. 5D in Mayer et al. 2018).

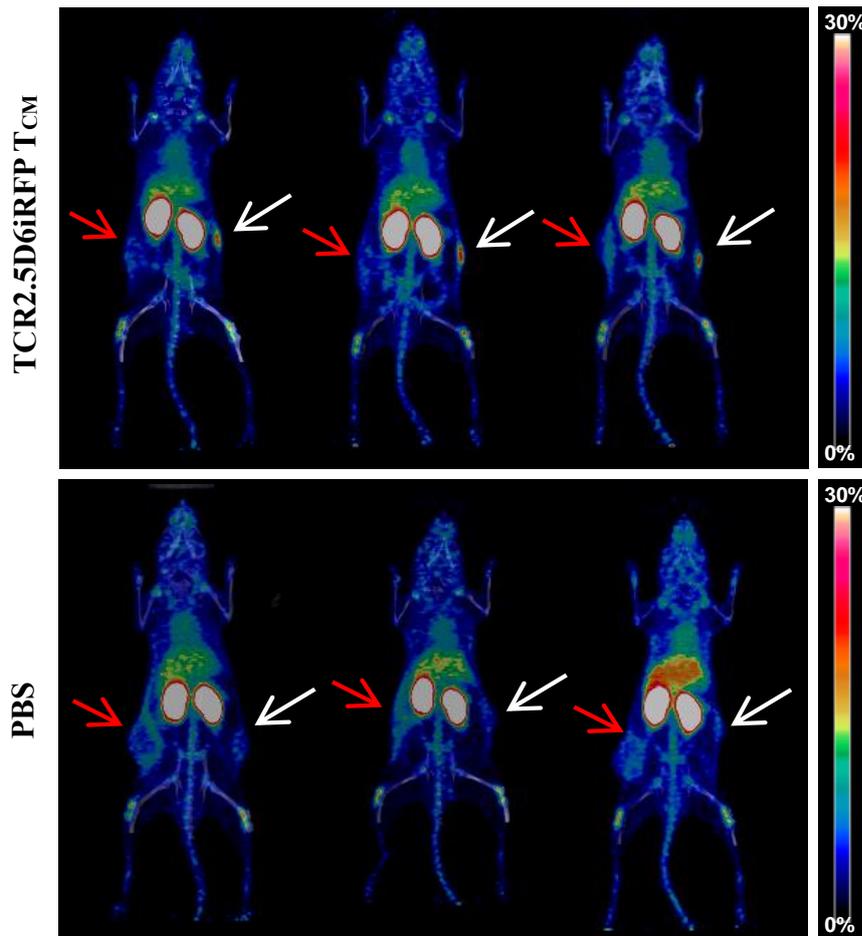
## **6.2 In vivo-Charakterisierung von $^{89}\text{Zr-OKT11}$ (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten**

Zur genaueren Charakterisierung von  $^{89}\text{Zr-OKT11}$  (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten als Tracer wurde ein weiterer Bildgebungsversuch in Kooperation mit der Klinik für Nuklearmedizin (insb. Lisa Russell, Francesco de Rose, Calogero D'Alessandria, Sybille Reeder und Markus Mittelhäuser) mit einer aussagekräftigen Anzahl an ausschließlich mit DPBS injizierten Kontrolltieren durchgeführt.

Für die mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere wurde auf den PET/CT-Bildern wie bereits zuvor beschrieben eine starke Traceranreicherung in den ML2-B7 Tumoren im Vergleich zu den ML2-B15 Kontrolltumoren und den ML2-B7 Tumoren der mit DPBS injizierten Tiere festgestellt (Abb. 23).

Auch die Biodistributionsanalyse konnte die spezifische Tracerakkumulation in den ML2-B7 Tumoren der mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere nachweisen, während in den ML2-B15 Tumoren eine radioaktive Dosis, welche der der Tumoren der mit DPBS injizierten Tiere vergleichbar war, detektiert wurde (Abb. 24 und Tab. 10). Die Traceranreicherung in den ML2-B7 Tumoren der mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere konnte anhand der durchflusszytometrischen Analyse der Tumorzellsuspensionen auf ein T-Zell-Infiltrat zurückgeführt werden (Abb. 24).

<sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2) F(ab')<sub>2</sub> Fragmente

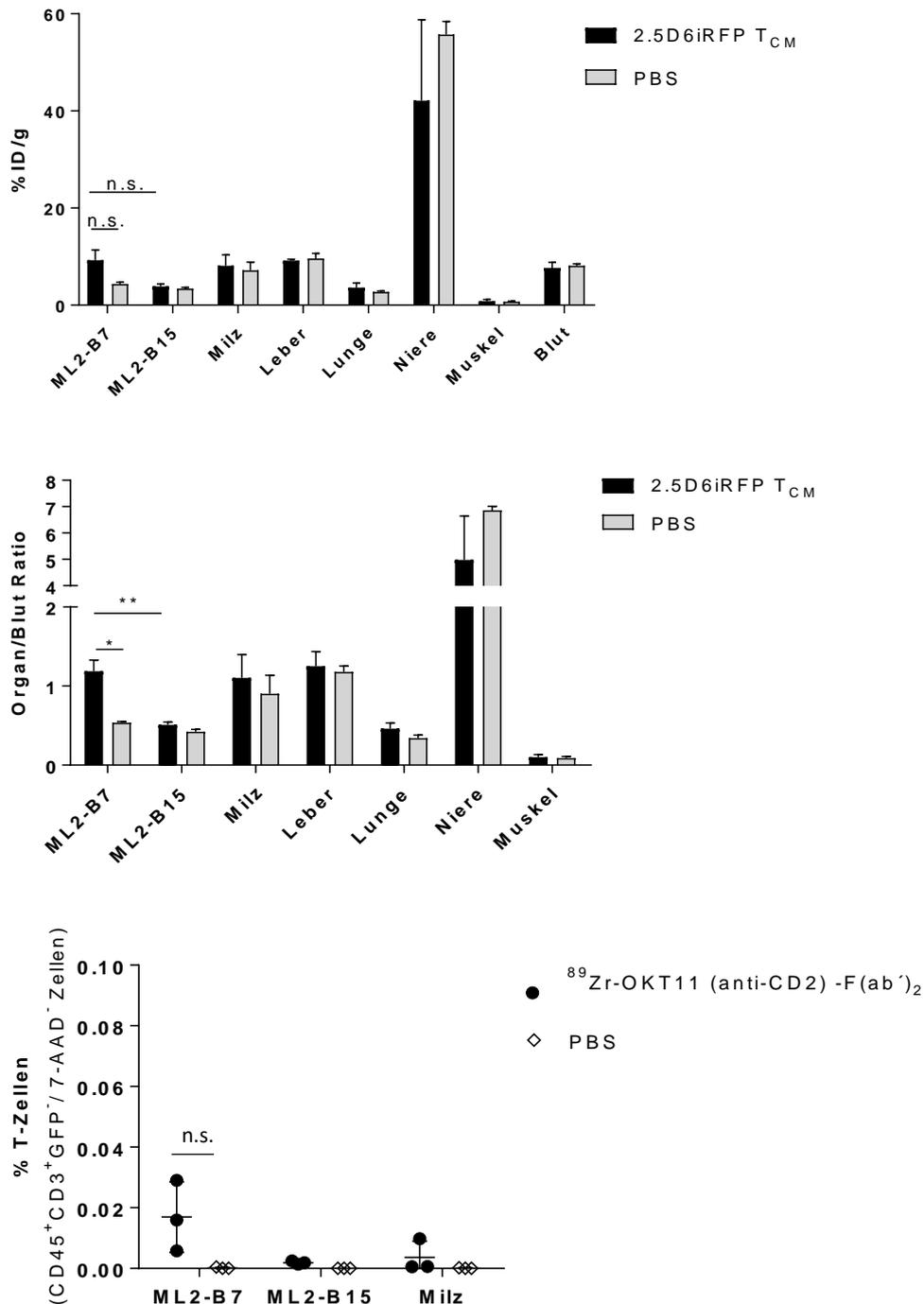


**Abbildung 23. PET/CT-Bilder *in vivo* mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten.** Die Tiere erhielten entweder TCD2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> (oben) oder PBS (unten) nach Bildgebungsprotokoll (Figure S1A in Mayer et al. 2018). Die PET/CT-Bilder (auch dargestellt in Abbildung R1 des Response Letters an Theranostics) sind als MIP dargestellt anhand einer Skala von 0-30 % ID/g. Die weißen Pfeile deuten auf die ML2-B7, die roten auf ML2-B15 Tumoren.

<sup>89</sup> Zr-OKT11-F(ab') <sub>2</sub>	TCR2.5D6iRFP T <sub>CM</sub>				DPBS			
	% ID/g	1	2	3	M ± sd	1	2	3
<b>Blut</b>	8,91	5,39	8,78	7,69 ± 1,63	7,91	7,56	8,91	8,13 ± 0,57
<b>Lunge</b>	5,40	2,08	3,41	3,63 ± 1,36	2,59	3,13	2,50	2,74 ± 0,28
<b>Leber</b>	9,21	8,74	9,63	9,19 ± 0,36	8,27	8,91	11,67	9,62 ± 1,48
<b>Milz</b>	12,46	805,32	7,09	9,78 ± 2,69	9,92	7,49	4,13	7,03 ± 2,90
<b>Niere</b>	60,91	8,95	56,56	42,14 ± 23,54	56,64	50,58	59,89	55,70 ± 3,86
<b>Muskel</b>	0,95	0,20	1,35	0,83 ± 0,48	0,58	0,98	0,54	0,70 ± 0,20
<b>ML2-B15 Tumor</b>	3,87	5,85	4,77	4,83 ± 0,81	2,96	3,60	3,74	3,43 ± 0,34
<b>ML2-B7 Tumor</b>	13,08	2,94	8,89	8,30 ± 4,16	4,22	3,88	5,01	4,37 ± 0,47

**Tabelle 10. Biodistributionsanalyse der *in vivo*-T-Zell-Bildgebung mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten.** Zur Darstellung kommen die % ID/g verschiedener Organe und der Tumoren für

jedes der mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> (n=3) bzw. DPBS (n=3) sowie <sup>89</sup>Zr-OKT11-F(ab')<sub>2</sub> behandelten Tiere sowie der Mittelwert (M) ± sd der jeweiligen Gruppe.



**Abbildung 24. *In vivo*-T-Zell-Bildgebung mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten.** Die Darstellung entspricht zum Teil Abbildung R1 des Response Letters an Theranostics. Die Tiere erhielten nach dem Bildgebungsprotokoll neben ML2-B7 und ML2-B15 Tumorzellen sowie <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> entweder TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> (n=3) oder DPBS (n=3) als Kontrolle (Abb. S1A in Mayer et al. 2018). Die Ergebnisse der Biodistributionsanalyse sind als Akkumulation der Aktivität in % ID/g (oben) bzw. Organ-zu-Blut-Ratios (Mitte) dargestellt. Der Anteil an T-Zellen umfasst die

durchflusszytometrisch detektierten CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> T-Zellen an allen 7AAD<sup>-</sup> Zellen (unten). Es sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  sd angegeben. Ungepaarter t-Test: n.s. nicht signifikant, \* p<0.05 und \*\* p<0.01.

So konnte bei einer repräsentativen Zahl an DPBS injizierten Kontrolltieren eine unspezifische Anreicherung des Tracers ausgeschlossen werden (Abb. 24 und Tab. 10).

### **6.3 Detektion tumorreaktiver T-Zellen mittels <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten *in vivo***

Für T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die T-Zell-Funktion nicht beeinflussten, wurde deren Spezifität für tumorreaktive T-Zellen weiter untersucht. Da die Zielstruktur CD7 auch auf residenten und unspezifischen T-Zellen exprimiert wird, sollte die Eignung zur Detektion tumorspezifischer T-Zellen in diesem Tumormodell eingehender evaluiert werden. Dazu erhielten die Versuchstiere mit ML2-B7 und ML2-B15 Tumoren entweder tumorspezifische TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> oder unspezifische iRFP T<sub>CM</sub> intravenös und wurden nach Tracergabe von <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten einer PET/CT-Bildgebung unterzogen (Abb. S1A in Mayer et al. 2018).

Bei den mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tieren zeigte sich ein umschriebenes Signal in der Flankenregion, welche mit ML2-B7 Tumorzellen beimpft worden war (Abb. 8A in Mayer et al. 2018). Auf den PET/CT-Bilder der mit den unspezifischen iRFP T<sub>CM</sub> injizierten Tieren hingegen wurde kein Signal im Bereich der beiden Tumore detektiert (Abb. 8A in Mayer et al. 2018). In der *ex vivo*-Biodistributionsanalyse wurde bei den mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tieren in den ML2-B7 Tumoren im Vergleich zu den ML2-B15 Kontrolltumoren erwartungsgemäß eine höhere Aktivität detektiert (Abb. 8B-C in Mayer et al. 2018). In einem ähnlichen Bereich wie für die ML2-B15 Tumoren lagen die % ID/g-Werte der ML2-B7 Tumoren der mit iRFP T<sub>CM</sub> injizierten Tiere (Abb. 8B-C in Mayer et al. 2018). Entsprechend ließen sich für die mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere T-Zellen in den ML2-B7 Tumoren nachweisen, was für die mit iRFP T<sub>CM</sub> injizierten Tiere nicht der Fall war (Abb. 8D in Mayer et al. 2018), sodass sich das ausbleibende Signal im PET/CT bzw. bei der Biodistributionsanalyse für die mit iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere auf das Fehlen von T-Zellen zurückführen ließ. Andererseits zeigte sich für die Tiere, die iRFP T<sub>CM</sub> erhalten hatten, eine Tracerakkumulation in der Milz, welche derjenigen der mit TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere vergleichbar war (Abb. 8B-C in Mayer et al. 2018). Korrespondierend hierzu, konnten in der durchflusszytometrischen Analyse dort auch für beide Gruppen T-Zellen detektiert werden (Abb. 8D in Mayer et al. 2018).

Die Tumorspezifität der TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> wurde anhand des im Vergleich zum ML2-B15 Kontrolltumor und den mit unspezifischen T-Zellen behandelten Mäusen deutlich reduzierten Prozentsatzes an Tumorzellen in den ML2-B7 Tumoren nachgewiesen (Abb. 8F in Mayer et al. 2018).

## Diskussion

### 1. Beurteilung des Therapieansprechens antitumoraler Immuntherapien

Die Grundlage für die Entwicklung der Immuntherapien, welche die Tumorthherapie in den vergangenen Jahren grundlegend veränderten (Kruger et al. 2019, Ribas und Wolchok 2018, Tang et al. 2018, Waldman et al. 2020), legte ein Richtungswechsel von der alleinigen Fokussierung auf den Tumor und seine Biologie hin zu dessen Interaktion mit dem patientenspezifischen Immunsystem (Chen und Mellman 2017, Dunn et al. 2002, O'Donnell et al. 2019). So ist bei Immuntherapien nicht der Tumor das vorwiegende therapeutische Angriffsziel, wie dies bspw. bei der Chemo- oder Strahlentherapie der Fall ist, sondern es wird die antitumorale Aktivität des patienteneigenen Immunsystems mit seinen vielen unterschiedlichen Komponenten gefördert (June et al. 2018, Ribas und Wolchok 2018, Rosenberg und Restifo 2015). Im Rahmen dessen entwickelte sich auch ein tiefgreifenderes Verständnis für das Tumormikromilieu, welches den Tumor und die Immunantwort, die vorwiegend zelluläre Komponenten darstellen, ebenfalls wesentlich beeinflusst (Chen und Mellman 2017, O'Donnell et al. 2019).

Aus der Komplexität der zusammenwirkenden Faktoren erklären sich auch die interindividuellen Unterschiede in Bezug auf das Ansprechen von Immuntherapien, das u. a. in Abhängigkeit von der Tumorentität deutlich variiert (Borcoman et al. 2019, Ribas und Wolchok 2018). Da Immuntherapien andersartige Therapieantworten wie bspw. Pseudoprogression oder Hyperprogression, aber auch z. T. langandauerndes Ansprechen induzieren, ergeben sich im Vergleich zu den konventionellen Tumortherapien wesentliche Unterschiede und neuartige Anforderungen bei der Beurteilung des Therapieansprechens (Beaver et al. 2018, Borcoman et al. 2019, Champiat et al. 2017, Chiou und Burotto 2015, Hodi et al. 2016). Therapieantworten korrekt einzuordnen oder das zu erwartende Therapieansprechen sogar vor Therapiebeginn abschätzen zu können, ist besonders vor dem Hintergrund der hohen mit der Therapie verbundenen Kosten sowie möglicher gravierender und nicht seltener Nebenwirkungen (Bertrand et al. 2015, Martins et al. 2019, Neelapu et al. 2018) von besonderer Relevanz.

Die histologische, immunhistochemische und genetische Analyse von Tumorbiopsien ermöglicht grundsätzlich vielfältige Aussagen für das Geschehen im Tumor und kann im Rahmen von Immuntherapien auch prätherapeutisch Hinweise auf ein Ansprechen geben (Ayers et al. 2017, Fridman et al. 2017). Dabei wurden die DNA-Mutationslast, die Dichte an TIL und deren Verhältnis zu den Tumorzellen sowie die PD-L1-Expression als geeignete Prädiktoren für ein späteres Therapieansprechen identifiziert (Herbst et al. 2014, Huang et al. 2017, Topalian et al. 2016, Tumei et al. 2014), auch wenn diese im Kontext verschiedener Tumorentitäten von unterschiedlicher Bedeutung zu sein scheinen (Daud et al. 2016b, Reck et al. 2016, Topalian et al. 2016). Aber auch nach Therapiebeginn können Tumorbiopsate zur objektiven Beurteilung des Therapieansprechens herangezogen werden und somit Entscheidungen über den weiteren Therapieverlauf erleichtern. Bei Biopsaten gibt es jedoch zu beachten, dass für sie immer invasive Eingriffe vorgenommen werden

müssen, welche je nach Tumorlokalisation von unterschiedlichem Umfang sind und besonders bei tief gelegenen Tumoren einen großen operativen Aufwand bedingen. Außerdem ermöglicht eine Biopsie immer nur Aussagen über das biopsierte Gewebe und lässt keinesfalls Schlüsse auf das restliche Tumorgewebe und weitere Tumorerkrankungen wie Metastasen zu (Müller et al. 2016). Es ist allerdings durchaus bekannt, dass Tumorerkrankungen während einer Immuntherapie unterschiedliches Ansprechen zeigen können, was dann als „dissociated response“ bezeichnet wird (Tazdait et al. 2018).

Um also einerseits einen Überblick über die gesamte Tumormasse zu bekommen und die Tumoren andererseits nicht-invasiv darzustellen, bedient man sich i. d. R. hochauflösender Bildgebungsmethoden wie dem CT, MRT oder auch funktioneller Darstellungen mittels PET. Im Kontext von Immuntherapien lassen sich jedoch etablierte Bildgebungsmodalitäten und deren Bewertungskriterien, wie sie routinemäßig in der Onkologie eingesetzt werden, nicht ohne Weiteres übertragen. So konnte gezeigt werden, dass die für konventionelle Therapien von soliden Tumoren zur Beurteilung von CT-Scans etablierten RECIST-Kriterien (Eisenhauer et al. 2009, Schwartz et al. 2016) im Kontext von Immuntherapien das Ansprechen bspw. im Vergleich zu den iRC bei ca. 15% der Patienten unterschätzen (Hodi et al. 2016). Dies erfordert entsprechend auf Immuntherapien ausgelegte Beurteilungshilfen (Cheson et al. 2016, Seymour et al. 2017, Wolchok et al. 2009) oder neuartige Methoden. Für die alternativ zu den RECIST-Kriterien aufgestellten iRECIST (Seymour et al. 2017), konnte insb. eine bessere Korrelation bezüglich des progressionsfreien Überlebens herausgestellt werden (Park et al. 2021). Auch für die  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/(CT), welche als nuklearmedizinische Bildgebungsmodalität auf funktionelle Eigenschaften des untersuchten Gewebes schließen lässt, wird untersucht, ob sie in der Lage ist, Ansprechen präzise zu detektieren und vorherzusagen (Chen et al. 2020, Dimitrakopoulou-Strauss 2019, Sachpekidis et al. 2020, Seban et al. 2020, Seith et al. 2018). Für die Evaluation der  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/CT-Scans wurden dabei auf ähnliche Weise wie für die Auswertung von CT-Aufnahmen unterschiedliche Kriterien vorgeschlagen (Anwar et al. 2018, Cho et al. 2017). Beim Vergleich von PET- und CT-basierten Methoden im Kontext von Immuntherapien beim NSCLC konnte herausgestellt werden, dass die mit dem Überleben korrelierte Beurteilung des Ansprechens mittels CT durch PET-basierte Methoden präzisiert werden kann, wobei beiden Bildgebungsmodalitäten je nach Kontext unterschiedliche Relevanz zuzukommen scheint (Rossi et al. 2020).

Besondere Schwierigkeit bereitet insb. die Vorhersage über das zu erwartende Therapieansprechen im Vorfeld einer Immuntherapie. Auch wenn es einzelne Hinweise darauf gibt, dass allein eine prätherapeutische Bildgebung mittels  $^{18}\text{F}$ FDG-PET/CT für die Vorhersage von Therapieansprechen ausreichen könnte (Anwar et al. 2018, Cho et al. 2017, Takada et al. 2019), wurde hierfür bis jetzt kein allgemeiner Surrogatparameter identifiziert (Ayati et al. 2021). Eine weitere bisher nicht ausreichend adressierte Schwierigkeit stellt das Erkennen primärer bzw. adaptiver Resistenz dar (Rossi et al. 2018). Im Gegensatz zum  $^{18}\text{F}$ FDG-PET weist  $^{18}\text{F}$ -Ara-G eine höhere Spezifität für T-Zellen auf und kann damit die Differenzierung zwischen Tumor- und Immunzellen, was im Rahmen des  $^{18}\text{F}$ FDG-PET nur eingeschränkt möglich ist (Laing et al. 2010), erleichtern (Levi et al. 2019, Ronald et al. 2017). Levi

und Kollegen konnten in einem murinen Tiermodell der Immuncheckpoint-Therapie von Rhabdomyosarkomen zeigen, dass unter einer Bildgebung mit  $^{18}\text{F}$ -Ara-G im Vergleich zu  $^{18}\text{F}$ FDG der Verlauf der antitumoralen Immunantwort besser nachvollzogen werden kann (Levi et al. 2019). Gleichzeitig kann das  $^{18}\text{F}$ -Ara-G-Signal im Tumor zur Beurteilung des Therapieansprechens herangezogen und unter Analyse des Signals der drainierenden Lymphknoten weiter präzisiert werden (Levi et al. 2019).

Neben alternativen metabolischen Tracern verschob sich der Fokus hin zu anderen Surrogatparametern. In diesem Zusammenhang erwies sich insb. das Konzept des immuno-PET aufgrund der Antigenspezifität und hohen Affinität der verwendeten Antikörper bzw. seiner Konstrukte für die Detektion von Markersubstanzen als geeignet (Wu 2009). Aufgrund prognostischer Relevanz spielen dabei im Kontext der Vielfalt von Immuntherapien v. a. unterschiedliche Marker für T-Zellen bzw. deren Subpopulationen eine Rolle. Dies beruht auf der Überlegung, dass T-Zellen die Hauptakteure immunbasierter Therapien sind (Ribas und Wolchok 2018, Rosenberg und Restifo 2015) und von diesen exprimierte Oberflächenmoleküle wie PD-L1 oder CD8 als Biomarker für ein Therapieansprechen identifiziert wurden (Daud et al. 2016a, Herbst et al. 2014, Tumeh et al. 2014, Topalian et al. 2016). Vor dem Hintergrund, dass sich das Feld immuntherapeutischer Ansätze stetig erweitert (Anderson et al. 2016, Waldman et al. 2020), bieten T-Zellen als Zielstrukturen außerdem den Vorteil, die Endstrecke effektiver Immuntherapien abzubilden. So kann aufgrund ihrer Präsenz auf eine effizient ablaufende Immunkaskade geschlossen werden, die durch verschiedene Therapien auf unterschiedlichste Weise moduliert sein kann. Auch im Rahmen von Kombinationstherapien, die durch verschiedenste Therapiebausteine darauf abzielen, die Aktivität von Effektor-T-Zellen zu steigern (Barroso-Sousa und Ott 2018, Sakuishi et al. 2010, Woo et al. 2012), mag eine T-Zell-basierte Bildgebung einen schnellen Überblick über den Therapieerfolg ermöglichen. Es ist anzunehmen, dass sich dabei das Zusammenspiel verschiedener immuntherapeutischer Komponenten zuverlässig anhand von T-Zell-Markern beurteilen lässt, ohne dass separate Bildgebungsmethoden für jeden einzelnen Therapiebaustein benötigt werden. Für einen gegen CD8 gerichteten cys-Diabody konnte gezeigt werden, dass dieser in der Lage ist, im Kontext von ACT, Immuncheckpoint-Blockade und CD137-agonistischer Therapie unabhängig vom Therapiekonzept immuntherapeutische Antworten darzustellen (Tavaré et al. 2016). Entsprechend ist davon auszugehen, dass eine T-Zell-basierte Bildgebung leichter auf andere Therapiekonzepte übertragbar ist als andere therapiespezifischere Marker wie bspw. ein von transduzierten T-Zellen exprimierter TCR mit murinem Abschnitt (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017), was ein breiteres Spektrum möglicher Anwendungsbereiche eröffnet.

Da die T-Zell-Dichte, die u. a. mit dem Ansprechen bei Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie korreliert (Tumeh et al. 2014, Huang et al. 2017), auch einen Hinweis auf eine stattfindende Proliferation im Rahmen der T-Zell-Aktivierung gibt, scheint eine Korrelation zwischen detektiertem T-Zell-spezifischem Signal und der Therapieeffizienz plausibel (Mayer et al. 2018, Sommermeyer et al. 2016, Tavaré et al. 2016). In klinischer Anwendung wurden bisher u. a. PD-1 und PD-L1 (Bensch et al. 2018,

Niemeijer et al. 2018, Xing et al. 2019), CD8 (Pandit-Taskar et al. 2020) sowie IL-2 (Markovic et al. 2018) als Zielstrukturen für die Markierung von T-Zellen getestet. Diese Marker sind geeignet, T-Zellen bzw. deren Effektormoleküle im Kontext von Immuntherapien mittels immuno-PET-basierter Bildgebung darzustellen. Für  $^{89}\text{Zr}$ -Atezolizumab konnte sogar gezeigt werden, dass das prätherapeutische PET-Signal besser mit dem Therapieansprechen korreliert als mittels IHC- oder auf RNA-Sequenzierung basierender Methoden zu erwarten wäre (Bensch et al. 2018). Neben prädiktiven Aussagen über ein Therapieansprechen gilt es des Weiteren zu prüfen, ob derartige immuno-PET-basierte Bildgebungen für T-Zell-Marker in der Lage sind, ein Ansprechen nach Therapiebeginn sowie das Auftreten von Resistenz zuverlässig festzustellen und damit diagnostische Biopsien im Therapieverlauf zu ersetzen.

## 2. CD2, CD3 und CD7 als Zielstrukturen für pan-T-Zell-Tracer

In dieser Arbeit wurden CD2, CD3 und CD7 als mögliche Zielstrukturen für T-Zell-Tracer im Rahmen von onkologischen Immuntherapien untersucht. Es handelt sich dabei um sog. pan-T-Zell-Marker, welche als klassische T-Zell-Marker - im Gegensatz zu vielen anderen potentiellen T-Zell-Markern - auf den meisten T-Zell-Subpopulationen und in unterschiedlichen Aktivierungszuständen auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert werden. Auch wenn sich deren Expressionsgrad unterschied (Abb. 1A in Mayer et al. 2018), erwies sich ein sehr hoher Prozentsatz der frisch aus dem Blut gesunder Spender isolierten T-Zell-Subpopulationen  $T_N$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{EFF}$  als positiv für alle drei untersuchten Marker (Abb. S2 und Tabelle S1-2 in Mayer et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass CD2, CD3 und CD7 auf Monozyten und B-Zellen, sofern überhaupt, nur äußerst schwach exprimiert sind und damit als hoch spezifische T-Zell-Marker gelten können (Abb. S3 in Mayer et al. 2018).

Die Auswahl eines pan-T-Zell-Markers basiert auf dem Ziel, einen derartigen Marker im Kontext diverser immunbasierter Tumortherapien zu verwenden. Dadurch dass für die unterschiedlichen immuntherapeutischen Konzepte z. T. unterschiedliche T-Zell-Populationen von Relevanz sind (Alspach et al. 2019, Davids et al. 2016, Hoepner et al. 2013, Kreiter et al. 2015, Mattes et al. 2003, Sharma et al. 2019, Sommermeyer et al. 2016, Tran et al. 2014, Trzonkowski et al. 2009), ist davon auszugehen, dass bei Verwendung eines breit angelegten Markers auch eine Vielfalt von Immuntherapien abgedeckt werden kann. Im Kontext von GvHD oder Organtransplantation hingegen basieren immuntherapeutische Ansätze v. a. auf der Verwendung von  $T_{Reg}$  (Mathew et al. 2018, Trzonkowski et al. 2009), die hier jedoch eine untergeordnete Rolle spielen sollten.

Es wurden verschiedene gegen CD2, CD3 und CD7 gerichtete Antikörper und  $F(ab')_2$  Fragmente hinsichtlich ihrer Eignung als pan-T-Zell-Tracer zur Visualisierung tumorreaktiver T-Zellen im Rahmen onkologischer Immuntherapien charakterisiert, was anhand eines Modells des adoptiven T-Zell-Transfers untersucht wurde. Dabei lag ein besonderer Fokus darauf, mögliche funktionelle Einflüsse der angewendeten Tracer auf den Therapieverlauf zu erkennen bzw. auszuschließen.

## 2.1 CD3

Immuno-PET-Anwendungen mit der Zielstruktur CD3 wurden *in vivo* bereits in unterschiedlichem Kontext, u. a. bei Immuntherapien und GvHD, untersucht (Beckford Vera et al. 2018, Larimer et al. 2016, Moek et al. 2019, Pektor et al. 2020, Waaijer et al. 2020). So konnten im murinen Tiermodell bspw. TIL mittels eines gegen CD3 gerichteten  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpers dargestellt werden (Beckford Vera et al. 2018). Larimer und Kollegen erbrachten Hinweise, dass die Anreicherung von gegen CD3 gerichtetem Antikörper im Tumor unter Immuncheckpoint-Inhibition auf ein späteres Ansprechen hindeuten kann, auch wenn nur eine kleine Zahl an Tieren untersucht wurde (Larimer et al. 2016). Auch bei der Einschätzung der Aktivität einer GvHD und ihrer Behandlung mit regulatorischen T-Zellen können gegen CD3 gerichtete, antikörperbasierte Tracer als T-Zell-Marker genutzt werden (Pektor et al. 2020), auch wenn Pektor und Kollegen mit OKT3 hier einen Antikörper verwenden, von dem seine immunsuppressive Wirkung im Kontext von schweren Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen bekannt ist (Bonney-Berard und Revillard 1996, Hooks et al. 1991, Knop et al. 2005) und somit gleichzeitig therapeutische Effekte zu erwarten sind.

Daneben spielt CD3 als Zielstruktur von bispezifischen Antikörpern eine Rolle (Moek et al. 2019, Waaijer et al. 2020). Diese enthalten zwei antigenspezifische Domänen und vermitteln durch Erkennung potentieller Zielstrukturen auf Tumoren eine räumliche Nähe zu den Tumorzellen und durch die Erkennung von CD3 eine Aktivierung der T-Zellen. Bei der Anwendung des  $^{89}\text{Zr}$ -gelabelten AMG 211 bei Patienten mit gastrointestinalen Adenokarzinomen zeigte sich vor Therapie mit AMG 211 eine starke Traceraufnahme in lymphatischem Gewebe, die Anreicherung in Tumorgewebe hingegen war sowohl intra- als auch interindividuell sehr unterschiedlich (Moek et al. 2019). Bei den beiden Patienten, welche zuvor über 28 Tage durchgehend eine Behandlung mit AMG 211 erhalten hatten, ließen sich nach Gabe von  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 keine Tumorkläsionen mittels PET darstellen (Moek et al. 2019). Bis auf Fieber und Schüttelfrost bei zwei Patienten, was die Autoren auf die Freisetzung von Zytokinen zurückführten, wurden keine gravierenden Nebenwirkungen beobachtet (Moek et al. 2019). Allerdings bleibt unklar, inwieweit die prätherapeutische Bildgebung mit  $^{89}\text{Zr}$ -AMG 211 den späteren Therapieerfolg mit dem bispezifischen Antikörper beeinflusst. Lee und Kollegen stellten nämlich im Kontext des ACT von  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-CAR T-Zellen eine Einschränkung der Proliferationskapazität *in vivo* durch den Tracer fest (Lee et al. 2020), was auch für den bispezifischen Antikörper AMG 211 denkbar ist und deshalb untersucht werden sollte.

Waaijer und Kollegen konnten *in vivo* für einen gegen CD3 und Glypican 3 gerichteten bispezifischen Antikörper nachweisen, dass dessen Verteilung im Tumor mit dem CD3<sup>+</sup> Infiltrat korreliert (Waaijer et al. 2020). Anhand eines gegen CD3 und das unspezifische Antigen „keyhole limpet hemocyanin“ gerichteten Antikörpers, für den im Gegensatz zu den lymphatischen Organen im Tumor keine vermehrte Anreicherung detektiert wurde, konnten sie allerdings auch zeigen, dass die Aufnahme des therapeutischen bispezifischen Antikörpers in den Tumor wesentlich von Glypican 3 und nicht von CD3 abhängt (Waaijer et al. 2020).

Auch in dieser Arbeit wurde CD3 als mögliche Zielstruktur für eine T-Zell-Bildgebung bei Immuntherapien in die ersten Experimente eingeschlossen. Die Expression von CD3 war der von CD2 und CD7 auf unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen vergleichbar (Abb. S2 und Tabelle S1-2 in Mayer et al. 2018) und unterschied sich bezüglich anderer PBMC-Subpopulationen lediglich hinsichtlich der fehlenden Expression auf NK-Zellen (Abb. S3 in Mayer et al. 2018). Auf spezifisch aktivierten T-Zellen zeigte die Expressionsanalyse von CD3 eine Abnahme im Vergleich zu nicht aktivierten T-Zellen *in vitro* (Abb. 1B in Mayer et al. 2018), was als Hinweis auf eine untergeordnete Relevanz von CD3 bei der Identifizierung tumorreaktiver T-Zellen interpretiert werden kann.

Bei der Beurteilung der Eignung von gegen CD3 gerichteten immuno-Tracern ist neben einer starken Expression auf den Zielzellen die funktionelle Beeinflussung der Therapie von entscheidender Bedeutung. Gegen CD3 gerichtete Antikörper, F(ab')<sub>2</sub> und Fab' Fragmente wurden bereits in anderen Zusammenhängen als die T-Zell-Funktion einschränkend (Chang und Gingras 1981, Kohm et al. 2005, Malcolm et al. 2012, Sarangi et al. 2008, Van Wauwe et al. 1980), ein Fab' Fragment allerdings auch als stimulatorisch beschrieben (Juraska et al. 2018). Beckford Vera und Kollegen untersuchten für eine Dosis von 25 µg anti-CD3 Antikörper, wie sie im Rahmen von Bildgebungsexperimenten im Mausmodell üblich ist, die Auswirkungen auf den Lymphozytenpool in der Milz (Beckford Vera et al. 2018). Auch wenn dabei kein Einfluss auf die Gesamtzahl an Lymphozyten beobachtet wurde, kam es zu einer relativen und absoluten Abnahme der CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz (Beckford Vera et al. 2018). Außerdem konnte eine Veränderung der Zusammensetzung der T-Zell-Subpopulationen festgestellt werden, wobei sich v. a. bei den CD8<sup>+</sup> Zellen der Anteil naiver T-Zellen zugunsten der Gedächtnis-Zell-Populationen verschob (Beckford Vera et al. 2018). Basierend auf derartigen Veränderungen der physiologischen T-Zell-Fractionen erscheint auch für niedrige Konzentrationen von gegen CD3 gerichtetem Antikörper eine Beeinflussung der T-Zell-Funktion möglich.

In dieser Arbeit wurden verschiedene anti-CD3 Antikörper (Klone BC3, VIT3b und OKT3) unterschiedlicher Isotyp-Subklassen hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Funktion *in vitro* untersucht. Bei Koinkubation mit nicht spezifisch stimulierten T-Zellen erwiesen sich alle Antikörper als konzentrationsunabhängig Apoptose-induzierend und die T-Zell-Funktion modulierend (Abb. S3A-B in Mayer et al. 2018). Da auch für gegen CD3 gerichtete F(ab')<sub>2</sub> und Fab' Fragmente eine Einschränkung der T-Zell-Funktion vorbeschrieben ist (Kohm et al. 2005, Malcolm et al. 2012, Sarangi et al. 2008), erscheint ein ausschließlich Fc-Rezeptor vermittelter Effekt der anti-CD3 Antikörper unwahrscheinlich. In Zusammenschau von Literatur, der beobachteten Funktionseinschränkung *in vitro* und der geringeren Expression auf spezifisch aktivierten T-Zellen wurde diese Zielstruktur daher als sehr problematisch für die Entwicklung eines inerten T-Zell-Tracers eingestuft und auch auf eine weitere Testung von anti-CD3 F(ab')<sub>2</sub> oder Fab' Fragmenten verzichtet.

OKT3 (anti-CD3)-IgG hingegen wurde, da er sowohl Apoptose-induzierende als auch die Proliferation von T-Zellen stimulierende Eigenschaften besitzt (Bonneyfoy-Berard und Revillard 1996, Chang et al.

1982, Hooks et al. 1991, Knop et al. 2005, Van Wauwe et al. 1980), weiter als Positivkontrolle für die entsprechenden Experimente zur T-Zell-Funktionalität *in vitro* verwendet.

## 2.2 CD2 und CD7

Stattdessen lag der Fokus auf den Zielstrukturen CD2 und CD7. Die Hauptfunktion von CD2 besteht in seiner Beteiligung an der Adhäsion und Signalübertragung von T-Zellen (Bierer und Hahn 1993, Hahn et al. 1993, Hunig et al. 1987), was für CD7 direkt nicht nachgewiesen werden konnte (Stillwell und Bierer 2001). Für beide Marker wurde in dieser Arbeit eine verstärkte Oberflächenexpression auf spezifisch aktivierten T-Zellen *in vitro* beobachtet (Abb. 1B in Mayer et al. 2018). Für CD2 steht dies in Einklang mit der bereits beschriebenen Erkenntnis, dass es in unterschiedlichsten Tumorentitäten im Vergleich zu Referenzgeweben zu einer gesteigerten Expression von CD2 auf NK- und zytotoxischen T-Zellen kommt, sodass CD2 als Maß für die zytolytische Aktivität in Tumoren herangezogen werden kann (Rooney et al. 2015).

Neben ihrem Nachweis auf frisch isolierten T-Zell-Subpopulationen aus dem Blut gesunder Spender fanden sich die beiden Zielstrukturen auch auf TIL im murinen Tiermodell (Mayer et al. 2018). So konnte eine CD3 vergleichbare Anwesenheit von CD2 und CD7 in *ex vivo* Tumorproben durch immunhistochemische Analyse (durchgeführt von Katja Steiger und Anja Stelzl) nachgewiesen werden (Abb. 6A in Mayer et al. 2018). Die durchflusszytometrische Analyse von TIL in ML2-B7 Tumoren zeigte  $97,5 \pm 0,9\%$  CD2<sup>+</sup> und  $74,7 \pm 3,7\%$  CD7<sup>+</sup> Zellen (Abb. 18). Anhand dieser *ex vivo*-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Zielstrukturen qualifiziert sind, im immuntherapeutischen Kontext, hier gezeigt an einem Modell des adoptiven T-Zell-Transfers, T-Zellen zu identifizieren.

Für beide Zielstrukturen wurden je zwei Antikörper verschiedener Klone ausgewählt und deren funktionelle Effekte auf nicht spezifisch stimulierte von PBMC abgeleitete T-Zellen *in vitro* untersucht. Der Anteil apoptotischer T-Zellen war unter Koinkubation mit gegen CD2 (Klone OKT11 und UMCD2) und CD7 (Klone T3-3A1 und 4H9) gerichteten Antikörpern dem der Isotypkontrolle vergleichbar (Abb. S4A in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 10). Außerdem war die detektierte Konzentration an IFN $\gamma$  im entsprechenden Überstand ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle nicht gesteigert (Abb. S4B in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 10). Da sich für keinen der untersuchten Antikörper eine funktionelle Einschränkung der T-Zell-Funktion *in vitro* feststellen ließ und sich auch keine Unterschiede zwischen den gegen die gleichen Zielstrukturen gerichteten Antikörpern ergaben, wurde in der Folge je ein repräsentativer Antikörper für die weiteren Testungen ausgewählt. Hierbei fiel die Wahl auf OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG, für welche sich Hybridomzellen kommerziell erwerben ließen, sodass in großem Umfang Antikörper isoliert werden konnten.

### 3. Anforderungen an potentielle immuno-PET-Tracer

Neben der Identifikation einer geeigneten Zielstruktur, welche einerseits als Prädiktor für das Therapieansprechen dienen und andererseits Therapieansprechen zuverlässig detektieren soll, ergeben sich im Rahmen der immuno-PET einige Anforderungen an den potentiellen Antikörper bzw. sein Konstrukt (s. Abb. 2). Zu diesen zählen zunächst die Spezifität und hohe Affinität eines ausgewählten Antikörpers für die identifizierte Zielstruktur (Wu 2009). Des Weiteren muss insb. im Kontext von Immuntherapien bei Visualisierung von Therapieakteuren sichergestellt werden, dass es unter Applikation des Tracers nicht zu einer Beeinflussung der T-Zell-Funktionalität kommt (Mayer et al. 2018), wodurch das Therapieansprechen beeinflusst werden kann.

#### 3.1 Bindung, Affinität und Spezifität der untersuchten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente

Die Bindung der getesteten, gegen CD2 und CD7 gerichteten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente an von PBMC abgeleitete T-Zellen wurde durchflusszytometrisch *in vitro* gezeigt (Abb. 2 in Mayer et al. 2018 und Abb. 9). Sowohl für OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7) Vollantikörper als auch deren F(ab')<sub>2</sub> Fragmente konnte eine hohe und vergleichbare Affinität zu den Zielzellen nachgewiesen werden (Abb. 2 in Mayer et al. 2018).

Auf einen Nachweis der Spezifität der eingesetzten Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente für ihre jeweiligen Zielstrukturen wurde verzichtet, da über diese in der Literatur bereits berichtet wurde. So ist bekannt, dass OKT11 (anti-CD2)-IgG (Verbi et al. 1982) und UMCD2 (anti-CD2)-IgG an das Epitop T11.1 von CD2 binden (Kozarsky et al. 1993). Baumgarten und Kollegen beschrieben bereits die Eignung von T3-3A1 (anti-CD7)-IgG als pan-T-Zell-Marker (Baumgarten et al. 1987) und 4H9 (anti-CD7)-IgG wurde als universeller Marker im Kontext von kindlichen akuten lymphatischen Leukämien (ALL) und Non-Hodgkin-Lymphomen vorgeschlagen (Link et al. 1983).

#### 3.2 Funktionalität der Zielzellen

Des Weiteren spielen Effekte bei der Interaktion zwischen Tracer und T-Zellen als Zielzellen im immuntherapeutischen Kontext eine entscheidende Rolle, da insb. antikörperbasierte Tracer möglicherweise die therapeutische Effektorfunktion von T-Zellen untergraben (Cobbold et al. 1984, Loubaki et al. 2013). Im Gegensatz zu tumorspezifischen Tracern oder der Anwendung von Antikörpern zur Therapie von Autoimmunerkrankungen muss ein Tracer in diesem Anwendungsbereich funktionell inert sein. Diese besondere Relevanz wurde u. a. im Rahmen des ACT von <sup>89</sup>Zr-DFO gelabelten humanen CAR T-Zellen deutlich, deren Proliferationskapazität *in vivo* durch den Tracer eingeschränkt wurde (Lee et al. 2020).

Für die Funktionalität von T-Zellen im Rahmen des immuno-PET sind neben dem Radiotracer und dem Chelator (Griessinger et al. 2015) auch Effekte durch den Antikörper bzw. ein entsprechendes Konstrukt

denkbar (Mall et al. 2016, Freise et al. 2016). Dabei können einer Funktionseinschränkung der Zielzellen in Folge der Bindung von Antikörpern bzw. deren Konstrukte unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen. Gemäß ihrer physiologischen Funktion können Antikörper Antigene direkt neutralisieren bzw. unter Rekrutierung weiterer Komponenten des Immunsystems wirken (Forthal 2014). So ist neben der Blockierung von Oberflächenrezeptoren eine direkten Schädigung von Zielzellen, wie sie für in der Tumorthherapie eingesetzte Antikörper angenommen wird (Weiner 2007), auch für immuno-Tracer denkbar. Bei der Verwendung von Vollantikörpern können zudem Fc-vermittelte Effekte, die u. a. zu ADCC oder Antikörper-vermittelter Komplementaktivierung führen können (Wang et al. 2018), die Funktion der Zielzellen beeinflussen. Die Fc-Rezeptoren ermöglichen wie auch F(ab')<sub>2</sub> Fragmente ein Cross-linking zwischen Zellen, was funktionelle Effekte auf die Zielzellen haben kann, die durch Verwendung von Fab' Fragmenten vermieden werden könnten.

Mall und Kollegen konnten bei Koinkubation eines gegen TCR $\mu$  gerichteten Antikörpers (aTCR $\mu$ -IgG) mit TCR2.5D6 T<sub>CM</sub> *in vitro* bereits nach 12 Stunden eine dosisabhängige Zunahme apoptotischer Zellen und entsprechend gesteigerte IFN $\gamma$  Konzentrationen detektieren, auch wenn derartige Effekte nicht für das entsprechende F(ab')<sub>2</sub> Fragment beobachtet wurden (Mall et al. 2016). In ähnlicher Weise zeigte sich auch *in vivo* sechs Tage nach Injektion von aTCR $\mu$ -IgG eine Abnahme des Anteils iRFP<sup>+</sup> Zellen an allen viablen T-Zellen in allen untersuchten Organen, was wiederum beim F(ab')<sub>2</sub> Fragment und den entsprechenden Isotypkontrollen nicht der Fall war (Mall et al. 2016). Freise und Kollegen stellten für einen gegen murines CD4 gerichteten cys-Diabody eine dosisabhängige Reduktion der T-Zell-Proliferation und IFN $\gamma$ -Produktion fest (Freise et al. 2017) und unter einem gegen murines CD3 gerichteten Antikörper kam es *in vivo* zu einer Abnahme der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten-Fraktion (Beckford Vera et al. 2018). Des Weiteren wurden bei den beiden zuvor erwähnten Konstrukten Veränderungen bezüglich der Expression verschiedener Oberflächenmarker auf T-Zellen *in vivo* beobachtet (Beckford Vera et al. 2018, Freise et al. 2017), was ebenfalls als Hinweis auf eine Modulation der T-Zell-Funktion interpretiert werden kann. Aus diesem Grund gilt es potentielle T-Zell-Tracer eingehend hinsichtlich ihrer funktionellen Effekte zu prüfen und so u. a. deren Potential, Apoptose oder Proliferation von T-Zellen zu induzieren und Einfluss auf deren Aktivierungsgrad oder Zytotoxizität zu nehmen, zunächst durch eine genaue *in vitro* und *in vivo*-Charakterisierung der Tracer abzuschätzen (Mayer et al. 2018).

### 3.3 Verwendung von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten

Für die *in vivo*-Experimente wurden F(ab')<sub>2</sub> Fragmente verwendet. Für dieses Vorgehen spricht, dass einerseits keine Fc-vermittelte Effekte (Wang et al. 2018) auftreten können und andererseits das experimentelle Design durch eine im Vergleich zu den Vollantikörpern vorteilhafte Kinetik vereinfacht wird (Dearling et al. 2016, Goldenberg et al. 2002, Hoeben et al. 2010, Wu 2009).

Da aTCR $\mu$ -IgG im Gegensatz zum F(ab')<sub>2</sub> Fragment *in vitro* und *in vivo* negativen Einfluss auf den Anteil von viablen TCR2.5D6 T<sub>CM</sub> nahm (Mall et al. 2016), kann hierbei von Fc-vermittelten Effekten

ausgegangen werden. Um derartige Effekte für die hier untersuchten Antikörper *in vivo* auszuschließen und da die *in vitro*-Experimenten keine Unterschiede zwischen Antikörpern und F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten zeigten (Abb. 3 und 4 in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 12-15), wurden *in vivo* ausschließlich F(ab')<sub>2</sub> Fragmente getestet.

An pharmakokinetischen Vorteilen der F(ab')<sub>2</sub> Fragmente ist zudem eine verbesserte Gewebedurchlässigkeit zu erwähnen und dass F(ab')<sub>2</sub> Fragmente bei gleicher Affinität zu den Zielstrukturen im Zeitverlauf geringere Konzentrationen im Blut aufweisen (Dearling et al. 2016, Wu 2009), was v. a. auch daran liegt, dass sie keinen Fc-Teil aufweisen (Wang et al. 2018, Wu 2009). Damit gehen aufgrund eines geringeren Hintergrundsignals Vorteile bezüglich der Detektion der Zielstrukturen im Vergleich zum Vollantikörper einher und bei gleichzeitig geringerer Verweildauer der Substanzen im Körper bedeutet dies auch eine geringere radioaktive Belastung (Wu 2009).

#### 4. Funktionelle Charakterisierung von OKT11 (anti-CD2)-basierten Tracern

Sowohl die Vollantikörper als auch die hergestellten F(ab')<sub>2</sub> Fragmente von OKT11 (anti-CD2) nahmen *in vitro* keinen Einfluss auf die Funktion nicht-spezifisch aktivierter von PBMC abgeleiteter T-Zellen (Abb. 3 in Mayer et al. 2018). Damit erschienen relevante Fc-Rezeptor vermittelte oder durch Cross-linking bedingte Effekte unwahrscheinlich. Bezüglich der T-Zell-Zytotoxizität *in vitro* zeigte sich, dass diese sowohl durch den Vollantikörper als auch durch das F(ab')<sub>2</sub> Fragment nach 24 Stunden, wenn auch nur marginal, beeinflusst wird und mit leicht erhöhten IFN $\gamma$ -Leveln einhergeht (Abb. 4 in Mayer et al. 2018 und Abb. 15). Bei einer leicht reduzierten Konzentration an iRFP<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollkonditionen (Abb. 16) kann von einem Verlust spezifisch aktivierter T-Zellen unter Anwesenheit von OKT11 (anti-CD2)-IgG bzw. F(ab')<sub>2</sub> ausgegangen werden, da ohne eine Koinkubation von T-Zellen mit Tumorzellen keine T-Zell-depletiven Effekte nachgewiesen wurden (Abb. 3 in Mayer et al. 2018). Im Gegensatz zu den marginalen Effekten *in vitro* ergab die *in vivo*-Funktionalitätstestung hingegen, dass OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente in der Lage sind, gegen Tumorzellen gerichtete Immunantworten spezifisch aktivierter T-Zellen zu unterbinden, und somit zum Versagen einer antitumoralen Zelltherapie führen können (Abb. 7A in Mayer et al. 2018 sowie Abb. 17 und 21). So waren die im Blut der mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Tiere gemessenen IFN $\gamma$ -Konzentrationen 48 Stunden nach Applikation der Proteine niedriger als die der Vergleichstiere (Abb. 20). Außerdem ließ sich in der durchflusszytometrischen Analyse der ML2-B7 Tumoren am elften Tag nach T-Zell-Injektion bzw. am achten Tag nach F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Gabe nur noch eine deutlich reduzierte T-Zell-Zahl für die mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Mäuse nachweisen (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). In der Milz und im Blut wurde ebenfalls eine T-Zell-Depletion, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, beobachtet, während das Knochenmark hiervon nicht betroffen war (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). Auch im Rahmen der Bildgebungsexperimente wurden bereits zwei Tage nach Injektion der <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub>

Fragmente weniger T-Zellen in den Tumoren und in der Milz im Vergleich zu den mit  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Tieren detektiert (Abb. 5D in Mayer et al. 2018).

Allerdings konnte die Biodistributionsanalyse Radioaktivität sowohl im ML2-B7 Tumor auch in der Milz der Versuchstiere nachweisen (Abb. 5B-C in Mayer et al. 2018). Neben einer unspezifischen Bindung des F(ab')<sub>2</sub> Fragments an murine Zellen der Milz ist aufgrund der Spezifität des Tracers am ehesten von einer Bindung des Tracers an T-Zellen auszugehen, welche zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse bereits apoptotisch waren und deswegen nicht mehr detektiert werden konnten. In Zusammenschau mit den Ergebnissen zur *in vivo*-Funktionalitätstestung erscheint es plausibel, dass erst die Bindung des Tracers deren Apoptose induziert hat, da bei den mit T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Tiere weiterhin lebende T-Zellen in der Milz nachweisbar waren (Abb. 5D in Mayer et al. 2018).

Auch die reduzierten IFN $\gamma$ -Level wiesen auf einen geringeren Anteil an T-Zellen im Blut der Tiere, welche OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente erhalten hatten, hin (Abb. 20). Interessant ist dabei, dass die geringeren IFN $\gamma$ -Konzentrationen als erster Hinweis auf eine eingeschränkte T-Zell-Funktion bei verringerter T-Zell-Zahl bereits nach 48 Stunden zum Zeitpunkt der Bildakquisition zu detektieren waren. Und auch in den Tumorproben konnte bereits zu diesem frühen Zeitpunkt die eingeschränkte T-Zell-Funktion indirekt anhand der höheren Zahl an vitalen Tumorzellen als in der T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment-injizierten Vergleichsgruppe nachgewiesen werden (Abb. 6B in Mayer et al. 2018), auch wenn in den Tumoren noch T-Zellen detektiert werden konnten (Abb. 5D und 6A in Mayer et al. 2018). Es scheint also nicht auszureichen, ausschließlich das Tumorstadium zu beobachten, da auf diese Weise die T-Zell-Funktion beeinflussende Effekte erst zu einem späteren Zeitpunkt offensichtlich werden können. Andererseits unterstreicht dies die Notwendigkeit für eine längerfristige Beobachtung des Tumorstadiums unter Applikation von Testtracern. Während es unter Applikation von T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragment bzw. Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment zur erwarteten Reduktion des Tumorstadiums kam, zeigten die mit OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Tiere nach kurzer Stagnation ein kontinuierliches Tumorstadium (Abb. 7A in Mayer et al. 2018 und Abb. 17).

Wenn den Tieren die T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt nach Tumorzell-Gabe injiziert wurden, ließen sich für die Tiere, welche OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente erhalten hatten, sogar Tumorzellen in Milz und Lunge als Hinweis auf eine metastatische Aussaat des Primärtumors detektieren (Abb. 22). Dies war wiederum für die beiden anderen Gruppen nicht der Fall, sodass auch hier aufgrund des fortgeschritteneren Tumorstadiums unter OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten von einer eingeschränkten T-Zell-Funktion ausgegangen werden kann. Als Ursache für das Tumorstadium unter OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten konnte eine verringerte Anzahl an TCR2.5D6 transduzierten T-Zellen in unterschiedlichsten Organen ausgemacht werden (Abb. 21). Am stärksten fiel die Reduktion dabei im ML2-B7 Tumor und der Milz aus (Abb. 21), wie bereits im anderen Funktionalitätsexperiment beobachtet (Abb. 7C-D in Mayer et al. 2018). Dass sich dieses Phänomen insb. im ML2-B7 Tumor, der von den infundierten TCR2.5D6 transduzierten T-Zellen erkannt wird und

zu deren spezifischer Aktivierung führt (Klar et al. 2014, Mall et al. 2016), abspielt, ist mit einer aktivierungsabhängigen T-Zell-Depletion vereinbar. Diese stünde mit der Erkenntnis in Einklang, dass auch *in vitro* nur für spezifisch aktivierte T-Zellen, nicht jedoch für nicht stimulierte von PBMC abgeleitete T-Zellen eine leichte Einschränkung der T-Zell-Funktion beobachtet wurde (Abb. 3 und 4 in Mayer et al. 2018).

In Zusammenschau der Ergebnisse ist der beobachtete depletive Effekt von OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten damit a. e. durch direkte apoptotische Effekte auf spezifisch Antigen-abhängig aktivierte T-Zellen zu erklären (Gückel et al. 1991). Davon ausgehend scheint dieser vom verwendeten Konstrukt unabhängig zu sein. In der Literatur wurde eine funktionelle Modulation von T-Zellen durch gegen CD2 gerichtete Antikörper bereits *in vitro* und *in vivo* beschrieben, wobei z. T. über gegensätzliche Effekte berichtet wurde (Gückel et al. 1991, Hunig et al. 1987, Kozarsky et al. 1993, Miller et al. 1993, Van Wauwe et al. 1981, Xu et al. 2004, Yssel et al. 1987). Für OKT11 (anti-CD2)-IgG im Speziellen wurde seine Fähigkeit zur Unterdrückung der T-Zell-Proliferation *in vitro* gezeigt (Van Wauwe et al. 1981, Verbi et al. 1982), während andere Konstrukte auch eine aktivierungsabhängige Apoptoseinduktion *in vivo* bedingten (Gückel et al. 1991, Xu et al. 2004). Dabei differiert die Auffassung hinsichtlich der Beteiligung von Fc-Rezeptoren im Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen (Gückel et al. 1991, Xu et al. 2004). Während für BTI-322 T-Zell-Depletion nur mit dem Vollantikörper erzielt wurde (Xu et al. 2004), beschrieben Gückel und Kollegen eine Einschränkung der T-Zell-Funktion auch für F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Gückel et al. 1991). Auch in dieser Arbeit wurden T-Zell-depletive Effekte unter OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten beobachtet, sodass eine primäre Rolle von Fc-Rezeptoren im Rahmen der Apoptoseinduktion unwahrscheinlich erscheint.

Des Weiteren räumen Gückel und Kollegen dem Zeitpunkt der Applikation von 12.15A (anti-CD2)-Antikörper Gewicht ein, welcher nur beim Verabreichen vor oder mit dem Antigenpriming entsprechende Effekte zeigte (Gückel et al. 1991). Hier wurden jedoch zelldepletive Effekte durch OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente beobachtet, obwohl die F(ab')<sub>2</sub> Fragmente erst drei Tage nach Injektion der T-Zellen verabreicht wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die immunologischen Prozesse der Therapie so komplex sind, dass sie leicht gestört werden können.

Als Fc-Rezeptor-unabhängige zugrundeliegende Mechanismen der Einschränkung von zielgerichteten T-Zell-Antworten *in vivo*, wie sie in dieser Arbeit für OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente beobachtet wurde, können v. a. zwei angenommen werden: wie bereits in der Literatur thematisiert, kann es über Aktivierung der Signalkaskade von CD2 zum aktivierungsinduzierten T-Zelltod kommen oder die Interaktion von CD2 mit dem Konstrukt unterbindet die Zelladhäsion aktivierter T-Zellen (Gückel et al. 1991, Hahn et al. 1993, Howard et al. 1981, Hunig et al. 1987, Moingeon et al. 1989, Van Wauwe et al. 1981, Xu et al. 2004). Allerdings sind sowohl die Rezeptorfunktion von CD2 als auch seine Interaktion mit Antikörpern bzw. anderen Konstrukten noch nicht hinreichend verstanden. Des Weiteren scheinen auch die Antikörperkonzentration sowie der Aktivierungszustand der T-Zellen eine Rolle zu spielen, da auch gegensätzliche Effekte für gegen CD2 gerichtete Antikörper beschrieben wurden (Kozarsky et al.

1993, Yssel et al. 1987), was wiederum die Abschätzung der funktionellen Effekte bspw. im Rahmen verschiedener Immuntherapien erschwert.

Aus diesem Grund ist es wichtig, bei der Entwicklung eines T-Zell-Tracers dessen funktionelle Effekte auf die Zielzellen zu untersuchen. Dabei sollte neben der *in vitro*-Testung v. a. die Anwendung in einem geeigneten *in vivo*-Modell erfolgen. Wie für CD2 hier gezeigt, muss auch für weitere Zielstrukturen wie CD3 und CD8, welche bspw. am T-Zell-Signaling, der Stabilisierung der Interaktion zwischen TCR und MHC oder anderen essentiellen T-Zell-Funktionen beteiligt sind (Chang und Gingras 1981, Clement et al. 2011, Gückel et al. 1991), von einer Beeinflussung der T-Zell-Funktion ausgegangen werden bzw. eine solche im Rahmen der Tracerentwicklung ausgeschlossen werden. Obwohl ein gegen CD8 gerichteter, an sechs Patienten getesteter Minibody keine gravierenden direkten Nebenwirkungen zeigte (Pandit-Taskar et al. 2020), sollte dennoch die längerfristige Wirkung auf den Therapieerfolg weiter evaluiert werden.

## 5. T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub>-Tracer und die Zielstruktur CD7

### 5.1 Funktionalität

Für T3-3A1 (anti-CD7) Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurden keine negativen Effekte in Bezug auf die T-Zell-Funktionalität beobachtet. So nahm die Tracerapplikation *in vitro* keinen Einfluss auf nicht spezifisch stimulierte T-Zellen im Sinne einer Apoptoseinduktion oder Einschränkung der Proliferationskapazität (Abb. 3 in Mayer et al. 2018) und die antitumorale Funktion spezifisch aktivierter T-Zellen blieb sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhalten (Abb. 4 und 7 in Mayer et al. 2018). Acht Tage nach Gabe von T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten und am elften Tag nach T-Zell-Gabe ließen sich keine Unterschiede im Vergleich zu den mit Isotyp-F(ab')<sub>2</sub> Fragment behandelten Tieren bezüglich des detektierten Anteils an TCR2.5D6 transduzierten T-Zellen feststellen (Abb. 7D in Mayer et al. 2018). Auch wenn die T-Zellen bei weiter fortgeschrittener Tumorentwicklung verabreicht wurden, zeigte sich eine ähnliche Tumorstadiumskinetik und -aussaat wie in der Referenzgruppe (Abb. 21). Obwohl bei verzögerter T-Zell-Gabe schließlich weniger T-Zellen detektiert werden konnten, was auf ein eingeschränktes Ansprechen zurückzuführen ist und dieses gleichzeitig bedingt, war dennoch der detektierte Anteil an T-Zellen für die mit T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten behandelten Tiere der Isotypkontrolle vergleichbar (Abb. 21). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das funktionelle Verhalten von T-Zellen durch T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente in zwei unterschiedlichen Phasen von T-Zell-Antworten nicht beeinflusst wird.

Allerdings ist dieses Tumormodell nicht geeignet, noch später auftretende Langzeiteffekte bei vollem Therapieansprechen aufzudecken, da an Tag 11 nach T-Zell-Gabe ein erneuter Anstieg des Tumolvolumens auch in der Kontrollgruppe beobachtet wurde (Abb. 5A in Mayer et al. und Abb. 17), was sich im Sinne einer sekundären Resistenzentwicklung erklären lässt (Klar et al. 2014, Audehm et

al. 2019). Allerdings könnte durch eine erneute Bildgebung in diesem Zeitraum aber auch die Eignung des Tracers zur Detektion einer sich im Therapieverlauf entwickelnden Resistenz getestet werden.

## 5.2 Spezifität des Tracers für tumorreaktive T-Zellen

Nachdem funktionelle Effekte ausgeschlossen werden konnten, erwies sich  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub>-Tracer als geeignet, tumorinfiltrierende TCR2.5D6iRFP T<sub>CM</sub> mittels PET/CT-Bildgebung im Kontext des adoptiven T-Zell-Transfers darzustellen (Abb. 5A und 8A in Mayer et al. 2018).

Korrespondierend hierzu konnte eine Akkumulation von Radioaktivität in den ML2-B7 Tumoren detektiert werden (Abb. 5B-C in Mayer et al. 2018), welche auf einer tumorspezifischen Anreicherung von T-Zellen beruhte, wie die durchflusszytometrische Analyse ergab (Abb. 5D in Mayer et al. 2018). Daneben fand sich auch eine verstärkte Traceranreicherung in der Milz, die ebenfalls mit der Anwesenheit von T-Zellen korreliert werden konnte (Abb. 5B-D in Mayer et al. 2018). Die Präsenz der T-Zellen lässt sich im Sinne eines Homings von T-Zellen in dem lymphatischen Organ erklären (Williams und Butcher 1997) und entspricht früheren Beobachtungen (Mall et al. 2016).

Des Weiteren wurde  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub>-Tracer zur Untersuchung seiner Spezifität für tumorreaktive T-Zellen auch an Tieren getestet, denen T-Zellen ohne spezifischen T-Zell-Rezeptor injiziert worden waren. Im Gegensatz zu den mit TCR2.5D6iRFP T-Zellen behandelten Tieren zeigte sich für die Tiere, welche iRFP T<sub>CM</sub> erhalten hatten, keine Tracerakkumulation in den ML2-B7 Tumoren (Abb. 8A-C in Mayer et al. 2018). Dabei wurde weder mittels PET/CT in der Tumorregion ein Signal detektiert noch konnte eine Traceranreicherung anhand der Biodistributionsanalyse nachgewiesen werden (Abb. 8A-C in Mayer et al. 2018). In der Milz hingegen konnte auch für die mit iRFP T<sub>CM</sub> behandelten Tiere Radioaktivität im Sinne einer Anreicherung des Tracers festgestellt und auf das Vorhandensein von T-Zellen zurückgeführt werden (Abb. 8B-D in Mayer et al. 2018). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente in der Lage sind, tumorspezifische T-Zellen zu erkennen. Gleichzeitig werden aber auch andere T-Zellen, wie sie bspw. in der Milz als lymphatisches Organ vorkommen, dargestellt, was ein entsprechendes Hintergrundsignal bedingen kann. Auch wenn bei Applikation des Tracers nicht nur ausschließlich TIL visualisiert werden, lässt die Kombination mit der CT-Analyse auf deren Lokalisation im Tumor bzw. anderen Geweben schließen, sodass auf diese Weise die Therapierelevanz der dargestellten T-Zellen abgeschätzt werden kann. Dass es auch in anderen lymphatischen Organen zur Anreicherung von T-Zell-Tracern kommen kann, wurde bereits bei der klinischen Anwendung eines  $^{89}\text{Zr}$ -gelabelten anti-CD8 Minibodys nachgewiesen (Pandit-Taskar et al. 2020). Hier stach besonders die Akkumulation in Lymphknoten und dem Knochenmark hervor (Pandit-Taskar et al. 2020).

### 5.3 Perspektiven und Hürden der Zielstruktur CD7

Bezüglich der Zielstruktur CD7 lässt sich für die Detektion von T-Zellen anführen, dass CD7 besonders stark auf frühen Entwicklungsstufen von T-Zellen exprimiert ist (Aandahl et al. 2003). So kann auch erklärt werden, dass CD7 bei der T-Zell-Leukämie und auf T-Zell-Lymphomen besonders stark exprimiert wird und deshalb auch als mögliche Zielstruktur für eine CAR-T-Zell-Therapie in Betracht kommt (Frankel et al. 1997, Gomes-Silva et al. 2017). Gomes-Silva und Kollegen beschrieben bspw. CD7<sup>-</sup> gegen CD7 gerichtete CAR T-Zellen, welche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an einem murinen Xenograftmodell einer T-ALL erfolgreich eingesetzt wurden (Gomes-Silva et al. 2017). Bei CD7<sup>-</sup> CAR T-Zellen könnte CD7 zwar nicht zur Identifikation tumorspezifischer T-Zellen benutzt werden, stattdessen wäre jedoch eine Detektion von Tumorzellen möglich ist, womit sich theranostisches Potential für gegen CD7 gerichtete Tracer bietet. So mögen T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmente bzw. Antikörper im Kontext von T-Zell-Lymphomen und Leukämien bei Verwendung anderer Radionuklide wie 90-Yttrium, 131-Iod oder 177-Lutetium zur Radioimmuntherapie geeignet sein (D'Huyvetter et al. 2014, Rose et al. 2012).

In Bezug auf die anfängliche Forderung an Bildgebungsmethoden im Kontext von Immuntherapien, das Therapieansprechen besser abzuschätzen und ggf. vorhersagen zu können, muss das hier getestete <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub> Fragment sicherlich noch weiter untersucht werden. Auch wenn bspw. bekannt ist, dass die T-Zell-Dichte mit dem Ansprechens bei Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie korreliert (Tumeh et al. 2014, Huang et al. 2017) und es hier mit Hilfe von <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub>-Tracer gelang ein T-Zell-spezifisches Signal zu detektieren (Mayer et al. 2018), gilt es dennoch dieses noch genauer mit möglichen T-Zell-Antworten zu korrelieren (Mall et al. 2016). Auf diese Weise sollte es auch besser gelingen, die Eignung von gegen CD7 gerichteten Tracern als Prädiktoren für das Therapieansprechen und die Identifikation von Ansprechen nach Therapiebeginn einzuordnen.

Außerdem sollte der Tracer im Kontext weiterer immuntherapeutischer Therapiemodalitäten geprüft werden, da bei erfolgreicher Anwendung in einem getesteten immuntherapeutischen Ansatz keineswegs auf die Eignung in einem anderen Kontext geschlossen werden kann. Wie für den prognostischen Marker MAGE-A eine unterschiedliche Relevanz für verschiedene Therapien gezeigt wurde (Shukla et al. 2018), sollten auch Tracer für unterschiedliche Indikationen auf deren spezifische Eignung getestet werden. Für einen gegen CD8 gerichteten cys-Diabody wurde sein Potential zur Detektion suffizienter T-Zell-Antworten bereits im Kontext von ACT, Immuncheckpoint-Blockade und CD137-agonistischer Therapie *in vivo* gezeigt (Tavaré et al. 2016). Es ist deshalb davon auszugehen, dass eine T-Zell-basierte Bildgebung leichter auf andere Therapiekonzepte übertragbar ist als andere mehr therapiespezifische Marker. CD7 erwies sich beim hier getesteten ACT als geeignete Zielstruktur zur Darstellung spezifisch aktivierter T-Zellen. Sein Expressionsverhalten unter Immuncheckpoint-Inhibitoren hingegen wurde nach heutigem Kenntnisstand noch nicht beschrieben. Die Expression von CD7 auf diversen T-Zell-Subpopulationen (Abb. 1A in Mayer et al. 2018) sowie eine gesteigerte Expression auf aktivierten T-Zellen *in vitro* (Abb. 1B in Mayer et al. 2018) sprechen jedoch für CD7 als geeigneten Marker auch für

andere immuntherapeutische Ansätze. Im Rahmen mit Erythrodermie einhergehender entzündlicher Dermatosen wurde außerdem eine hohe Expression von CD7 in Abgrenzung zum Sézary-Syndrom beschrieben, was als Hinweis auf eine verstärkte Expression von CD7 auf aktivierten T-Zellen interpretiert werden kann (Cetinozman et al. 2014). Dennoch gilt es, die Eignung eines gegen CD7 gerichteten Tracers in weiteren immuntherapeutischen Kontexten *in vivo* zu untersuchen, um auf dessen Eignung zur breiten Anwendung schließen zu können.

Durch die besonders starke Expression von CD7 auf T-Zellen früher Entwicklungsstufen (Aandahl et al. 2003) muss bei Anwendung des Tracers im menschlichen Organismus auch von dessen Anreicherung im Knochenmark und in anderen lymphatischen Organen ausgegangen werden. Dies kann die Detektion tumorspezifischer T-Zellen aufgrund des erhöhten Hintergrundsignals erschweren, besonders wenn die zu untersuchenden Tumorerkrankungen nahe am oder im Knochenmark lokalisiert sind. Bensch und Kollegen wiesen für <sup>89</sup>Zr-Atezolizumab in klinischer Anwendung bei drei unterschiedlichen Tumorentitäten neben den Tumoren ein starkes PET-Signal in lymphatischem Gewebe und an Orten mit entzündlicher Aktivität nach (Bensch et al. 2018). Bei der klinischen Anwendung eines <sup>89</sup>Zr-gelabelten gegen CD8 gerichteten Minibodys fiel ebenfalls besonders ein Signal in der Milz, dem Knochenmark sowie zahlreichen normalen Lymphknoten auf (Pandit-Taskar et al. 2020). Dabei wurde die Traceraufnahme in Lymphknoten bereits zwei Stunden nach Injektion beobachtet mit Höchstwerten nach 24-48 Stunden (Pandit-Taskar et al. 2020). Dies legt nahe, dass bei der Verwendung eines T-Zell-Tracers zur Detektion von immuntherapeutischen Therapieantworten mit einer unspezifischen Tracerakkumulation in diversen lymphatischen Organen zu rechnen ist. Da die hier untersuchten Tracer in einem xenogenen Tiermodell ohne endogene T-Zellen getestet wurden, können keine Schlüsse auf die Tracerverteilung bei vorhandenem patienteneigenem Immunsystem gezogen werden. In diesem Sinne ist es von besonderer Relevanz, den vielversprechenden <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub>-Tracer auch in einem Tiermodell mit humanem Immunsystem zu untersuchen.

## 6. Radiotraceroptimierung und klinische Translation

In dieser Arbeit wurde nach optimalen Zielstrukturen für die Bildgebung von T-Zell-Antworten im Kontext von Immuntherapien gesucht und hierfür beispielhaft zwei Antikörper bzw. deren F(ab')<sub>2</sub> Fragmente untersucht. Dabei erwies sich v. a. CD7 als geeignete Zielstruktur. In Hinblick auf die klinische Translation gilt es jedoch die Radiotracer selbst noch weiter zu optimieren. Hierzu zählt bspw. die Verwendung vorteilhafter Konstrukte unter geeigneten Radionukliden. Wie oben bereits erwähnt, ermöglichen kleinere von Antikörpern abgeleitete Konstrukte wie F(ab') Fragmente, scFv, cys-Diabodys oder Minibodys eine Verbesserung hinsichtlich Gewebedurchgängigkeit und Geschwindigkeit der Elimination mit geringerer Hintergrundaktivität im Blut (Goldenberg et al. 2002, Wu 2009). Neben dem Fehlen von Fc-Rezeptoren (Wang et al. 2018, Wu 2009) trägt auch eine zunehmende renale Elimination bei abnehmender Größe der Konstrukte zu deren verringerter

biologischer Halbwertszeit bei (Goldenberg et al. 2002). Während Antikörper und F(ab')<sub>2</sub> Fragmente mit einem Molekulargewicht von 150 bzw. 100 kDa über der Schwelle glomerulär filtrierter Moleküle liegen und deshalb v. a. über die Leber metabolisiert und eliminiert werden, gilt dies nicht für kleinere Antikörper-basierte Konstrukte (Goldenberg et al. 2002).

Dennoch wurde in dieser Arbeit eine sehr starke Anreicherung von <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2) und <sup>89</sup>Zr-T3-3A1 (anti-CD7) F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten in den Nieren beobachtet (Abb. 5A-C in Mayer et al. 2018). Auch für andere <sup>89</sup>Zr-gelabelte F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurde ein derartiges Phänomen beschrieben (Hoeben et al. 2010, Sham et al. 2014, Mall et al. 2016). Dieses kann am ehesten auf eine anhaltende renale Retention von Radioaktivität (Arano 1998) und die Reabsorption von F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten durch Tubuluszellen zurückgeführt werden (Hoeben et al. 2010). Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Identifikation geeigneter Zielstrukturen lag, wurde keine weitere Traceroptimierung vorgenommen. Es ist allerdings beschrieben, dass der Einbau metabolisierbarer Linker die renale Elimination begünstigen kann (Arano 1998). Daneben können weitere Strategien wie die Applikation von Aminosäuren oder Polypeptiden vor Tracerapplikation zur Reduktion der renalen Hintergrundaktivität angewandt werden (Behr et al. 1998, van Eerd et al. 2006), was auch bei der Verwendung kleinerer, vorwiegend renal ausgeschiedener Konstrukte eine Rolle spielen mag. Die Stärke der Hintergrundaktivität in für die Exkretion zuständigen Organen ist außerdem von der Menge an zugeführtem Antikörperkonstrukt abhängig. Für den <sup>89</sup>Zr-Df-IAB22M2C anti-CD8 Minibody wurde über die Anwendung am Menschen berichtet, dass größere Minibody-Mengen zu einem verstärkten Uptake in der Leber führten, worüber Minibodys präferenziell ausgeschieden werden (Pandit-Taskar et al. 2019). Als Ursache hierfür ist eine Absättigung verfügbarer Zielstrukturen ab einer bestimmten Konzentration denkbar und erfordert die Durchführung von Dosisstudien, um die entsprechende individuelle sowie tumor- und therapiespezifische Konzentration zu bestimmen.

Zum Labeling der F(ab')<sub>2</sub> Fragmente wurde von den Kollegen der Nuklearmedizinischen Klinik <sup>89</sup>Zr als Radioisotop genutzt. Dabei wurden hochauflösende Bilder der spezifischen Tracerakkumulation in mit T-Zellen durchsetzten ML2-B7 Tumoren *in vivo* aquiriert (Abb. 5A und 8A in Mayer et al. 2018), wie dies auch für ein <sup>89</sup>Zr-gelabeltes gegen den murinisierten Teil des TCRβ gerichtetes F(ab')<sub>2</sub> Fragment beobachtet wurde (Mall et al. 2016, Yusufi et al. 2017). <sup>89</sup>Zr eignet sich aufgrund ähnlicher pharmakokinetischer Eigenschaften besonders zum Labeling von Vollantikörpern (Wu und Olafsen 2008). So sind die Bluthalbwertszeiten von <sup>89</sup>Zr mit 78.4 h (Wu und Olafsen 2008) und von Antikörpern mit 2-3 Tagen (Goldenberg et al. 2002) vergleichbar. Für das Labeling kleinerer Konstrukte wie Fab' Fragmente, F(ab) Fragmente, Diabodys oder Nanobodys hingegen eignen sich besser Isotope mit einer kürzeren Halbwertszeit wie <sup>18</sup>F oder <sup>64</sup>Cu (Seo et al. 2018, Zettlitz et al. 2019). Allerdings wurden auch mit <sup>89</sup>Zr gelabelte F(ab')<sub>2</sub> Fragmente (Sham et al. 2014) oder cys-Diabodys (Tavaré et al. 2016, Freise et al. 2017) erfolgreich unter Erzeugung aussagekräftiger Bilder eingesetzt, obwohl diese Antikörperkonstrukte eine kürzere Halbwertszeit als <sup>89</sup>Zr aufweisen (F(ab')<sub>2</sub> Fragmente: 1-2 Tage und Diabodys: < 4 Stunden; Goldenberg et al. 2002). Auch wenn durch das Labeling mit <sup>89</sup>Zr keine

radioaktive Dosis eingespart wurde, wie dies bei einem geeigneteren Radionuklid für die  $F(ab')_2$  Fragmente möglich gewesen wäre, konnte anhand der erzeugten hochauflösenden PET/CT-Bilder die Eignung der untersuchten Tracer und deren Zielstrukturen zur Darstellung von im Tumor befindlichen T-Zellen herausgestellt werden. Für die klinische Anwendung ist jedoch sicherlich eine Weiterentwicklung der Konstrukte einerseits und geeigneter Radioisotope andererseits notwendig.

Neben den Eigenschaften des Tracers selbst, welche insb. durch das Antikörperkonstrukt und das verwendete Radioisotop geprägt werden, beeinflussen auch Eigenschaften des untersuchten Tumors den Erfolg von immuno-PET-basierter Bildgebung. Dazu gehören besonders die verfügbare Zahl an Zielstrukturen im Tumor und dessen strukturelle Eigenschaften, welche wiederum die Durchlässigkeit für die Antikörperkonstrukte beeinflussen (Molthoff et al. 1992). Aufgrunddessen sollte ein potentieller Tracer vor der klinischen Translation auch in unterschiedlichen Tumorentitäten *in vivo* getestet werden. Die mangelnde Übertragbarkeit zwischen unterschiedlichen Therapieansätzen wird außerdem dadurch erschwert, dass verschiedene vorgeschlagene Tracer anhand uneinheitlicher Protokolle getestet werden. Da bspw. der Zeitpunkt der Tracerapplikation wesentlich die Bildgebung beeinflusst, ist dies von besonderer Relevanz. Andererseits wird der Zeitpunkt der Bildgebung auch wesentlich durch die angewandte Indikation (Tavaré et al. 2016) und die Eigenschaften des Tracers beeinflusst. Im Kontext einer immunbasierten Therapie mag eine zu frühe, einmalige Anwendung der Tracersubstanz die Feststellung einer erfolgreichen Therapie verpassen, sodass die Bildgebung immer an die Dynamik der jeweiligen Therapie angepasst werden muss. In dieser Arbeit wurden  $^{89}\text{Zr}$ -OKT11 (anti-CD2) und  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7)- $F(ab')_2$  Fragmente am dritten Tag nach T-Zell-Gabe injiziert und am fünften Tag PET-Bilder aquiriert. Im angewandten Modell eines adoptiven T-Zell-Transfers hatte sich dieser Zeitpunkt für eine  $F(ab')_2$  Fragment-basierte Bildgebung als geeignet erwiesen (Mall et al. 2016). Für Immuncheckpoint-basierte Therapien ist je nach Zielantigen aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsweise und Dynamik z. B. von gegen CTLA-4 bzw. PD-1 oder PD-L1 gerichteten Therapien von unterschiedlichen Zeitpunkten auszugehen, an denen erste Hinweise auf ein Ansprechen gewonnen werden können. Nicht zuletzt ist es denkbar, dass ein potentieller Tracer, wenn er bspw. auf einem gegen CD2 gerichteten  $F(ab')_2$  Fragment basiert, selbst je nach Zeitpunkt seiner Injektion unterschiedlich mit einer Therapie interferieren kann (Gückel et al. 1991). Damit ist auch der funktionelle Aspekt wesentlich vom zeitlichen Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren abhängig und entsprechend schwierig vorherzusagen, sodass die Indikationen entsprechend zu prüfen sind.

Da es sich bei Immuntherapien um dynamische Therapien handelt, könnten auch verschiedene Bildgebungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Therapieverlaufs zum besseren Therapieverständnis beitragen (Rashidian et al. 2017, Vedvyas et al. 2016). In dieser Arbeit wurden  $^{89}\text{Zr}$ -OKT11 (anti-CD2) und  $^{89}\text{Zr}$ -T3-3A1 (anti-CD7)  $F(ab')_2$  Fragmente zur Detektion eines primären Therapieansprechens lediglich einmal am dritten Tag nach T-Zell-Transfer infundiert und dabei T-Zellen in den Tumoren visualisiert. Vedvyas und Kollegen hingegen konnten zeigen, dass sich mittels Reporter-gen-basierter Bildgebung von CAR-T-Zellen auch Informationen hinsichtlich der Dynamik der

T-Zell-Verteilung gewinnen lassen (Vedvyas et al. 2016). Auch Rashidian und Kollegen führten in einem *in vivo*-Tumormodell bei Therapie mit anti-CTLA-4-Antikörpern wiederholte immuno-PET-basierte gegen CD8 gerichtete Bildgebungen durch und konnten dabei eine homogene Verteilung der T-Zellen im Tumor mit einem Therapieansprechen korrelieren (Rashidian et al. 2017). Es ist also davon auszugehen, dass die hier untersuchten Tracer als allgemeine T-Zell-Tracer auch an früheren oder späteren Zeitpunkten in der Lage sind, die entsprechende Verteilung der T-Zellen nachzuweisen. Sollten jedoch mehrere PET/CT-Scans an den gleichen Tieren in enger zeitlicher Abfolge vorgenommen werden, müssten kleinere Konstrukte und entsprechend andere Radioisotope mit geringerer Halbwertszeit gewählt werden (Goldenberg et al. 2002).

## Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C. und J. Schuurman (2002). "IgG4 breaking the rules." *Immunology* **105**(1): 9-19.
- Aandahl, E. M., J. K. Sandberg, K. P. Beckerman, K. Tasken, W. J. Moretto und D. F. Nixon (2003). "CD7 is a differentiation marker that identifies multiple CD8 T cell effector subsets." *J Immunol* **170**(5): 2349-2355.
- Alexandrov, L. B., S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjord, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jager, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. Lopez-Otin, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. Tutt, R. Valdes-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, I. B. C. Consortium, I. M.-S. Consortium, I. PedBrain, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J. Campbell und M. R. Stratton (2013). "Signatures of mutational processes in human cancer." *Nature* **500**(7463): 415-421.
- Alspach, E., D. M. Lussier, A. P. Miceli, I. Kizhvatov, M. DuPage, A. M. Luoma, W. Meng, C. F. Lichti, E. Esaulova, A. N. Vomund, D. Runci, J. P. Ward, M. M. Gubin, R. F. V. Medrano, C. D. Arthur, J. M. White, K. C. F. Sheehan, A. Chen, K. W. Wucherpfennig, T. Jacks, E. R. Unanue, M. N. Artyomov und R. D. Schreiber (2019). "MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy." *Nature* **574**(7780): 696-701.
- Anasetti, C., P. J. Martin, R. Storb, F. R. Appelbaum, P. G. Beatty, J. Davis, K. Doney, H. F. Hill, P. Stewart, K. M. Sullivan und et al. (1992). "Treatment of acute graft-versus-host disease with a nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody." *Transplantation* **54**(5): 844-851.
- Andersen, R., M. C. W. Westergaard, J. W. Kjeldsen, A. Müller, N. W. Pedersen, S. R. Hadrup, O. Met, B. Seliger, B. Kromann-Andersen, T. Hasselager, M. Donia und I. M. Svane (2018). "T-cell Responses in the Microenvironment of Primary Renal Cell Carcinoma-Implications for Adoptive Cell Therapy." *Cancer Immunol Res* **6**(2): 222-235.
- Anderson, A. C., N. Joller und V. K. Kuchroo (2016). "Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation." *Immunity* **44**(5): 989-1004.
- Andre, P., C. Denis, C. Soulas, C. Bourbon-Caillet, J. Lopez, T. Arnoux, M. Blery, C. Bonnafous, L. Gauthier, A. Morel, B. Rossi, R. Remark, V. Bresò, E. Bonnet, G. Habif, S. Guia, A. I. Lalanne, C. Hoffmann, O. Lantz, J. Fayette, A. Boyer-Chammard, R. Zerbib, P. Dodion, H. Ghadially, M. Jure-Kunkel, Y. Morel, R. Herbst, E. Narni-Mancinelli, R. B. Cohen und E. Vivier (2018). "Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells." *Cell* **175**(7): 1731-1743 e1713.
- Ansell, S. M., A. M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E. C. Scott, M. Gutierrez, S. J. Schuster, M. M. Millenson, D. Cattray, G. J. Freeman, S. J. Rodig, B. Chapuy, A. H. Ligon, L. Zhu, J. F. Grosso, S. Y. Kim, J. M. Timmerman, M. A. Shipp und P. Armand (2015). "PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma." *N Engl J Med* **372**(4): 311-319.
- Anwar, H., C. Sachpekidis, J. Winkler, A. Kopp-Schneider, U. Haberkorn, J. C. Hassel und A. Dimitrakopoulou-Strauss (2018). "Absolute number of new lesions on (18)F-FDG PET/CT is more

predictive of clinical response than SUV changes in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **45**(3): 376-383.

Arano, Y (1998). "Strategies to reduce renal radioactivity levels of antibody fragments." *Q J Nucl Med* **42**(4): 262-270.

Arce Vargas, F., A. J. S. Furness, K. Litchfield, K. Joshi, R. Rosenthal, E. Ghorani, I. Solomon, M. H. Lesko, N. Ruef, C. Roddie, J. Y. Henry, L. Spain, A. Ben Aissa, A. Georgiou, Y. N. S. Wong, M. Smith, D. Strauss, A. Hayes, D. Nicol, T. O'Brien, L. Martensson, A. Ljungars, I. Teige, B. Frendeus, T. R. Melanoma, T. R. Renal, T. R. L. consortia, M. Pule, T. Marafioti, M. Gore, J. Larkin, S. Turajlic, C. Swanton, K. S. Peggs und S. A. Quezada (2018). "Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies." *Cancer Cell* **33**(4): 649-663 e644.

Audehm, S., M. Glaser, M. Pecoraro, E. Braunlein, S. Mall, R. Klar, M. Effenberger, J. Albers, H. O. Bianchi, J. Peper, N. Yusufi, D. H. Busch, S. Stevanovic, M. Mann, I. Antes und A. M. Krackhardt (2019). "Key Features Relevant to Select Antigens and TCR From the MHC-Mismatched Repertoire to Treat Cancer." *Front Immunol* **10**: 1485.

Auslander, N., G. Zhang, J. S. Lee, D. T. Frederick, B. Miao, T. Moll, T. Tian, Z. Wei, S. Madan, R. J. Sullivan, G. Boland, K. Flaherty, M. Herlyn und E. Ruppin (2018). "Robust prediction of response to immune checkpoint blockade therapy in metastatic melanoma." *Nat Med* **24**(10): 1545-1549.

Ayati, N., R. Sadeghi, Z. Kiamanesh, S. T. Lee, S. R. Zakavi und A. M. Scott (2021). "The value of 18F-FDG PET/CT for predicting or monitoring immunotherapy response in patients with metastatic melanoma: a systematic review and meta-analysis." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **48**: 428-448.

Ayers, M., J. Lunceford, M. Nebozhyn, E. Murphy, A. Loboda, D. R. Kaufman, A. Albright, J. D. Cheng, S. P. Kang, V. Shankaran, S. A. Piha-Paul, J. Yearley, T. Y. Seiwert, A. Ribas und T. K. McClanahan (2017). "IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade." *J Clin Invest* **127**(8): 2930-2940.

Bardhan, K., T. Anagnostou und V. A. Boussiotis (2016). "The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation." *Front Immunol* **7**: 550.

Barroso-Sousa, R. und P. A. Ott (2018). "Transformation of Old Concepts for a New Era of Cancer Immunotherapy: Cytokine Therapy and Cancer Vaccines as Combination Partners of PD1/PD-L1 Inhibitors." *Curr Oncol Rep* **21**(1): 1.

Baumgarten, H., H. Beulshausen, J. Bätzing-Feigenbaum, F. Bieber, R. Zierz und O. Götze (1987). "Determination of the T3-3A1 antigen in PHA-induced human T-cells by standardized cell-ELISA." *J Immunol Methods* **96**(2): 201-209.

Beaver, J. A., M. Hazarika, F. Mulkey, S. Mushti, H. Chen, K. He, R. Sridhara, K. B. Goldberg, M. K. Chuk, D.-C. Chi, J. Chang, A. Barone, S. Balasubramaniam, G. M. Blumenthal, P. Keegan, R. Pazdur und M. R. Theoret (2018). "Patients with melanoma treated with an anti-PD-1 antibody beyond RECIST progression: a US Food and Drug Administration pooled analysis." *Lancet Oncol* **19**(2): 229-239.

Beckford Vera, D. R., C. C. Smith, L. M. Bixby, D. M. Glatt, S. S. Dunn, R. Saito, W. Y. Kim, J. S. Serody, B. G. Vincent und M. C. Parrott (2018). "Immuno-PET imaging of tumor-infiltrating lymphocytes using zirconium-89 radiolabeled anti-CD3 antibody in immune-competent mice bearing syngeneic tumors." *PLoS One* **13**(3): e0193832.

- Behr, T. M., D. M. Goldenberg und W. Becker (1998). "Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations." Eur J Nucl Med **25**(2): 201-212.
- Ben-Avi, R., R. Farhi, A. Ben-Nun, M. Gorodner, E. Greenberg, G. Markel, J. Schachter, O. Itzhaki und M. J. Besser (2018). "Establishment of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes for non-small cell lung cancer patients." Cancer Immunol Immunother **67**(8): 1221-1230.
- Ben-Shmuel, A., G. Biber und M. Barda-Saad (2020). "Unleashing Natural Killer Cells in the Tumor Microenvironment-The Next Generation of Immunotherapy?" Front Immunol **11**: 275.
- Bensch, F., E. L. van der Veen, M. N. Lub-de Hooge, A. Jorritsma-Smit, R. Boellaard, I. C. Kok, S. F. Oosting, C. P. Schroder, T. J. N. Hiltermann, A. J. van der Wekken, H. J. M. Groen, T. C. Kwee, S. G. Elias, J. A. Gietema, S. S. Bohorquez, A. de Crespigny, S. P. Williams, C. Mancao, A. H. Brouwers, B. M. Fine und E. G. E. de Vries (2018). "(89)Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer." Nat Med **24**(12): 1852-1858.
- Berger, C., M. C. Jensen, P. M. Lansdorp, M. Gough, C. Elliott und S. R. Riddell (2008). "Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates." J Clin Invest **118**(1): 294-305.
- Bertrand, A., M. Kostine, T. Barnetche, M. E. Truchetet und T. Schaeffer (2015). "Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis." BMC Med **13**: 211.
- Bierer, B. E., J. Barbosa, S. Herrmann und S. J. Burakoff (1988). "Interaction of CD2 with its ligand, LFA-3, in human T cell proliferation." J Immunol **140**(10): 3358-3363.
- Bierer, B. E. und W. C. Hahn (1993). "T cell adhesion, avidity regulation and signaling: a molecular analysis of CD2." Semin Immunol **5**(4): 249-261.
- Blank, C. U., W. N. Haining, W. Held, P. G. Hogan, A. Kallies, E. Lugli, R. C. Lynn, M. Philip, A. Rao, N. P. Restifo, A. Schietinger, T. N. Schumacher, P. L. Schwartzberg, A. H. Sharpe, D. E. Speiser, E. J. Wherry, B. A. Youngblood und D. Zehn (2019). "Defining 'T cell exhaustion'." Nat Rev Immunol **19**(11): 665-674.
- Bonilla, F. A., C. M. Kokron, P. Swinton und R. S. Geha (1997). "Targeted gene disruption of murine CD7." Int Immunol **9**(12): 1875-1883.
- Bonnefoy-Berard, N. und J. P. Revillard (1996). "Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3." J Heart Lung Transplant **15**(5): 435-442.
- Borcman, E., Y. Kanjanapan, S. Champiat, S. Kato, V. Servois, R. Kurzrock, S. Goel, P. Bedard und C. Le Tourneau (2019). "Novel patterns of response under immunotherapy." Ann Oncol **30**(3): 385-396.
- Borghaei, H., L. Paz-Ares, L. Horn, D. R. Spigel, M. Steins, N. E. Ready, L. Q. Chow, E. E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhaufl, O. Arrieta, M. A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D. E. Gerber, S. N. Gettinger, C. M. Rudin, N. Rizvi, L. Crino, G. R. Blumenschein, Jr., S. J. Antonia, C. Dorange, C. T. Harbison, F. Graf Finckenstein und J. R. Brahmer (2015). "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer." N Engl J Med **373**(17): 1627-1639.
- Borst, J., T. Ahrends, N. Babala, C. J. M. Melief und W. Kastenmüller (2018). "CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy." Nat Rev Immunol **18**(10): 635-647.

Boutros, C., A. Tarhini, E. Routier, O. Lambotte, F. L. Ladurie, F. Carbonnel, H. Izzeddine, A. Marabelle, S. Champiat, A. Berdelou, E. Lanoy, M. Texier, C. Libenciuc, A. M. Eggermont, J. C. Soria, C. Mateus und C. Robert (2016). "Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination." Nat Rev Clin Oncol **13**(8): 473-486.

Brahmer, J. R., C. G. Drake, I. Wollner, J. D. Powderly, J. Picus, W. H. Sharfman, E. Stankevich, A. Pons, T. M. Salay, T. L. McMiller, M. M. Gilson, C. Wang, M. Selby, J. M. Taube, R. Anders, L. Chen, A. J. Korman, D. M. Pardoll, I. Lowy und S. L. Topalian (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." J Clin Oncol **28**(19): 3167-3175.

Brahmer, J. R., S. S. Tykodi, L. Q. Chow, W. J. Hwu, S. L. Topalian, P. Hwu, C. G. Drake, L. H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H. C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T. M. Salay, S. Alaparthi, J. F. Grosso, A. J. Korman, S. M. Parker, S. Agrawal, S. M. Goldberg, D. M. Pardoll, A. Gupta und J. M. Wigginton (2012). "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer." N Engl J Med **366**(26): 2455-2465.

Brown, S. D., R. L. Warren, E. A. Gibb, S. D. Martin, J. J. Spinelli, B. H. Nelson und R. A. Holt (2014). "Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival." Genome Res **24**(5): 743-750.

Brudno, J. N. und J. N. Kochenderfer (2018). "Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma." Nat Rev Clin Oncol **15**(1): 31-46.

Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren und E. O. Long (2006). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." Blood **107**(1): 159-166.

Burova, E., A. Hermann, J. Dai, E. Ullman, G. Halasz, T. Potocky, S. Hong, M. Liu, O. Allbritton, A. Woodruff, J. Pei, A. Rafique, W. Poueymirou, J. Martin, D. MacDonald, W. C. Olson, A. Murphy, E. Ioffe, G. Thurston und M. Mohrs (2019). "Preclinical Development of the Anti-LAG-3 Antibody REGN3767: Characterization and Activity in Combination with the Anti-PD-1 Antibody Cemiplimab in Human PD-1xLAG-3-Knockin Mice." Mol Cancer Ther **18**(11): 2051-2062.

Burugu, S., A. R. Dancsok und T. O. Nielsen (2018). "Emerging targets in cancer immunotherapy." Semin Cancer Biol **52**(Pt 2): 39-52.

Busch, D. H., S. P. Fräßle, D. Sommermeyer, V. R. Buchholz und S. R. Riddell (2016). "Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy." Semin Immunol **28**(1): 28-34.

Cancer Genome Atlas Network (2015). "Genomic Classification of Cutaneous Melanoma." Cell **161**(7): 1681-1696.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." Nature **511**(7511): 543-550.

Cetinozman, F., P. M. Jansen und R. Willemze (2014). "Expression of programmed death-1 in skin biopsies of benign inflammatory vs. lymphomatous erythroderma." Br J Dermatol **171**(3): 499-504.

Champiat, S., L. Derclé, S. Ammari, C. Massard, A. Hollebecque, S. Postel-Vinay, N. Chaput, A. Eggermont, A. Marabelle, J. C. Soria und C. Ferte (2017). "Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1." Clin Cancer Res **23**(8): 1920-1928.

Chang, T. W. und S. P. Gingras (1981). "OKT3 monoclonal antibody inhibits cytotoxic T lymphocyte mediated cell lysis." Int J Immunopharmacol **3**(3): 183-186.

Chang, T. W., D. Testa, P. C. Kung, L. Perry, H. J. Dreskin und G. Goldstein (1982). "Cellular origin and interactions involved in gamma-interferon production induced by OKt3 monoclonal antibody." J Immunol **128**(2): 585-589.

Chatterjee, S., W. G. Lesniak, M. S. Miller, A. Lisok, E. Sikorska, B. Wharram, D. Kumar, M. Gabrielson, M. G. Pomper, S. B. Gabelli und S. Nimmagadda (2017). "Rapid PD-L1 detection in tumors with PET using a highly specific peptide." Biochem Biophys Res Commun **483**(1): 258-263.

Chen, A., F.-Z. Mokrane, L. H. Schwartz, F. Morschhauser, A. Stamatoullas, J.-M. S. de Colella, L. Vercellino, O. Casasnovas, A. Chauchet, A. Delmer, E. Nicolas-Virelizier, H. Ghesquières, M.-P. Moles-Moreau, A. Schmitt, R. Dulery, K. Bouabdallah, C. Borel, M. Touati, B. Deau-Fischer, F. Peyrade, R.-D. Seban, G. manson, P.

Armand, R. Houot und L. Dercle (2020), " Early 18F-FDG PET/CT response predicts survival in relapsed or refractory Hodgkin Lymphoma Treated with Nivolumab." J Nucl Med **61**(5): 649-654.

Chen, D. S. und I. Mellman (2017). "Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point." Nature **541**(7637): 321-330.

Cheson, B. D., S. Ansell, L. Schwartz, L. I. Gordon, R. Advani, H. A. Jacene, A. Hoos, S. F. Barrington und P. Armand (2016). "Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy." Blood **128**(21): 2489-2496.

Chiou, V. L. und M. Burotto (2015). "Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors." J Clin Oncol **33**(31): 3541-3543.

Cho, S. Y., E. J. Lipson, H. J. Im, S. P. Rowe, E. M. Gonzalez, A. Blackford, A. Chirindel, D. M. Pardoll, S. L. Topalian und R. L. Wahl (2017). "Prediction of Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy Using Early-Time-Point (18)F-FDG PET/CT Imaging in Patients with Advanced Melanoma." J Nucl Med **58**(9): 1421-1428.

Church, S. E., S. M. Jensen, P. A. Antony, N. P. Restifo und B. A. Fox (2014). "Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells." Eur J Immunol **44**(1): 69-79.

Clement, M., K. Ladell, J. Ekeruche-Makinde, J. J. Miles, E. S. Edwards, G. Dolton, T. Williams, A. J. Schauenburg, D. K. Cole, S. N. Lauder, A. M. Gallimore, A. J. Godkin, S. R. Burrows, D. A. Price, A. K. Sewell und L. Wooldridge (2011). "Anti-CD8 antibodies can trigger CD8+ T cell effector function in the absence of TCR engagement and improve peptide-MHCI tetramer staining." J Immunol **187**(2): 654-663.

Cobbold, S. P., A. Jayasuriya, A. Nash, T. D. Prospero und H. Waldmann (1984). "Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo." Nature **312**(5994): 548-551.

Crescioli, S., I. Correa, P. Karagiannis, A. M. Davies, B. J. Sutton, F. O. Nestle und S. N. Karagiannis (2016). "IgG4 Characteristics and Functions in Cancer Immunity." Curr Allergy Asthma Rep **16**(1): 7.

Dammes, N. und D. Peer (2020). "Monoclonal antibody-based molecular imaging strategies and theranostic opportunities." Theranostics **10**(2): 938-955.

Daud, A. I., K. Loo, M. L. Pauli, R. Sanchez-Rodriguez, P. M. Sandoval, K. Taravati, K. Tsai, A. Nosrati, L. Nardo, M. D. Alvarado, A. P. Algazi, M. H. Pampaloni, I. V. Lobach, J. Hwang, R. H. Pierce, I. K. Gratz, M. F. Krummel und M. D. Rosenblum (2016a). "Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma." J Clin Invest **126**(9): 3447-3452.

Daud, A. I., J. D. Wolchok, C. Robert, W. J. Hwu, J. S. Weber, A. Ribas, F. S. Hodi, A. M. Joshua, R. Kefford, P. Hersey, R. Joseph, T. C. Gangadhar, R. Dronca, A. Patnaik, H. Zarour, C. Roach, G. Toland, J. K. Lunceford, X. N. Li, K. Emancipator, M. Dolled-Filhart, S. P. Kang, S. Ebbinghaus und

- O. Hamid (2016b). "Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma." *J Clin Oncol* **34**(34): 4102-4109.
- Davids, M. S., H. T. Kim, P. Bachireddy, C. Costello, R. Liguori, A. Savell, A. P. Lukez, D. Avigan, Y. B. Chen, P. McSweeney, N. R. LeBoeuf, M. S. Rooney, M. Bowden, C. W. Zhou, S. R. Granter, J. L. Hornick, S. J. Rodig, M. Hirakawa, M. Severgnini, F. S. Hodi, C. J. Wu, V. T. Ho, C. Cutler, J. Koreth, E. P. Alyea, J. H. Antin, P. Armand, H. Streicher, E. D. Ball, J. Ritz, A. Bashey, R. J. Soiffer, Leukemia und P. Lymphoma Society Blood Cancer Research (2016). "Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation." *N Engl J Med* **375**(2): 143-153.
- Dearling, J. L., A. Daka, N. Veiga, D. Peer und A. B. Packard (2016). "Colitis ImmunoPET: Defining Target Cell Populations and Optimizing Pharmacokinetics." *Inflamm Bowel Dis* **22**(3): 529-538.
- DeNardo D. G. und B. Ruffell (2019). " Macrophages as regulators in tumour immunity and immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **19**(6): 369-382.
- Desrichard, A., A. Snyder und T. A. Chan (2016). "Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy." *Clin Cancer Res* **22**(4): 807-812.
- Dimitrakopoulou-Strauss, A. (2019). "Monitoring of patients with metastatic melanoma treated with immune checkpoint inhibitors using PET-CT." *Cancer Immunol Immunother* **68**(5): 813-822.
- Dobrenkov, K., M. Olszewska, Y. Likar, L. Shenker, G. Gunset, S. Cai, N. Pillarsetty, H. Hricak, M. Sadelain und V. Ponomarev (2008). "Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging." *J Nucl Med* **49**(7): 1162-1170.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White und S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**(5594): 850-854.
- Dumont, C., O. Deas, B. Mollereau, C. Hebib, V. Giovino-Barry, A. Bernard, F. Hirsch, B. Charpentier und A. Senik (1998). "Potent apoptotic signaling and subsequent unresponsiveness induced by a single CD2 mAb (BTI-322) in activated human peripheral T cells." *J Immunol* **160**(8): 3797-3804.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old und R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.
- van Eerd, J. E., E. Vegt, J. F. Wetzels, F. G. Russel, R. Masereeuw, F. H. Corstens, W. J. G. Oyen und O. C. Boerman (2006). "Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of <sup>111</sup>In-octreotide in mice and rats." *J Nucl Med* **47**(3): 528-533.
- Ehlerding, E. B., C. G. England, R. L. Majewski, H. F. Valdovinos, D. Jiang, G. Liu, D. G. McNeel, R. J. Nickles und W. Cai (2017). "ImmunoPET Imaging of CTLA-4 Expression in Mouse Models of Non-small Cell Lung Cancer." *Mol Pharm* **14**(5): 1782-1789.
- Ehlerding, E. B., H. J. Lee, D. Jiang, C. A. Ferreira, C. D. Zahm, P. Huang, J. W. Engle, D. G. McNeel und W. Cai (2019). "Antibody and fragment-based PET imaging of CTLA-4+ T-cells in humanized mouse models." *Am J Cancer Res* **9**(1): 53-63.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe und J. Verweij

(2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." Eur J Cancer **45**(2): 228-247.

Emami-Shahri, N., J. Foster, R. Kashani, P. Gazinska, C. Cook, J. Sosabowski, J. Maher und S. Papa (2018). "Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells." Nat Commun **9**(1): 1081.

England, C. G., E. B. Ehlerding, R. Hernandez, B. T. Rekoske, S. A. Graves, H. Sun, G. Liu, D. G. McNeel, T. E. Barnhart und W. Cai (2017). "Preclinical Pharmacokinetics and Biodistribution Studies of <sup>89</sup>Zr-Labeled Pembrolizumab." J Nucl Med **58**(1): 162-168.

England, C. G., D. Jiang, E. B. Ehlerding, B. T. Rekoske, P. A. Ellison, R. Hernandez, T. E. Barnhart, D. G. McNeel, P. Huang und W. Cai (2018). "(<sup>89</sup>Zr)-labeled nivolumab for imaging of T-cell infiltration in a humanized murine model of lung cancer." Eur J Nucl Med Mol Imaging **45**(1): 110-120.

von Eyben, F. E., G. S. Baumann und R. P. Baum (2018). "PSMA diagnostics and treatments of prostate cancer become mature." Clin Transl Imaging **6**(2): 145-148.

Fecher, L. A., S. S. Agarwala, F. S. Hodi und J. S. Weber (2013). "Ipilimumab and its toxicities: a multidisciplinary approach." Oncologist **18**(6): 733-743.

Ferris, R. L., G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A. D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E. E. Vokes, C. Even, F. Worden, N. F. Saba, L. C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W. J. Geese, J. Kopit, J. W. Shaw und M. L. Gillison (2016). "Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." N Engl J Med **375**(19): 1856-1867.

Forthal, D. N. (2014). "Functions of Antibodies." Microbiol Spectr **2**(4): 1-17.

Frankel, A. E., J. H. Laver, M. C. Willingham, L. J. Burns, J. H. Kersey und D. A. Vallera (1997). "Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin." Leuk Lymphoma **26**(3-4): 287-298.

Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood und T. Honjo (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.

Freise, A. C., K. A. Zettlitz, F. B. Salazar, X. Lu, R. Tavaré und A. M. Wu (2017). "ImmunoPET Imaging of Murine CD4(+) T Cells Using Anti-CD4 Cys-Diabody: Effects of Protein Dose on T Cell Function and Imaging." Mol Imaging Biol **19**(4): 599-609.

Fridman, W. H., L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman und G. Kroemer (2017). "The immune contexture in cancer prognosis and treatment." Nat Rev Clin Oncol **14**(12): 717-734.

Friedman, C. F., T. A. Proverbs-Singh und M. A. Postow (2016). "Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review." JAMA Oncol **2**(10): 1346-1353.

Fountzilias, C., S. Patel und D. Mahalingam (2017). "Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions." Oncotarget **8**(60):102617-102639.

Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman und F. Pages (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-1964.

Gao, J., L. Z. Shi, H. Zhao, J. Chen, L. Xiong, Q. He, T. Chen, J. Roszik, C. Bernatchez, S. E. Woodman, P. L. Chen, P. Hwu, J. P. Allison, A. Futreal, J. A. Wargo und P. Sharma (2016). "Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy." Cell **167**(2): 397-404 e399.

Garcia-Diaz, A., D. S. Shin, B. H. Moreno, J. Saco, H. Escuin-Ordinas, G. A. Rodriguez, J. M. Zaretsky, L. Sun, W. Hugo, X. Wang, G. Parisi, C. P. Saus, D. Y. Torrejon, T. G. Graeber, B. Comin-Anduix, S. Hu-Lieskovan, R. Damoiseaux, R. S. Lo und A. Ribas (2017). "Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression." Cell Rep **19**(6): 1189-1201.

Georgiadis, A., J. N. Durham, L. A. Keefer, B. R. Bartlett, M. Zielonka, D. Murphy, J. R. White, S. Lu, E. L. Verner, F. Ruan, D. Riley, R. A. Anders, E. Gedvilaite, S. Angiuoli, S. Jones, V. E. Velculescu, D. T. Le, L. A. Diaz, Jr. und M. Sausen (2019). "Noninvasive Detection of Microsatellite Instability and High Tumor Mutation Burden in Cancer Patients Treated with PD-1 Blockade." Clin Cancer Res **25**(23): 7024-7034.

Giavridis, T., S. J. C. van der Stegen, J. Eyquem, M. Hamieh, A. Piersigilli und M. Sadelain (2018). "CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade." Nat Med **24**(6): 731-738.

Gibson, H. M., B. N. McKnight, A. Malysa, G. Dyson, W. N. Wiesend, C. E. McCarthy, J. Reyes, W. Z. Wei und N. T. Viola-Villegas (2018). "IFNgamma PET Imaging as a Predictive Tool for Monitoring Response to Tumor Immunotherapy." Cancer Res **78**(19): 5706-5717.

Goldenberg, D. M. (2002). "Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies." J Nucl Med **43**(5): 693-713.

Goltz, D., H. Gevensleben, T. J. Vogt, J. Dietrich, C. Golletz, F. Bootz, G. Kristiansen, J. Landsberg und D. Dietrich (2018). "CTLA4 methylation predicts response to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immunotherapy in melanoma patients." JCI Insight **3**(13).

Gomes-Silva, D., M. Srinivasan, S. Sharma, C. M. Lee, D. L. Wagner, T. H. Davis, R. H. Rouse, G. Bao, M. K. Brenner und M. Mamonkin (2017). "CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies." Blood **130**(3): 285-296.

Gong, J., A. Chehrazi-Raffle, S. Reddi und R. Salgia (2018). "Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations." J Immunother Cancer **6**(1): 8.

Gooden, M. J., G. H. de Bock, N. Leffers, T. Daemen und H. W. Nijman (2011). "The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis." Br J Cancer **105**(1): 93-103.

Goodman, A., S. P. Patel und R. Kurzrock (2017). "PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas." Nat Rev Clin Oncol **14**(4): 203-220.

Gordon, S. R., R. L. Maute, B. W. Dulken, G. Hutter, B. M. George, M. N. McCracken, R. Gupta, J. M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A. M. Ring, A. J. Connolly und I. L. Weissman (2017). "PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity." Nature **545**(7655): 495-499.

Griessinger, C. M., A. Maurer, C. Kesenheimer, R. Kehlbach, G. Reischl, W. Ehrlichmann, D. Bukala, M. Harant, F. Cay, J. Bruck, R. Nordin, U. Kohlhofer, H. G. Rammensee, L. Quintanilla-Martinez, M. Schaller, M. Rocken, B. J. Pichler und M. Kneilling (2015). "<sup>64</sup>Cu antibody-targeting of the T-cell

receptor and subsequent internalization enables in vivo tracking of lymphocytes by PET." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(4): 1161-1166.

Griessinger, C. M., T. Olafsen, A. Mascioni, Z. K. Jiang, C. Zamilpa, F. Jia, M. Torgov, J. M. Romero, F. Marchioni, D. Satpayev, C. Lee, G. Zhang, T. K. Nayak, M. Pincha, M. Amann, P. L. B. Mohan, M. Richard, V. G. Nicolini, J. Sam, C. Claus, C. Ferrara, P. Brünker, M. Bacac, P. Umana, D. Rüttinger, I. A. Wilson, J. Gudas, C. Klein, J. J. L. Tessier (2020). "The PET-Tracer <sup>89</sup>Zr-Df-IAB22M2C Enables Monitoring of Intratumoral CD8 T-cell Infiltrates in Tumor-Bearing Humanized Mice after T-cell Bispecific Antibody Treatment." Cancer Res **80**(13): 2903-2913.

Gros, A., M. R. Parkhurst, E. Tran, A. Pasetto, P. F. Robbins, S. Ilyas, T. D. Prickett, J. J. Gartner, J. S. Crystal, I. M. Roberts, K. Trebska-McGowan, J. R. Wunderlich, J. C. Yang und S. A. Rosenberg (2016). "Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients." Nat Med **22**(4): 433-438.

Grupp, S. A., M. Kalos, D. Barrett, R. Aplenc, D. L. Porter, S. R. Rheingold, D. T. Teachey, A. Chew, B. Hauck, J. F. Wright, M. C. Milone, B. L. Levine und C. H. June (2013). "Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia." N Engl J Med **368**(16): 1509-1518.

Gückel, B., C. Berek, M. Lutz, P. Altevogt, V. Schirmmacher und B. A. Kyewski (1991). "Anti-CD2 antibodies induce T cell unresponsiveness in vivo." J Exp Med **174**(5): 957-967.

Hahn, W. C., S. J. Burakoff und B. E. Bierer (1993). "Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58." J Immunol **150**(7): 2607-2619.

Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Herbst, R. S., J. C. Soria, M. Kowanetz, G. D. Fine, O. Hamid, M. S. Gordon, J. A. Sosman, D. F. McDermott, J. D. Powderly, S. N. Gettinger, H. E. Kohrt, L. Horn, D. P. Lawrence, S. Rost, M. Leabman, Y. Xiao, A. Mokratin, H. Koeppen, P. S. Hegde, I. Mellman, D. S. Chen und F. S. Hodi (2014). "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients." Nature **515**(7528): 563-567.

Heskamp, S., W. Hobo, J. D. Molkenboer-Kuennen, D. Olive, W. J. Oyen, H. Dolstra und O. C. Boerman (2015). "Noninvasive Imaging of Tumor PD-L1 Expression Using Radiolabeled Anti-PD-L1 Antibodies." Cancer Res **75**(14): 2928-2936.

Higashikawa, K., K. Yagi, K. Watanabe, S. Kamino, M. Ueda, M. Hiromura und S. Enomoto (2014). "<sup>64</sup>Cu-DOTA-anti-CTLA-4 mAb enabled PET visualization of CTLA-4 on the T-cell infiltrating tumor tissues." PLoS One **9**(11): e109866.

Hodi, F. S., W. J. Hwu, R. Kefford, J. S. Weber, A. Daud, O. Hamid, A. Patnaik, A. Ribas, C. Robert, T. C. Gangadhar, A. M. Joshua, P. Hersey, R. Dronca, R. Joseph, D. Hille, D. Xue, X. N. Li, S. P. Kang, S. Ebbinghaus, A. Perrone und J. D. Wolchok (2016). "Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab." J Clin Oncol **34**(13): 1510-1517.

Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebba, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos und W. J. Urban (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(8): 711-723.

- Hoeben, B. A., J. H. Kaanders, G. M. Franssen, E. G. Troost, P. F. Rijken, E. Oosterwijk, G. A. van Dongen, W. J. Oyen, O. C. Boerman und J. Bussink (2010). "PET of hypoxia with 89Zr-labeled cG250-F(ab')<sub>2</sub> in head and neck tumors." *J Nucl Med* **51**(7): 1076-1083.
- Hoepner, S., J. M. Loh, C. Riccadonna, M. Derouazi, C. Y. Maroun, P. Y. Dietrich und P. R. Walker (2013). "Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours." *PLoS One* **8**(5): e63933.
- Holter, W., O. Majdic, H. Stockinger und W. Knapp (1985). "Analysis of T cell activation with a non-mitogenic anti CD3 antibody and the phorbol ester TPA." *Clin Exp Immunol* **62**(3): 600-606.
- Hooks, M. A., C. S. Wade und W. J. Millikan (1991). "Muromonab CD-3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation." *Pharmacotherapy* **11**(1): 26-37.
- Howard, F. D., J. A. Ledbetter, J. Wong, C. P. Bieber, E. B. Stinson und L. A. Herzenberg (1981). "A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation." *J Immunol* **126**(6): 2117-2122.
- Huang, A. C., M. A. Postow, R. J. Orłowski, R. Mick, B. Bengsch, S. Manne, W. Xu, S. Harmon, J. R. Giles, B. Wenz, M. Adamow, D. Kuk, K. S. Panageas, C. Carrera, P. Wong, F. Quagliarello, B. Wubbenhorst, K. D'Andrea, K. E. Pauken, R. S. Herati, R. P. Staupe, J. M. Schenkel, S. McGettigan, S. Kothari, S. M. George, R. H. Vonderheide, R. K. Amaravadi, G. C. Karakousis, L. M. Schuchter, X. Xu, K. L. Nathanson, J. D. Wolchok, T. C. Gangadhar und E. J. Wherry (2017). "T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response." *Nature* **545**(7652): 60-65.
- Hude, I., S. Sasse, A. Engert und P. J. Brockelmann (2017). "The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma." *Haematologica* **102**(1): 30-42.
- Hunig, T., G. Tiefenthaler, K. H. Meyer zum Buschenfelde und S. C. Meuer (1987). "Alternative pathway activation of T cells by binding of CD2 to its cell-surface ligand." *Nature* **326**(6110): 298-301.
- Huntington, N. D., J. Cursons und J. Rautela (2020). "The cancer-natural killer cell immunity cycle." *Nat Rev Cancer* **20**: 437-454.
- D'Huyvetter, M., C. Vincke, C. Xavier, A. Aerts, N. Impens, S. Baatout, H. De Raeye, S. Muyldermans, V. Caveliers, N. Devoogdt und T. Lahoutte (2014). "Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody." *Theranostics* **4**(7): 708-720.
- Ingram, J. R., O. S. Blomberg, M. Rashidian, L. Ali, S. Garforth, E. Fedorov, A. A. Fedorov, J. B. Bonanno, C. Le Gall, S. Crowley, C. Espinosa, T. Biary, E. J. Keliher, R. Weissleder, S. C. Almo, S. K. Dougan, H. L. Ploegh und M. Dougan (2018). "Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**(15): 3912-3917.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara und T. Honjo (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." *EMBO J* **11**(11): 3887-3895.
- Ji, R. R., S. D. Chasalow, L. Wang, O. Hamid, H. Schmidt, J. Cogswell, S. Alaparthi, D. Berman, M. Jure-Kunkel, N. O. Siemers, J. R. Jackson und V. Shahabi (2012). "An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab." *Cancer Immunol Immunother* **61**(7): 1019-1031.
- Johnson, B. J., E. O. Costelloe, D. R. Fitzpatrick, J. B. Haanen, T. N. Schumacher, L. E. Brown und A. Kelso (2003). "Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8+ T cells in influenza virus-infected mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2657-2662.

- Joseph, J., M. J. Nathenson, V. A. Trinh, K. Malik, E. Nowell, K. Carter, S. P. Weathers, G. D. Demetri, D. Araujo und A. P. Conley (2019). "Guillain-Barre syndrome observed with adoptive transfer of lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1 reactive T-cell receptor." J Immunother Cancer **7**(1): 296.
- June, C. H., R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi und M. C. Milone (2018). "CAR T cell immunotherapy for human cancer." Science **359**(6382): 1361-1365.
- June, C. H., S. R. Riddell und T. N. Schumacher (2015). "Adoptive cellular therapy: a race to the finish line." Sci Transl Med **7**(280): 280ps287.
- Juraske, C., P. Wipa, A. Morath, J. V. Hidalgo, F. A. Hartl, K. Raute, H. H. Oberg, D. Wesch, P. Fisch, S. Minguet, S. Pongcharoen und W. W. Schamel (2018). "Anti-CD3 Fab Fragments Enhance Tumor Killing by Human gammadelta T Cells Independent of Nck Recruitment to the gammadelta T Cell Antigen Receptor." Front Immunol **9**: 1579.
- Kähler, K. C., J. C. Hassel, L. Heinzerling, C. Loquai, R. Mossner, S. Ugurel, L. Zimmer, R. Gutzmer; "Cutaneous Side Effects" Committee of the Work Group Dermatological Oncology (ADO) (2016). "Management of side effects of immune checkpoint blockade by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in metastatic melanoma." J Dtsch Dermatol Ges **14**(7): 662-681.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, P. F. Schellhammer; IMPACT Study Investigators (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med **363**(5): 411-422.
- Kanwar, B., D. W. Gao, A. B. Hwang, J. P. Grenert, S. P. Williams, B. Franc und J. M. McCune (2008). "In vivo imaging of mucosal CD4+ T cells using single photon emission computed tomography in a murine model of colitis." J Immunol Methods **329**(1-2): 21-30.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old und R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." PNAS **95**(13): 7556-7561.
- Kato, K., B. C. Cho, M. Takahashi, M. Okada, C.-Y. Lin, K. Chin, S. Kadowaki, M.-J. Ahn, Y. Hamamoto, Y. Doki, C.-C. Yen, Y. Kubota, S.-B. Kim, C.-H. Hsu, E. Holtved, I. Xynos, M. Kodani und Y. Kitagawa (2019). "Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial." Lancet Oncol **20**(11): 1506-1517.
- Kaufman, H. L., F. J. Kohlhapp und A. Zloza (2015). "Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs." Nat Rev Drug Discov **14**(9): 642-662.
- Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman und A. H. Sharpe (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **26**: 677-704.
- Keu, K. V., T. H. Witney, S. Yaghoubi, J. Rosenberg, A. Kurien, R. Magnusson, J. Williams, F. Habte, J. R. Wagner, S. Forman, C. Brown, M. Allen-Auerbach, J. Czernin, W. Tang, M. C. Jensen, B. Badie und S. S. Gambhir (2017). "Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma." Sci Transl Med **9**(373).
- Klar, R., S. Schober, M. Rami, S. Mall, J. Merl, S. M. Hauck, M. Ueffing, A. Admon, J. Slotta-Huspenina, M. Schwaiger, S. Stevanovic, R. A. Oostendorp, D. H. Busch, C. Peschel und A. M. Krackhardt (2014). "Therapeutic targeting of naturally presented myeloperoxidase-derived HLA peptide ligands on myeloid leukemia cells by TCR-transgenic T cells." Leukemia **28**(12): 2355-2366.

- Knop, S., H. Hebart, H. Gscheidle, E. Holler, H.-J. Kolb, D. Niederwieser und H. Einsele (2005). "OKT3 muromonab as second-line and subsequent treatment in recipients of stem cell allografts with steroid-resistant acute graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **36**(9): 831-837.
- Kohm, A. P., J. S. Williams, A. L. Bickford, J. S. McMahon, L. Chatenoud, J. F. Bach, J. A. Bluestone und S. D. Miller (2005). "Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **174**(8): 4525-4534.
- Koyama, S., E. A. Akbay, Y. Y. Li, G. S. Herter-Sprie, K. A. Buczkowski, W. G. Richards, L. Gandhi, A. J. Redig, S. J. Rodig, H. Asahina, R. E. Jones, M. M. Kulkarni, M. Kuraguchi, S. Palakurthi, P. E. Fecci, B. E. Johnson, P. A. Janne, J. A. Engelman, S. P. Gangadharan, D. B. Costa, G. J. Freeman, R. Bueno, F. S. Hodi, G. Dranoff, K. K. Wong und P. S. Hammerman (2016). "Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints." Nat Commun **7**: 10501.
- Kozarsky, K. F., C. Tsai, C. M. Bott, G. Allada, L. L. Li und D. A. Fox (1993). "An anti-CD2 monoclonal antibody that both inhibits and stimulates T cell activation recognizes a subregion of CD2 distinct from known ligand-binding sites." Cell Immunol **150**(2): 235-246.
- Kreiter, S., M. Vormehr, N. van de Roemer, M. Diken, M. Lower, J. Diekmann, S. Boegel, B. Schrors, F. Vascotto, J. C. Castle, A. D. Tadmor, S. P. Schoenberger, C. Huber, O. Tureci und U. Sahin (2015). "Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer." Nature **520**(7549): 692-696.
- Krekorian, M., G. O. Fruhwirth, M. Srinivas, C. G. Figdor, S. Heskamp, T. H. Witney und E. Aarntzen (2019). "Imaging of T-cells and their responses during anti-cancer immunotherapy." Theranostics **9**(25): 7924-7947.
- Kristensen, L. K., C. Christensen, M. Z. Alfsen, S. Cold, C. H. Nielsen und A. Kjaer (2020). "Monitoring CD8a(+) T Cell Responses to Radiotherapy and CTLA-4 Blockade Using [(64)Cu]NOTA-CD8a PET Imaging." Mol Imaging Biol **22**(4): 1021-1030.
- Kruger, S., M. Imer, S. Kobold, B. L. Cadilha, S. Endres, S. Ormanns, G. Schuebbe, B. W. Renz, J. G. D'Haese, H. Schloesser, V. Heinemann, M. Subklewe, S. Boeck, J. Werner und M. von Bergwelt-Baildon (2019). "Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 268.
- Krummel, M. F. und J. P. Allison (1995). "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." J Exp Med **182**(2): 459-465.
- Kuhn, C. und H. L. Weiner (2016). "Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside." Immunotherapy **8**(8): 889-906.
- Kuhns, M. S. und H. B. Badgandi (2012). "Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes." Immunol Rev **250**(1): 120-143.
- Kuhns M. S., M. M. Davis und K. C. Garcia (2006). "Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex." Immunity **24**(2): 133-139.
- Laing, R. E., E. Nair-Gill, O. N. Witte und C. G. Radu (2010). "Visualizing cancer and immune cell function with metabolic positron emission tomography." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 100-105.
- Lanier, L. L., C. Chang, H. Spits und J. H. Phillips (1992). "Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes

in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes." *J Immunol* **149**(6): 1876-1880.

Larimer, B. M., E. Wehrenberg-Klee, A. Caraballo und U. Mahmood (2016). "Quantitative CD3 PET Imaging Predicts Tumor Growth Response to Anti-CTLA-4 Therapy." *J Nucl Med* **57**(10): 1607-1611.

Larimer, B. M., E. Wehrenberg-Klee, F. Dubois, A. Mehta, T. Kalomeris, K. Flaherty, G. Boland und U. Mahmood (2017). "Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response." *Cancer Res* **77**(9): 2318-2327.

Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, J. J. Grob, C. L. Cowey, C. D. Lao, D. Schadendorf, R. Dummer, M. Smylie, P. Rutkowski, P. F. Ferrucci, A. Hill, J. Wagstaff, M. S. Carlino, J. B. Haanen, M. Maio, I. Marquez-Rodas, G. A. McArthur, P. A. Ascierto, G. V. Long, M. K. Callahan, M. A. Postow, K. Grossmann, M. Sznol, B. Dreno, L. Bastholt, A. Yang, L. M. Rollin, C. Horak, F. S. Hodi und J. D. Wolchok (2015). "Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma." *N Engl J Med* **373**(1): 23-34.

LaSalle, T., E. E. Austin, G. Rigney, E. Wehrenberg-Klee, S. Nesti, B. Larimer und U. Mahmood (2020). "Granzyme B PET imaging of immune-mediated tumor killing as a tool for understanding immunotherapy response." *J Immunother Cancer* **8**(1): e 000291.

Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe und G. J. Freeman (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." *Nat Immunol* **2**(3): 261-268.

Le, D. T., J. N. Uram, H. Wang, B. R. Bartlett, H. Kemberling, A. D. Eyring, A. D. Skora, B. S. Luber, N. S. Azad, D. Laheru, B. Biedrzycki, R. C. Donehower, A. Zaheer, G. A. Fisher, T. S. Crocenzi, J. J. Lee, S. M. Duffy, R. M. Goldberg, A. de la Chapelle, M. Koshiji, F. Bhaijee, T. Huebner, R. H. Hruban, L. D. Wood, N. Cuka, D. M. Pardoll, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, S. Zhou, T. C. Cornish, J. M. Taube, R. A. Anders, J. R. Eshleman, B. Vogelstein und L. A. Diaz, Jr. (2015). "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency." *N Engl J Med* **372**(26): 2509-2520.

Leach, D. R., M. F. Krummel und J. P. Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." *Science* **271**(5256): 1734-1736.

Lee, D. M., H. F. Staats, J. S. Sundry, D. D. Patel, G. D. Sempowski, R. M. Scearce, D. M. Jones und B. F. Haynes (1998). "Immunologic characterization of CD7-deficient mice." *J Immunol* **160**(12): 5749-5756.

Lee, S. H., H. Soh, J. H. Chung, E. H. Cho, S. J. Lee, J. M. Ju, J. H. Sheen, H. Kim, S. J. Oh, S. J. Lee, J. Chung, K. Choi, S. Y. Kim und J. S. Ryu (2020). "Feasibility of real-time in vivo <sup>89</sup>Zr-DFO-labeled CAR T-cell trafficking using PET imaging." *PLoS One* **15**(1): e0223814.

Lengauer, C., K. W. Kinzler und B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-649.

Levi, J., T. Lam, S. R. Goth, S. Yaghoubi, J. Bates, G. Ren, S. Jivan, T. L. Huynh, J. E. Blecha, R. Khattri, K. F. Schmidt, D. Jennings und H. VanBrocklin (2019). "Imaging of Activated T Cells as an Early Predictor of Immune Response to Anti-PD-1 Therapy." *Cancer Res* **79**(13): 3455-3465.

Li, M., Y. Wang, M. Liu und X. Lan (2018). "Multimodality reporter gene imaging: Construction strategies and application." *Theranostics* **8**(11): 2954-2973.

- Li, N., K. S. Hill und L. A. Elferink (2008). "Analysis of receptor tyrosine kinase internalization using flow cytometry." Methods Mol Biol **457**: 305-17.
- Lim, S. O., C. W. Li, W. Xia, J. H. Cha, L. C. Chan, Y. Wu, S. S. Chang, W. C. Lin, J. M. Hsu, Y. H. Hsu, T. Kim, W. C. Chang, J. L. Hsu, H. Yamaguchi, Q. Ding, Y. Wang, Y. Yang, C. H. Chen, A. A. Sahin, D. Yu, G. N. Hortobagyi und M. C. Hung (2016). "Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5." Cancer Cell **30**(6): 925-939.
- Link, M., R. Warnke, J. Finlay, M. Amylon, R. Miller, J. Dilley und R. Levy (1983). "A Single Monoclonal Antibody Identifies T-Cell Lineage of Childhood Lymphoid Malignancies" Blood **62**(4): 722-728.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, J. Greene, R. Peach, K. L. Bennett und R. S. Mittler (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." Immunity **4**(6): 535-543.
- Loubaki, L., T. Tremblay und R. Bazin (2013). "In vivo depletion of leukocytes and platelets following injection of T cell-specific antibodies into mice." J Immunol Methods **393**(1-2): 38-44.
- Mageed, R. A., S. Garaud, T. E. Taher, K. Parikh, J. O. Pers, C. Jamin, Y. Renaudineau und P. Youinou (2012). "CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte." Autoimmun Rev **11**(11): 795-798.
- Mahoney, K. M., G. J. Freeman und D. F. McDermott (2015). "The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma." Clin Ther **37**(4): 764-782.
- Malcolm, S. L., E. L. Smith, T. Bourne und S. Shaw (2012). "A humanised mouse model of cytokine release: comparison of CD3-specific antibody fragments." J Immunol Methods **384**(1-2): 33-42.
- Mall, S., N. Yusufi, R. Wagner, R. Klar, H. Bianchi, K. Steiger, M. Straub, S. Audehm, I. Laitinen, M. Aichler, C. Peschel, S. Ziegler, M. Mustafa, M. Schwaiger, C. D'Alessandria und A. M. Krackhardt (2016). "Immuno-PET Imaging of Engineered Human T Cells in Tumors." Cancer Res **76**(14): 4113-4123.
- Mariathasan, S., S. J. Turley, D. Nickles, A. Castiglioni, K. Yuen, Y. Wang, E. E. Kadel, III, H. Koepfen, J. L. Astarita, R. Cubas, S. Jhunjhunwala, R. Banchereau, Y. Yang, Y. Guan, C. Chalouni, J. Ziai, Y. Senbabaoglu, S. Santoro, D. Sheinson, J. Hung, J. M. Giltman, A. A. Pierce, K. Mesh, S. Lianoglou, J. Riegler, R. A. D. Carano, P. Eriksson, M. Hoglund, L. Somarriba, D. L. Halligan, M. S. van der Heijden, Y. Loriot, J. E. Rosenberg, L. Fong, I. Mellman, D. S. Chen, M. Green, C. Derleth, G. D. Fine, P. S. Hegde, R. Bourgon und T. Powles (2018). "TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells." Nature **554**(7693): 544-548.
- Mariuzza, R. A., P. Agnihotri und J. Orban (2020). "The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma." J Biol Chem **295**(4): 914-925.
- Markovic, S. N., F. Galli, V. J. Suman, W. K. Nevala, A. M. Paulsen, J. C. Hung, D. N. Gansen, L. A. Erickson, P. Marchetti, G. A. Wiseman und A. Signore (2018). "Non-invasive visualization of tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma undergoing immune checkpoint inhibitor therapy: a pilot study." Oncotarget **9**(54): 30268-30278.
- Martins, F., L. Sofiya, G. P. Sykiotis, F. Lamine, M. Maillard, M. Fraga, K. Shabafrouz, C. Ribbi, A. Cairoli, Y. Guex-Crosier, T. Kuntzer, O. Michielin, S. Peters, G. Coukos, F. Spertini, J. A. Thompson und M. Obeid (2019). "Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance." Nat Rev Clin Oncol **16**(9): 563-580.

Mathew, J. M., H. V. J., A. LeFever, I. Konieczna, C. Stratton, J. He, X. Huang, L. Gallon, A. Skaro, M. J. Ansari und J. R. Leventhal (2018). "A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants." *Sci Rep* **8**(1): 7428.

Mattes, J., M. Hulett, W. Xie, S. Hogan, M. E. Rothenberg, P. Foster und C. Parish (2003). "Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process." *J Exp Med* **197**(3): 387-393.

Mayer, K. M., S. Mall, N. Yusufi, D. Gosmann, K. Steiger, L. Russelli, H. O. Bianchi, S. Audehm, R. Wagner, E. Bräunlein, A. Stelzl, F. Bassermann, W. Weichert, W. Weber, Schwaiger M., C. D'Alessandria und A. M. Krackhardt (2018). "T-cell functionality testing is highly relevant to developing novel immuno-tracers monitoring T cells in the context of immunotherapies and revealed CD7 as an attractive target." *Theranostics* **8**(21): 6070- 6087.

McCracken, M. N., D. N. Vatakis, D. Dixit, J. McLaughlin, J. A. Zack und O. N. Witte (2015). "Noninvasive detection of tumor-infiltrating T cells by PET reporter imaging." *J Clin Invest* **125**(5): 1815-1826.

McGranahan, N., A. J. Furness, R. Rosenthal, S. Ramskov, R. Lyngaa, S. K. Saini, M. Jamal-Hanjani, G. A. Wilson, N. J. Birkbak, C. T. Hiley, T. B. Watkins, S. Shafi, N. Murugaesu, R. Mitter, A. U. Akarca, J. Linares, T. Marafioti, J. Y. Henry, E. M. Van Allen, D. Miao, B. Schilling, D. Schadendorf, L. A. Garraway, V. Makarov, N. A. Rizvi, A. Snyder, M. D. Hellmann, T. Merghoub, J. D. Wolchok, S. A. Shukla, C. J. Wu, K. S. Peggs, T. A. Chan, S. R. Hadrup, S. A. Quezada und C. Swanton (2016). "Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade." *Science* **351**(6280): 1463-1469.

Met, O., K. M. Jensen, C. A. Chamberlain, M. Donia und I. M. Svane (2019). "Principles of adoptive T cell therapy in cancer." *Semin Immunopathol* **41**(1): 49-58.

Meuer, S. C., R. E. Hussey, M. Fabbi, D. Fox, O. Acuto, K. A. Fitzgerald, J. C. Hodgdon, J. P. Protentis, S. F. Schlossman und E. L. Reinherz (1984). "An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein." *Cell* **36**(4): 897-906.

Miller, A. B., B. Hoogstraten, M. Staquet und A. Winkler (1981). "Reporting results of cancer treatment." *Cancer* **47**(1): 207-214.

Miller, G. T., P. S. Hochman, W. Meier, R. Tizard, S. A. Bixler, M. D. Rosa und B. P. Wallner (1993). "Specific interaction of lymphocyte function-associated antigen 3 with CD2 can inhibit T cell responses." *J Exp Med* **178**(1): 211-222.

Moek, K. L., S. J. H. Waaijer, I. C. Kok, F. V. Suurs, A. H. Brouwers, C. W. Menke-van der Houven van Oordt, T. T. Wind, J. A. Gietema, C. P. Schröder, S. V. K. Mahesh, A. Jorritsma-Smit, M. N. Lub-de Hooge, R. S. N. Fehrmann, D. J. A. de Groot und E. G. E. de Vries (2019). "89Zr-labeled bispecific T-cell engager AMG 211 PET shows AMG 221 accumulation in CD3-rich tissues and clear, heterogeneous tumor uptake." *Clin Cancer Res* **25**(12): 3517-3527.

Moingeon, P., H. C. Chang, B. P. Wallner, C. Stebbins, A. Z. Frey und E. L. Reinherz (1989). "CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function." *Nature* **339**(6222): 312-314.

Molthoff, C. F., H. M. Pinedo, H. M. Schluper, H. W. Nijman und E. Boven (1992). "Comparison of the pharmacokinetics, biodistribution and dosimetry of monoclonal antibodies OC125, OV-TL 3, and 139H2 as IgG and F(ab')<sub>2</sub> fragments in experimental ovarian cancer." *Br J Cancer* **65**(5): 677-683.

Morgan, R. A., M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, M. S. Hughes, J. C. Yang, R. M. Sherry, R. E. Royal, S. L. Topalian, U. S. Kammula, N. P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C. R. de Vries, L. J. Rogers-

Freezer, S. A. Mavroukakis und S. A. Rosenberg (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." Science **314**(5796): 126-129.

Motzer, R. J., N. M. Tannir, D. F. McDermott, O. Aren Frontera, B. Melichar, T. K. Choueiri, E. R. Plimack, P. Barthelemy, C. Porta, S. George, T. Powles, F. Donskov, V. Neiman, C. K. Kollmannsberger, P. Salman, H. Gurney, R. Hawkins, A. Ravaud, M. O. Grimm, S. Bracarda, C. H. Barrios, Y. Tomita, D. Castellano, B. I. Rini, A. C. Chen, S. Mekan, M. B. McHenry, M. Wind-Rotolo, J. Doan, P. Sharma, H. J. Hammers und B. Escudier; CheckMate 214 Investigators (2018). "Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma." N Engl J Med **378**(14): 1277-1290.

Müller, P., S. I. Rothschild, W. Arnold, P. Hirschmann, L. Horvath, L. Bubendorf, S. Savic und A. Zippelius (2016). "Metastatic spread in patients with non-small cell lung cancer is associated with a reduced density of tumor-infiltrating T cells." Cancer Immunol Immunother **65**(1): 1-11.

Naidoo, J., D. B. Page, B. T. Li, L. C. Connell, K. Schindler, M. E. Lacouture, M. A. Postow und J. D. Wolchok (2015). "Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies." Ann Oncol **26**(12): 2375-2391.

Natarajan, A., A. T. Mayer, R. E. Reeves, C. M. Nagamine und S. S. Gambhir (2017). "Development of Novel ImmunoPET Tracers to Image Human PD-1 Checkpoint Expression on Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Humanized Mouse Model." Mol Imaging Biol **19**(6): 903-914.

Neelapu, S. S., F. L. Locke, N. L. Bartlett, L. J. Lekakis, D. B. Miklos, C. A. Jacobson, I. Braunschweig, O. O. Oluwole, T. Siddiqi, Y. Lin, J. M. Timmerman, P. J. Stiff, J. W. Friedberg, I. W. Flinn, A. Goy, B. T. Hill, M. R. Smith, A. Deol, U. Farooq, P. McSweeney, J. Munoz, I. Avivi, J. E. Castro, J. R. Westin, J. C. Chavez, A. Ghobadi, K. V. Komanduri, R. Levy, E. D. Jacobsen, T. E. Witzig, P. Reagan, A. Bot, J. Rossi, L. Navale, Y. Jiang, J. Aycocock, M. Elias, D. Chang, J. Wieszorek und W. Y. Go (2017). "Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma." N Engl J Med **377**(26): 2531-2544.

Neelapu, S. S., S. Tummala, P. Kebriaei, W. Wierda, C. Gutierrez, F. L. Locke, K. V. Komanduri, Y. Lin, N. Jain, N. Daver, J. Westin, A. M. Gulbis, M. E. Loghin, J. F. de Groot, S. Adkins, S. E. Davis, K. Rezvani, P. Hwu und E. J. Shpall (2018). "Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities." Nat Rev Clin Oncol **15**(1): 47-62.

Niemeijer, A. N., D. Leung, M. C. Huisman, I. Bahce, O. S. Hoekstra, G. van Dongen, R. Boellaard, S. Du, W. Hayes, R. Smith, A. D. Windhorst, N. H. Hendrikse, A. Poot, D. J. Vugts, E. Thunnissen, P. Morin, D. Lipovsek, D. J. Donnelly, S. J. Bonacorsi, L. M. Velasquez, T. D. de Gruijl, E. F. Smit und A. J. de Langen (2018). "Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer." Nat Commun **9**(1): 4664.

Nishino, M., A. Giobbie-Hurder, M. P. Manos, N. Bailey, E. I. Buchbinder, P. A. Ott, N. H. Ramaiya und F. S. Hodi (2017a). "Immune-Related Tumor Response Dynamics in Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab: Identifying Markers for Clinical Outcome and Treatment Decisions." Clin Cancer Res **23**(16): 4671-4679.

Nishino, M., N. H. Ramaiya, H. Hatabu und F. S. Hodi (2017b). "Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development." Nat Rev Clin Oncol **14**(11): 655-668.

Norelli, M., B. Camisa, G. Barbiera, L. Falcone, A. Purevdorj, M. Genua, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Doglioni, P. Cristofori, C. Traversari, C. Bordignon, F. Ciceri, R. Ostuni, C. Bonini, M. Casucci und A. Bondanza (2019). "Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrom and neurotoxicity due to CAR T cells." Nat Med **24**(6): 739-748.

- Nowicki, T. S., S. Hu-Lieskovan und A. Ribas (2018). "Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade." *Cancer J* **24**(1): 47-53.
- O'Donnell, J. S., M. W. L. Teng und M. J. Smyth (2019). "Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy." *Nat Rev Clin Oncol* **16**(3): 151-167.
- O, J. H., M. A. Lodge und R. L. Wahl (2016). "Practical PERCIST: A Simplified Guide to PET Response Criteria in Solid Tumors 1.0." *Radiology* **280**(2): 576-584.
- Olafsen, T., M. Torgov, G. G. Zhang, J. Romero, C. Zampila, F. Marchioni, K. Jiang, J. Gudas und D. Satpayev (2015). "Pet imaging of cytotoxic human T cells using an 89Zr-labeled anti-CD8 minibody." *J Immunother Cancer* **3**(Suppl 2): P388.
- Pandit-Taskar, N., M. A. Postow, M. D. Hellmann, J. J. Harding, C. A. Barker, J. A. O'Donoghue, M. Ziolkowska, S. Ruan, S. K. Lyashchenko, F. Tsai, M. Farwell, T. C. Mitchell, R. Korn, W. Le, J. S. Lewis, W. A. Weber, D. Behera, I. Wilson, M. Gordon, A. M. Wu und J. D. Wolchok (2020). "First-in-Human Imaging with 89Zr-Df-IAB22M2C Anti-CD8 Minibody in Patients with Solid Malignancies: Preliminary Pharmacokinetics, Biodistribution, and Lesion Targeting." *J Nucl Med* **61**(4): 512-519.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264.
- Park, H. J., G. H. Kim, K. W. Kim, C. W. Lee, S. Yoon, Y. K. Chae, S. H. Tirumani und N. H. Ramaiya (2021). "Comparison of RECIST 1.1 and iRECIST in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Cancers (Basel)* **13**(1): 120.
- Parsa, A. T., J. S. Waldron, A. Panner, C. A. Crane, I. F. Parney, J. J. Barry, K. E. Cachola, J. C. Murray, T. Tihan, M. C. Jensen, P. S. Mischel, D. Stokoe und R. O. Pieper (2007). "Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma." *Nat Med* **13**(1): 84-88.
- Patel, S. A. und A. J. Minn (2018). "Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies." *Immunity* **48**(3): 417-433.
- Patnaik, A., S. P. Kang, D. Rasco, K. P. Papadopoulos, J. Ellassaiss-Schaap, M. Beeram, R. Drengler, C. Chen, L. Smith, G. Espino, K. Gergich, L. Delgado, A. Daud, J. A. Lindia, X. N. Li, R. H. Pierce, J. H. Yearley, D. Wu, O. Laterza, M. Lehnert, R. Iannone und A. W. Tolcher (2015). "Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors." *Clin Cancer Res* **21**(19): 4286-4293.
- Pektor S., J. Schlöder, B. Klasen, N. Bausbacher, D.-C. Wagner, M. Schreckenberger, S. Grabbe, H. Jonuleit und M. Miederer (2020). "Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **47**: 1314-1325.
- Persigehl, T., S. Lennartz und L. H. Schwartz (2020). "iRECIST: how to do it." *Cancer Imaging* **20**(1): 2.
- Pitt, J. M., M. Vetizou, R. Daillere, M. P. Roberti, T. Yamazaki, B. Routy, P. Lepage, I. G. Boneca, M. Chamainard, G. Kroemer und L. Zitvogel (2016). "Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors." *Immunity* **44**(6): 1255-1269.
- Porter, D. L., B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg und C. H. June (2011). "Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia." *N Engl J Med* **365**(8): 725-733.

Powles, T., J. P. Eder, G. D. Fine, F. S. Braiteh, Y. Loriot, C. Cruz, J. Bellmunt, H. A. Burris, D. P. Petrylak, S. L. Teng, X. Shen, Z. Boyd, P. S. Hegde, D. S. Chen und N. J. Vogelzang (2014). "MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer." Nature **515**(7528): 558-562.

Quah, B. J. C. und C. R. Parish (2012). "New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes." J Immunol Methods **379**(1-2): 1-14.

Ramagopal, U. A., W. Liu, S. C. Garrett-Thomson, J. B. Bonanno, Q. Yan, M. Srinivasan, S. C. Wong, A. Bell, S. Mankikar, V. S. Rangan, S. Deshpande, A. J. Korman und S. C. Almo (2017). "Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(21): E4223-E4232.

Rashidian, M., J. R. Ingram, M. Dougan, A. Dongre, K. A. Whang, C. LeGall, J. J. Cragnolini, B. Bierie, M. Gostissa, J. Gorman, G. M. Grotenbreg, A. Bhan, R. A. Weinberg und H. L. Ploegh (2017). "Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells." J Exp Med **214**(8): 2243-2255.

Reck, M., D. Rodriguez-Abreu, A. G. Robinson, R. Hui, T. Csoszi, A. Fulop, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M. A. Leiby, G. M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J. R. Brahmer und K.-. Investigators (2016). "Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer." N Engl J Med **375**(19): 1823-1833.

Reinhold, U., L. Liu, J. Sesterhenn und H. Abken (1996). "CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells." Immunology **89**(3): 391-396.

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

Riaz, N., J. J. Havel, S. M. Kendall, V. Makarov, L. A. Walsh, A. Desrichard, N. Weinhold und T. A. Chan (2016). "Recurrent SERPINB3 and SERPINB4 mutations in patients who respond to anti-CTLA4 immunotherapy." Nat Genet **48**(11): 1327-1329.

Ribas, A. und J. D. Wolchok (2018). "Cancer immunotherapy using checkpoint blockade." Science **359**(6382): 1350-1355.

Robbins, P. F., S. H. Kassim, T. L. Tran, J. S. Crystal, R. A. Morgan, S. A. Feldman, J. C. Yang, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, N. P. Restifo, M. Raffeld, C. C. Lee, Y. F. Li, M. El-Gamil und S. A. Rosenberg (2015). "A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response." Clin Cancer Res **21**(5): 1019-1027.

Robert, C., J. Schachter, G. V. Long, A. Arance, J. J. Grob, L. Mortier, A. Daud, M. S. Carlino, C. McNeil, M. Lotem, J. Larkin, P. Lorigan, B. Neyns, C. U. Blank, O. Hamid, C. Mateus, R. Shapira-Frommer, M. Kosh, H. Zhou, N. Ibrahim, S. Ebbinghaus und A. Ribas; KEYNOTE-006 investigators (2015). "Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma." N Engl J Med **372**(26): 2521-2532.

Rohaan, M. W., J. H. van den Berg, P. Kvistborg und J. Haanen (2018). "Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option." J Immunother Cancer **6**(1): 102.

- Rolle, A., A. Halenius, E. M. Ewen, A. Cerwenka, H. Hengel und F. Momburg (2016). "CD2-CD58 interactions are pivotal for the activation and function of adaptive natural killer cells in human cytomegalovirus infection." *Eur J Immunol* **46**(10): 2420-2425.
- Ronald, J. A., B. S. Kim, G. Gowrishankar, M. Namavari, I. S. Alam, A. D'Souza, H. Nishikii, H. Y. Chuang, O. Ilovich, C. F. Lin, R. Reeves, A. Shuhendler, A. Hoehne, C. T. Chan, J. Baker, S. S. Yaghoubi, H. F. VanBrocklin, R. Hawkins, B. L. Franc, S. Jivan, J. B. Slater, E. F. Verdin, K. T. Gao, J. Benjamin, R. Negrin und S. S. Gambhir (2017). "A PET Imaging Strategy to Visualize Activated T Cells in Acute Graft-versus-Host Disease Elicited by Allogenic Hematopoietic Cell Transplant." *Cancer Res* **77**(11): 2893-2902.
- Rooney, M. S., S. A. Shukla, C. J. Wu, G. Getz und N. Hacohen (2015). "Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity." *Cell* **160**(1-2): 48-61.
- Rose, A. C., P. J. Shenoy, G. Garrett, M. Seward, R. A. Kucuk, H. Doksansky, L. J. Nastoupil und C. R. Flowers (2012). "A systematic literature review and meta-analysis of radioimmunotherapy consolidation for patients with untreated follicular lymphoma." *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. **12**(6): 393-399.
- Rosenberg, S. A. und N. P. Restifo (2015). "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer." *Science* **348**(6230): 62-68.
- Rossi, G., M. Bauckneht, C. Genova, E. Rijavec, F. Biello, S. Mennella, M. G. Dal Bello, G. Cittadini, P. Bruzzi, R. Piva, V. Ceriani, G. Sambuceti, E. Lopci, S. Morbelli und F. Grossi (2020). "Comparison between 18F-FDG PET-based an CT-based criteria in non-small cell lung cancer paients treated with Nivolumab." *J Nucl Med* **61**(7): 990-998.
- Rossi, S., A. Castello, L. Toschi und e. Lopci (2018). "Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: potential predictors of response and new strategies to assess activity." *Immunotherapy* **10**(9): 797-805.
- Rowshanravan, B., N. Halliday und D. M. Sansom (2018). "CTLA-4: a moving target in immunotherapy." *Blood* **131**(1): 58-67.
- Ruella, M., D. M. Barrett, S. S. Kenderian, O. Shestova, T. J. Hofmann, J. Perazzelli, M. Klichinsky, V. Aikawa, F. Nazimuddin, M. Kozlowski, J. Scholler, S. F. Lacey, J. J. Melenhorst, J. J. Morrisette, D. A. Christian, C. A. Hunter, M. Kalos, D. L. Porter, C. H. June, S. A. Grupp und S. Gill (2016). "Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies." *J Clin Invest* **126**(10): 3814-3826.
- Sachpekidis C., A. Kopp-Schneider, L. Pan, D. Papamichail, U. Haberkorn, J. C. Hassel und A. Dimitrakopoulou-Strauss (2021). " Interim [18F]FDG PET/CT can predict response to anti-PD-1 treatment in metastatic melanoma." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **48**(6): 1932-1943.
- Sade-Feldman, M., K. Yizhak, S. L. Bjorgaard, J. P. Ray, C. G. de Boer, R. W. Jenkins, D. J. Lieb, J. H. Chen, D. T. Frederick, M. Barzily-Rokni, S. S. Freeman, A. Reuben, P. J. Hoover, A. C. Villani, E. Ivanova, A. Portell, P. H. Lizotte, A. R. Aref, J. P. Eliane, M. R. Hammond, H. Vitzthum, S. M. Blackmon, B. Li, V. Gopalakrishnan, S. M. Reddy, Z. A. Cooper, C. P. Paweletz, D. A. Barbie, A. Stemmer-Rachamimov, K. T. Flaherty, J. A. Wargo, G. M. Boland, R. J. Sullivan, G. Getz und N. Hacohen (2018). "Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma." *Cell* **175**(4): 998-1013 e1020.
- Sahin, U., E. Derhovanessian, M. Miller, B.-P. Kloke, P. Simon, M. Löwer, V. Bukur, A. D. Tadmor, U. Luxemburger, B. Schrörs, T. Omokoko, M. Vormehr, C. Albrecht, A. Paruzynski, A. N. Kuhn, J. Buck, S. Heesch, K. H. Schreeb, F. Müller, I. Ortseifer, I. Vogler, E. Godehardt, S. Attig, R. Rae, A. Breitkreuz, C. Tolliver, M. Suchan, G. Martic, A. Hohberger, P. Sorn, J. Diekmann, J. Ciesla, O.

Waksmann, A.-K. Brück, M. Witt, M. Zillgen, A. Rothermel, B. Kasemann, D. Langer, S. Bolte, M. Diken, S. Kreiter, R. Nemecek, C. Gebhardt, S. Grabbe, C. Höller, J. Utikal, C. Huber, C. Loquai und Ö. Türeci (2017). "Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer". Nature **547**(7662): 222-226.

Sakuishi, K., L. Apetoh, J. M. Sullivan, B. R. Blazar, V. K. Kuchroo und A. C. Anderson (2010). "Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity." J Exp Med **207**(10): 2187-2194.

Samstein, R. M., C. H. Lee, A. N. Shoushtari, M. D. Hellmann, R. Shen, Y. Y. Janjigian, D. A. Barron, A. Zehir, E. J. Jordan, A. Omuro, T. J. Kaley, S. M. Kendall, R. J. Motzer, A. A. Hakimi, M. H. Voss, P. Russo, J. Rosenberg, G. Iyer, B. H. Bochner, D. F. Bajorin, H. A. Al-Ahmadie, J. E. Chaff, C. M. Rudin, G. J. Riely, S. Baxi, A. L. Ho, R. J. Wong, D. G. Pfister, J. D. Wolchok, C. A. Barker, P. H. Gutin, C. W. Brennan, V. Tabar, I. K. Mellingerhoff, L. M. DeAngelis, C. E. Ariyan, N. Lee, W. D. Tap, M. M. Gounder, S. P. D'Angelo, L. Saltz, Z. K. Stadler, H. I. Scher, J. Baselga, P. Razavi, C. A. Klebanoff, R. Yaeger, N. H. Segal, G. Y. Ku, R. P. DeMatteo, M. Ladanyi, N. A. Rizvi, M. F. Berger, N. Riaz, D. B. Solit, T. A. Chan und L. G. T. Morris (2019). "Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types." Nat Genet **51**(2): 202-206.

Sanmamed, M. F., F. Pastor, A. Rodriguez, J. L. Perez-Gracia, M. E. Rodriguez-Ruiz, M. Jure-Kunkel und I. Melero (2015). "Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS." Semin Oncol **42**(4): 640-655.

Sarangi, P. P., B. Kim und B. T. Rouse (2008). "Non-mitogenic anti-CD3F(ab')<sub>2</sub> monoclonal antibody: a novel approach to control herpetic stromal keratitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(12): 5425-5433.

Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old und K. Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-18543.

Schalper, K. A., V. Velcheti, D. Carvajal, H. Wimberly, J. Brown, L. Pusztai und D. L. Rimm (2014). "In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas." Clin Cancer Res **20**(10): 2773-2782.

Schmid, I., W. J. Krall, C. H. Uittenbogaart, J. Braun und J. V. Giorgi (1992). "Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry." Cytometry **13**(2): 204-208.

Schumacher, T. N. und R. D. Schreiber (2015). "Neoantigens in cancer immunotherapy." Science **348**(6230): 69-74.

Schwartz, L. H., S. Litieri, E. de Vries, R. Ford, S. Gwyther, S. Mandrekar, L. Shankar, J. Bogaerts, A. Chen, J. Dancey, W. Hayes, F. S. Hodi, O. S. Hoekstra, E. P. Huang, N. Lin, Y. Liu, P. Therasse, J. D. Wolchok und L. Seymour (2016). "RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee." Eur J Cancer **62**: 132-137.

Schwartzentruber, D. J., D. H. Lawson, J. M. Richards, R. M. Conry, D. M. Miller, J. Treisman, F. Gailani, L. Riley, K. Conlon, B. Pockaj, K. L. Kendra, R. L. White, R. Gonzalez, T. M. Kuzel, B. Curti, P. D. Leming, E. D. Whitman, J. Balkissoon, D. S. Reintgen, H. Kaufman, F. M. Marincola, M.

J. Merino, S. A. Rosenberg, P. Choyke, D. Vena und P. Hwu (2011). "gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma." *N Engl J Med* **364**(22): 2119-2127.

Schwenck, J., B. Schorg, F. Fiz, D. Sonanini, A. Forschner, T. Eigentler, B. Weide, M. Martella, I. Gonzalez-Menendez, C. Campi, G. Sambuceti, F. Seith, L. Quintanilla-Martinez, C. Garbe, C. Pfannenber, M. Rocken, C. la Fougere, B. J. Pichler und M. Kneilling (2020). "Cancer immunotherapy is accompanied by distinct metabolic patterns in primary and secondary lymphoid organs observed by non-invasive in vivo (18)F-FDG-PET." *Theranostics* **10**(2): 925-937.

Scott, C. F., Jr., S. Bolender, G. D. McIntyre, J. Holldack, J. M. Lambert, Y. P. Venkatesh, C. Morimoto, J. Ritz und S. F. Schlossman (1989). "Activation of human cytolytic cells through CD2/T11. Comparison of the requirements for the induction and direction of lysis of tumor targets by T cells and NK cells." *J Immunol* **142**(11): 4105-4112.

Seban R.-D., J.-B. Assie, E. Giroux-Leprieur, M.-A. Massiani, M. Soussan, G. Bonardel, C. Chouaid, M. Playe, L. Goldfarb, B. Duchemann, N. Girard und L. Champion (2020). "FDG-PET biomarkers associated with long-term benefit from first-line immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." *Ann Nucl Med* **34**: 968-974.

Seith, F., A. Forschner, H. Schmidt, C. Pfannenber, B. Guckel, K. Nikolaou, C. la Fougere, C. Garbe und N. Schwenzer (2018). "18F-FDG-PET detects complete response to PD1-therapy in melanoma patients two weeks after therapy start." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **45**(1): 95-101.

Selby, M. J., J. J. Engelhardt, M. Quigley, K. A. Henning, T. Chen, M. Srinivasan und A. J. Korman (2013). "Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells." *Cancer Immunol Res* **1**(1): 32-42.

Seo, J. W., R. Tavaré, L. M. Mahakian, M. T. Silvestrini, S. Tam, E. S. Ingham, F. B. Salazar, A. D. Borowsky, A. M. Wu und K. W. Ferrara (2018). "CD8(+) T-Cell Density Imaging with (64)Cu-Labeled Cys-Diobody Informs Immunotherapy Protocols." *Clin Cancer Res* **24**(20): 4976-4987.

Seymour, L., J. Bogaerts, A. Perrone, R. Ford, L. H. Schwartz, S. Mandrekar, N. U. Lin, S. Litiere, J. Dancey, A. Chen, F. S. Hodi, P. Therasse, O. S. Hoekstra, L. K. Shankar, J. D. Wolchok, M. Ballinger, C. Caramella und E. G. E. de Vries; RECIST working group (2017). "iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics." *Lancet Oncol* **18**(3): e143-e152.

Sham, J. G., F. M. Kievit, J. R. Grierson, P. A. Chiarelli, R. S. Miyaoka, M. Zhang, R. S. Yeung, S. Minoshima und J. O. Park (2014). "Glypican-3-targeting F(ab')<sub>2</sub> for 89Zr PET of hepatocellular carcinoma." *J Nucl Med* **55**(12): 2032-2037.

Sharma, A., S. K. Subudhi, J. Blando, J. Scutti, L. Vence, J. Wargo, J. P. Allison, A. Ribas und P. Sharma (2019). "Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers." *Clin Cancer Res* **25**(4): 1233-1238.

Sharma, P., S. Hu-Lieskovan, J. A. Wargo und A. Ribas (2017a). "Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy." *Cell* **168**(4): 707-723.

Sharma, P., M. Retz, A. Siefker-Radtke, A. Baron, A. Necchi, J. Bedke, E. R. Plimack, D. Vaena, M. O. Grimm, S. Bracarda, J. A. Arranz, S. Pal, C. Ohyama, A. Saci, X. Qu, A. Lambert, S. Krishnan, A. Azrilevich und M. D. Galsky (2017b). "Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial." *Lancet Oncol* **18**(3): 312-322.

Shealy, D. J. und S. Visvanathan (2008). "Anti-TNF antibodies: lessons from the past, roadmap for the future." *Handb Exp Pharmacol* (181): 101-129.

Shukla, S. A., P. Bachireddy, B. Schilling, C. Galonska, Q. Zhan, C. Bango, R. Langer, P. C. Lee, D. Gusenleitner, D. B. Keskin, M. Babadi, A. Mohammad, A. Gnirke, K. Clement, Z. J. Cartun, E. M. Van Allen, D. Miao, Y. Huang, A. Snyder, T. Merghoub, J. D. Wolchok, L. A. Garraway, A. Meissner, J. S. Weber, N. Hacohen, D. Neuberg, P. R. Potts, G. F. Murphy, C. G. Lian, D. Schadendorf, F. S. Hodi und C. J. Wu (2018). "Cancer-Germline Antigen Expression Discriminates Clinical Outcome to CTLA-4 Blockade." *Cell* **173**(3): 624-633.e8.

Simpson, T. R., F. Li, W. Montalvo-Ortiz, M. A. Sepulveda, K. Bergerhoff, F. Arce, C. Roddie, J. Y. Henry, H. Yagita, J. D. Wolchok, K. S. Peggs, J. V. Ravetch, J. P. Allison und S. A. Quezada (2013). "Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma." *J Exp Med* **210**(9): 1695-1710.

Sommermeier, D., M. Hudecek, P. L. Kosasih, T. Gogishvili, D. G. Maloney, C. J. Turtle und S. R. Riddell (2016). "Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo." *Leukemia* **30**(2): 492-500.

Sommermeier, D., T. Hill, S. M. Shamah, A. I. Salter, Y. Chen, K. M. Mohler und S. R. Riddell (2017). "Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy." *Leukemia* **31**(10): 2191-2199.

Stevanovic, S., L. M. Draper, M. M. Langhan, T. E. Campbell, M. L. Kwong, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg und C. S. Hinrichs (2015). "Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells." *J Clin Oncol* **33**(14): 1543-1550.

Stillwell, R. und B. E. Bierer (2001). "T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation." *Immunol Res* **24**(1): 31-52.

Takada, K., G. Toyokawa, Y. Yoneshima, K. Tanaka, I. Okamoto, M. Shimokawa, S. Wakasu, A. Haro, A. Osoegawa, T. Tagawa, Y. Oda, Y. Nakanishi und M. Mori (2019). "(18)F-FDG uptake in PET/CT is a potential predictive biomarker of response to anti-PD-1 antibody therapy in non-small cell lung cancer." *Sci Rep* **9**(1): 13362.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak und S. Sakaguchi (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **192**(2): 303-310.

Tang, J., A. Shalabi und V. M. Hubbard-Lucey (2018). "Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape." *Ann Oncol* **29**(1): 84-91.

Taube, J. M., R. A. Anders, G. D. Young, H. Xu, R. Sharma, T. L. McMiller, S. Chen, A. P. Klein, D. M. Pardoll, S. L. Topalian und L. Chen (2012). "Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape." *Sci Transl Med* **4**(127): 127ra137.

Tavaré, R., H. Escuin-Ordinas, S. Mok, M. N. McCracken, K. A. Zettlitz, F. B. Salazar, O. N. Witte, A. Ribas und A. M. Wu (2016). "An Effective Immuno-PET Imaging Method to Monitor CD8-Dependent Responses to Immunotherapy." *Cancer Res* **76**(1): 73-82.

Tavaré, R., M. N. McCracken, K. A. Zettlitz, S. M. Knowles, F. B. Salazar, T. Olafsen, O. N. Witte und A. M. Wu (2014). "Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8+ T cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(3): 1108-1113.

Tavaré, R., M. N. McCracken, K. A. Zettlitz, F. B. Salazar, T. Olafsen, O. N. Witte und A. M. Wu (2015). "Immuno-PET of Murine T Cell Reconstitution Postadoptive Stem Cell Transplantation Using Anti-CD4 and Anti-CD8 Cys-Diabodies." *J Nucl Med* **56**(8): 1258-1264.

Tazdait, M., L. Mezquita, J. Lahmar, R. Ferrara, F. Bidault, S. Ammari, C. Balleyguier, D. Planchard, A. Gazzah, J. C. Soria, A. Marabelle, B. Besse, und C. Caramella (2018). "Patterns of responses in metastatic NSCLC during PD-1 or PDL-1 inhibitor therapy: Comparison of RECIST 1.1, irRECIST and iRECIST criteria." *Eur J Cancer* **88**: 38-47.

Thomas, R., G. Al-Khadairi, J. Roelands, W. Hendrickx, S. Dermime, D. Bedognetti und J. Decock (2018). "NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives." *Front Immunol* **9**: 947.

Topalian, S. L., F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G. D. Kollia, A. Gupta, J. M. Wigginton und M. Sznol (2012). "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." *N Engl J Med* **366**(26): 2443-2454.

Topalian, S. L., J. M. Taube, R. A. Anders und D. M. Pardoll (2016). "Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **16**(5): 275-287.

Tran, E., P. F. Robbins, Y. C. Lu, T. D. Prickett, J. J. Gartner, L. Jia, A. Pasetto, Z. Zheng, S. Ray, E. M. Groh, I. R. Kriley und S. A. Rosenberg (2016). "T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer." *N Engl J Med* **375**(23): 2255-2262.

Tran, E., S. Turcotte, A. Gros, P. F. Robbins, Y. C. Lu, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, R. P. Somerville, K. Hogan, C. S. Hinrichs, M. R. Parkhurst, J. C. Yang und S. A. Rosenberg (2014). "Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer." *Science* **344**(6184): 641-645.

Trzonkowski, P., M. Bieniaszewska, J. Juscinska, A. Dobyszyk, A. Krzystyniak, N. Marek, J. Mysliwska und A. Hellmann (2009). "First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells." *Clin Immunol* **133**(1): 22-26.

Tumeh, P. C., C. L. Harview, J. H. Yearley, I. P. Shintaku, E. J. Taylor, L. Robert, B. Chmielowski, M. Spasic, G. Henry, V. Ciobanu, A. N. West, M. Carmona, C. Kivork, E. Seja, G. Cherry, A. J. Gutierrez, T. R. Grogan, C. Mateus, G. Tomasic, J. A. Glaspy, R. O. Emerson, H. Robins, R. H. Pierce, D. A. Elashoff, C. Robert und A. Ribas (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* **515**(7528): 568-571.

Varani, M., S. Auletta, A. Signore und F. Galli (2019). "State of the Art of Natural Killer Cell Imaging: A Systematic Review." *Cancers (Basel)* **11**(7).

Vedvyas, Y., E. Shevlin, M. Zaman, I. M. Min, A. Amor-Coarasa, S. Park, S. Park, K. W. Kwon, T. Smith, Y. Luo, D. Kim, Y. Kim, B. Law, R. Ting, J. Babich und M. M. Jin (2016). "Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in survivors." *JCI Insight* **1**(19): e90064.

Verbi, W., M. F. Greaves, C. Schneider, K. Koubek, G. Janossy, H. Stein, P. Kung und G. Goldstein (1982). "Monoclonal antibodies OKT 11 and OKT 11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocyte "receptors." *Eur J Immunol* **12**(1): 81-86.

Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken und C. Reutelingsperger (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.

Waaiker S., D. Giesen, T. Ishiguro, Y. San, N. Sugaya, C. P. Schröder, E. G. E. de Vries und M. N. Lub-de Hooge (2020). "Preclinical PET imaging of bispecific antibody ERY974 targeting CD3 and glypican 3 reveals that tumor uptake correlates to T cell infiltrate." *J Immunother Cancer* **8**(1): e000548.

Wahl, R. L., H. Jacene, Y. Kasamon und M. A. Lodge (2009). "From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors." *J Nucl Med* **50 Suppl 1**(Suppl 1): 122S-150S.

Waldman, A. D., J. M. Fritz und M. J. Lenardo (2020). "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice." *Nat Rev Immunol* **20**(11): 651-668.

Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson und J. A. Bluestone (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1**(5): 405-413.

Wang, X., C. Berger, C. W. Wong, S. J. Forman, S. R. Riddell und M. C. Jensen (2011). "Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice." *Blood* **117**(6): 1888-1898.

Wang, X., M. Mathieu und R. J. Brezski (2018). "IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions." *Protein Cell* **9**(1): 63-73.

Van Wauwe, J., J. Goossens, W. Decock, P. Kung und G. Goldstein (1981). "Suppression of human T-cell mitogenesis and E-rosette formation by the monoclonal antibody OKT11A." *Immunology* **44**(4): 865-871.

Van Wauwe, J. P., J. R. De Mey und J. G. Goossens (1980). "OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties." *J Immunol* **124**(6): 2708-2713.

Wculek S. K., F. J. Cueto, A. M. Mujal, I. Melero, M. F. Krummel und D. Sancho (2020). "Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **20**(1): 7-24.

Weber, J. S., J. C. Yang, M. B. Atkins und M. L. Disis (2015). "Toxicities of Immunotherapy for the Practitioner." *J Clin Oncol* **33**(18): 2092-2099.

Weiner, G. J. (2007). "Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer." *Immunol Res* **39**(1-3): 271- 278.

Westin, J. R., F. Chu, M. Zhang, L. E. Fayad, L. W. Kwak, N. Fowler, J. Romaguera, F. Hagemester, M. Fanale, F. Samaniego, L. Feng, V. Baladandayuthapani, Z. Wang, W. Ma, Y. Gao, M. Wallace, L. M. Vence, L. Radvanyi, T. Muzzafar, R. Rotem-Yehudar, R. E. Davis und S. S. Neelapu (2014). "Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial." *Lancet Oncol* **15**(1): 69-77.

Williams, M. B. und E. C. Butcher (1997). "Homing of naïve and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen." *J Immunol* **159**(4): 1746-1752.

Wolchok, J. D., A. Hoos, S. O'Day, J. S. Weber, O. Hamid, C. Lebbe, M. Maio, M. Binder, O. Bohnsack, G. Nichol, R. Humphrey und F. S. Hodi (2009). "Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria." *Clin Cancer Res* **15**(23): 7412-7420.

- Wong, A. N. M., G. A. McArthur, M. S. Hofman und R. J. Hicks (2017). "The Advantages and Challenges of Using FDG PET/CT for Response Assessment in Melanoma in the Era of Targeted Agents and Immunotherapy." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **44**(Suppl 1): 67-77.
- Woo, S. R., M. E. Turnis, M. V. Goldberg, J. Bankoti, M. Selby, C. J. Nirschl, M. L. Bettini, D. M. Gravano, P. Vogel, C. L. Liu, S. Tangsombatvisit, J. F. Grosso, G. Netto, M. P. Smeltzer, A. Chaux, P. J. Utz, C. J. Workman, D. M. Pardoll, A. J. Korman, C. G. Drake und D. A. Vignali (2012). "Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape." *Cancer Res* **72**(4): 917-927.
- Wu, A. und T. Olafsen (2008). "Antibodies for molecular imaging of cancer." *Cancer J* **14**(3): 191-197.
- Wu, A. (2009). "Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET." *J Nucl Med* **50**(1): 2-5.
- Xing, Y., G. Chand, C. Liu, G. J. R. Cook, J. O'Doherty, L. Zhao, N. C. L. Wong, L. K. Meszaros, H. H. Ting und J. Zhao (2019). "Early Phase I Study of a (99m)Tc-Labeled Anti-Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Single-Domain Antibody in SPECT/CT Assessment of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer." *J Nucl Med* **60**(9): 1213-1220.
- Xu, Y., D. Kolber-Simonds, J. A. Hope, H. Bazin, D. Latinne, R. Monroy, M. E. White-Scharf und H. J. Schuurman (2004). "The anti-CD2 monoclonal antibody BTI-322 generates unresponsiveness by activation-associated T cell depletion." *Clin Exp Immunol* **138**(3): 476-483.
- Yamada, N., S. Oizumi, E. Kikuchi, N. Shinagawa, J. Konishi-Sakakibara, A. Ishimine, K. Aoe, K. Gemba, T. Kishimoto, T. Torigoe und M. Nishimura (2010). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection." *Cancer Immunol Immunother* **59**(10): 1543-1549.
- Ying, Z., X. F. Huang, X. Xiang, Y. Liu, X. Kang, Y. Song, X. Guo, H. Liu, N. Ding, T. Zhang, P. Duan, Y. Lin, W. Zheng, X. Wang, N. Lin, M. Tu, Y. Xie, C. Zhang, W. Liu, L. Deng, S. Gao, L. Ping, X. Wang, N. Zhou, J. Zhang, Y. Wang, S. Lin, M. Mamuti, X. Yu, L. Fang, S. Wang, H. Song, G. Wang, L. Jones, J. Zhu und S. Y. Chen (2019). "A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy." *Nat Med* **25**(6): 947-953.
- Young, H., R. Baum, U. Cremerius, K. Herholz, O. Hoekstra, A. A. Lammertsma, J. Pruim und P. Price (1999). "Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group." *Eur J Cancer* **35**(13): 1773-1782.
- Yssel, H., J. P. Aubry, R. de Waal Malefijt, J. E. de Vries und H. Spits (1987). "Regulation by anti-CD2 monoclonal antibody of the activation of a human T cell clone induced by anti-CD3 or anti-T cell receptor antibodies." *J Immunol* **139**(9): 2850-2855.
- Yusufi, N., S. Mall, H. O. Bianchi, K. Steiger, S. Reder, R. Klar, S. Audehm, M. Mustafa, S. Nekolla, C. Peschel, M. Schwaiger, A. M. Krackhardt und C. D'Alessandria (2017). "In-depth Characterization of a TCR-specific Tracer for Sensitive Detection of Tumor-directed Transgenic T Cells by Immuno-PET." *Theranostics* **7**(9): 2402-2416.
- Zaretsky, J. M., A. Garcia-Diaz, D. S. Shin, H. Escuin-Ordinas, W. Hugo, S. Hu-Lieskovan, D. Y. Torrejon, G. Abril-Rodriguez, S. Sandoval, L. Barthly, J. Saco, B. Homet Moreno, R. Mezzadra, B. Chmielowski, K. Ruchalski, I. P. Shintaku, P. J. Sanchez, C. Puig-Saus, G. Cherry, E. Seja, X. Kong, J. Pang, B. Berent-Maoz, B. Comin-Anduix, T. G. Graeber, P. C. Tumeh, T. N. Schumacher, R. S. Lo und A. Ribas (2016). "Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma." *N Engl J Med* **375**(9): 819-829.

Zettlitz, K. A., R. Tavaré, W. K. Tsai, R. E. Yamada, N. S. Ha, J. Collins, R. M. van Dam, J. M. Timmerman und A. M. Wu (2019). "(18)F-labeled anti-human CD20 cys-diabody for same-day immunoPET in a model of aggressive B cell lymphoma in human CD20 transgenic mice." Eur J Nucl Med Mol Imaging **46**(2): 489-500.

Zou, W. und L. Chen (2008). "Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment." Nat Rev Immunol **8**(6): 467-477.

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.** Überblick über onkologische Immuntherapien.

**Abbildung 2.** Anforderungen an T-Zell-Tracer im Kontext von Immuntherapien.

**Abbildung 3.** Isolation von  $CD8^+CD62L^+CD45RO^+CD45RA^-$   $T_{CM}$ .

**Abbildung 4.** Transduktion von  $T_{CM}$ .

**Abbildung 5.** Gating-Strategie zur Untersuchung auf Zellapoptose.

**Abbildung 6.** Untersuchung des T-Zell-Proliferationsverhaltens mittels CTV-Zellfärbung.

**Abbildung 7.** Zeitliche Abfolge der *in vivo*-Funktionalitätsexperimente.

**Abbildung 8.** Expression von CD2 und CD7 auf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zweier Spender.

**Abbildung 9.** Bindung der getesteten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD7 an ihre Zielzellen.

**Abbildung 10.** Untersuchung von anti-CD2 Antikörpern hinsichtlich Apoptoseinduktion und  $IFN\gamma$ -Produktion.

**Abbildung 11.** Untersuchung eines anti-CD7 Nanobodys bezüglich Apoptoseinduktion und  $IFN\gamma$ -Produktion.

**Abbildung 12.** Untersuchung des Proliferationsverhaltens von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und  $F(ab')_2$ .

**Abbildung 13.** Untersuchung des Proliferationsverhaltens von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und  $F(ab')_2$  für einen weiteren Spender.

**Abbildung 14.**  $IFN\gamma$ -Konzentrationen bei Proliferation von PBMC abgeleiteter T-Zellen unter Koinkubation mit OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-IgG und  $F(ab')_2$ .

**Abbildung 15.** Zytotoxizität aktivierter T-Zellen unter Koinkubation mit ML2-Tumorzellen und T3-3A1 (anti-CD7) und OKT11 (anti-CD2)-IgG und  $F(ab')_2$ .

**Abbildung 16.** T-Zell-Analyse bei der Untersuchung von T3-3A1 (anti-CD7) und OKT11 (anti-CD2)-IgG und  $F(ab')_2$  hinsichtlich ihres Einflusses auf die T-Zell-Zytotoxizität.

**Abbildung 17.** Tumorwachstum der ML2-B7 Tumoren im Modell eines adoptiven T-Zell-Transfers unter OKT11 (anti-CD2), T3-3A1 (anti-CD7) bzw. Isotyp- $F(ab')_2$ .

**Abbildung 18.** Expression von CD2 und CD7 auf tumorinfiltrierenden T-Zellen.

**Abbildung 19.** Tumorgröße und -endgewicht der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)- $F(ab')_2$  Fragmenten bei verzögerter T-Zell-Injektion.

**Abbildung 20.**  $IFN\gamma$ -Serumkonzentrationen 48 Stunden nach Injektion von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)- $F(ab')_2$  Fragmenten im Rahmen der *in vivo*-Funktionalitätstestung unter verzögerter T-Zell-Injektion.

**Abbildung 21.** T-Zell-Analyse der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)- $F(ab')_2$  Fragmenten nach verzögerter T-Zell-Injektion.

**Abbildung 22.** Tumorzell-Analyse der *in vivo*-Funktionalitätstestung von OKT11 (anti-CD2) und T3-3A1 (anti-CD7)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten bei verzögerter T-Zell-Injektion.

**Abbildung 23.** PET/CT-Bilder *in vivo* mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten.

**Abbildung 24.** *In vivo*-T-Zell-Bildgebung mit <sup>89</sup>Zr-OKT11 (anti-CD2)-F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern der AG Prof. Krackhardt und Kooperationspartnern, an erster Stelle dir liebe Angela, für deine großartige Betreuung und Unterstützung, dass du mich ins wissenschaftliche Denken eingeführt hast und so deine Begeisterung für die Forschung auf mich übergesprungen ist. Und dafür, dass du mich zu diesem Projekt gebracht hast und damit auch zu den vielen wunderbaren Menschen, mit denen ich täglich zusammenarbeiten durfte. Dabei durfte ich so unglaublich viel fachlich, aber auch für mein weiteres Leben lernen, vielen herzlichen Dank dafür!

### **DANKE**

An dich, liebe Sabine, für deinen Einsatz und deine Unterstützung v. a. für das Paper!

An dich, liebe Eva, für deine stets so hilfbereite und herzliche Art, die mich immer motiviert hat!

An dich, lieber Stefan, dass ich bei Fragen und Anliegen jeder Art immer auf dich zählen konnte!

An dich, lieber Henrique, dass ich mich in die Laborarbeit eingeführt hast und mich so mit den wichtigsten praktischen Skills ausgestattet hast!

An dich, liebe Riccarda, dass ich von dir den Apoptose-Assay lernen durfte und du immer offen für Fragen warst!

An dich, liebe Gaia, dass wir gemeinsam viel Spaß hatten und du immer für alles ein offenes Ohr hattest!

An dich, lieber Calogero, für dein wertvolles Wissen, das du immer bereits warst zu teilen!

An dich, liebe Nahid, für die gute Zusammenarbeit und deine für diese Arbeit so wichtige Beteiligung an den Bildgebungsversuchen!

An dich, lieber Dario, für deine Hilfe bei den in vivo-Experimenten und die vielen damit verbundenen Stunden, die mit dir nie langweilig waren!

An dich, liebe Lisa, für deine große Motivation und Begeisterung, die wir teilen durften!

Mein abschließender Dank gilt

meinen Eltern

und

meiner Schwester,

die all meine Vorhaben bedingungslos unterstützen und immer für mich da sind.