

Charakterisierung eines gegen die murine konstante Kette
hybrider T Zell-Rezeptoren (TZR) gerichteten Antikörpers
(aTZRmu-IgG) und seines F(ab')₂-Fragments im Hinblick auf
Einflüsse auf Funktion und Depletion humaner T Zellen,
transgen für einen tumorspezifischen human-murin-hybriden
TZR

Ricarda Anneli Christina Wagner

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Angela M. Krackhardt
2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 02.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.04.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Immuntherapie von Tumoren	6
1.1.1	Adoptiver Zell-Transfer von NK-Zellen	7
1.1.2	Adoptiver Zell-Transfer von T Zellen	8
1.1.3	Nebenwirkungsprofil des adoptiven Zell-Transfers	10
1.1.4	Ansätze zur Verbesserung der Sicherheit des Rezeptor-Transfers	11
1.2	Nicht-invasive Bildgebungstechniken für T Zellen in vivo	12
1.2.1	Immuno-PET/CT Bildgebung transgener T Zellen in vivo	13
1.2.2	Immuno-PET/CT Bildgebung transgener, humaner T Zellen in vivo	13
2	Ziel dieser Studie	14
3	Material	15
3.1	Technische Ausstattung	15
3.2	Verbrauchsgüter	16
3.3	Reagenzien und Chemikalien	17
3.4	Vorgefertigte Produktketten (Kits).....	19
3.5	Zytokine	19
3.6	Antikörper und Reagenzien in der Durchflusszytometrie	20
3.6.1	Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angewendet in der Durchflusszytometrie	20
3.6.2	Fluorochrom-gekoppelte Reagenzien angewendet in der Durchflusszytometrie	20
3.7	Puffer	21
3.8	Medien	22
3.9	Zelllinien	22
3.10	Software.....	23
4	Methoden.....	24
4.1	Allgemeine Arbeiten mit Zellen.....	24
4.1.1	Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Zellen	24
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
4.1.3	Zellzählung.....	24
4.2	Kultivierung von Zelllinien	24
4.3	Aufreinigung primärer Zellen	25
4.3.1	Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	25
4.3.2	Isolation und Aufreinigung CD8+ CD62L+ CD45RA- T _{cm}	25
4.3.3	Aktivierung primärer Zellen.....	25
4.4	Retrovirale Transduktion primärer Zellen	26

4.4.1	Herstellung von Virus-Partikeln.....	26
4.4.2	Transduktion aktivierter primärer Zellen (PBMC oder T _{cm}).....	26
4.4.3	Kultivierung von PBMC und T _{cm}	26
4.5	Ausschluss viraler RNA im Kulturmedium vor Abstufung auf die Sicherheitsstufe S1.....	27
4.5.1	Aufreinigung viraler RNA aus Kulturmedium	27
4.5.2	cDNA-Synthese viraler RNA.....	27
4.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
4.5.4	Agarose-Gel-Elektrophorese	28
4.5.5	Abstufung auf Sicherheitsstufe S1.....	28
4.6	Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting).....	28
4.6.1	Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	28
4.6.2	Apoptose-Bestimmung.....	28
4.6.3	Proliferations-Bestimmung	29
4.7	Aufreinigung, Fragmentierung und Umpufferung des aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') ₂	29
4.7.1	Aufreinigung des aTZRmu-IgG und F(ab') ₂ -Fragmentierung	29
4.7.2	Umpufferung	29
4.8	Stimulation durch aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') ₂ in vitro	30
4.8.1	Stimulationsansätze	30
4.8.2	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ELISA) 30	
4.8.3	Durchflusszytometrie-basierte Zytotoxizitäts-Testung	30
4.9	Tiermodell	31
4.9.1	Adoptiver T _{cm} -Transfer	31
4.9.2	Ganzkörperbestrahlung.....	31
4.9.3	Stimulation durch aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') ₂ in vivo.....	31
4.9.4	Blutentnahme aus der Vena facialis.....	32
4.9.5	Ex vivo-Analyse - Biodistribution	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Auswahl des Antikörpers.....	33
5.1.1	Verwendete Varianten des aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') ₂	33
5.1.2	F(ab') ₂ -Reinheit.....	34
5.2	Zellcharakterisierung.....	34
5.3	Stimulation in vitro	36
5.3.1	Apoptose	36
5.3.2	Proliferation.....	39
5.3.4	Funktionalität	41
5.3.5	Aktivierung	43

5.3.6	Apoptose und Aktivierung mit Antikörpern und deren Derivaten in PBS	44
5.4	Stimulation in vivo	45
5.4.1	Versuchsaufbau der Stimulation in vivo.....	45
5.4.2	Spezifische Depletion TZR 2.5D6-iRFP+ T _{cm} durch aTZRmu-IgG in vivo.....	47
5.4.3	aTZRmu-F(ab') ₂ ohne Auswirkung auf TZR 2.5D6-iRFP+ T _{cm} in vivo	50
5.4.4	TZR-Dichte als Einflussfaktor für das Überleben transgener T _{cm} nach aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ -Behandlung in vivo	53
6	Diskussion.....	56
6.1	Antikörper-Bindung transgener T Zellen im adoptiven Zell-Transfer	56
6.2	aTZRmu-IgG-Bindung humaner transgener T Zellen in vitro.....	56
6.3	aTZRmu-F(ab') ₂ -Bindung humaner transgener T Zellen in vitro	58
6.4	aTZRmu-IgG- und aTZRmu-(Fab') ₂ -Bindung humaner transgener T Zellen in vivo	59
6.5	Anwendungsmöglichkeit des aTZRmu-F(ab') ₂ in der Immuno-PET/CT Bildgebung	60
6.6	Aspekte einer potentiellen klinischen Translation der ⁸⁹ Zr-aTZRmu-F(ab') ₂ -basierten Bildgebungsmethode	62
7	Zusammenfassung.....	63
8	Literaturverzeichnis.....	64
9	Danksagung	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil residuellen Vollantikörpers in den aTZRmu-F(ab') ₂ -Präparationen.....	34
Abbildung 2: Charakterisierung TZR 2.5D6-transduzierter PBMC.....	35
Abbildung 3: Charakterisierung TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T _{cm}	35
Abbildung 4: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm}	36
Abbildung 5: Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T _{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P2 in vitro.....	37
Abbildung 6: Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h bzw. 3d Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P3 in vitro.....	38
Abbildung 7: Proliferation TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h bzw. 3d Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P3 in vitro.....	40
Abbildung 8: Funktionalität TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen in vitro.....	42
Abbildung 9: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T _{cm} und PBMC nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P3 in vitro.....	43
Abbildung 10: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P4 in vitro nach Umpufferung aller Antikörper bzw. F(ab') ₂ -Präparate.....	44
Abbildung 11: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} nach 5min Inkubation mit aTZRmu-IgG in den genannten Konzentrationen in vitro.....	45
Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Analyse des Einflusses von aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ auf TZR 2.5D6-iRFP-transduzierte CD8+ T _{cm} in vivo.....	46
Abbildung 13: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} für das erste in vivo-Experiment (ivE-1) in vitro.....	47
Abbildung 14: Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG ex vivo.....	49
Abbildung 15: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} für das zweite in vivo-Experiment (ivE-2) in vitro.....	50
Abbildung 16: Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P4 ex vivo.....	52
Abbildung 17: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} nach Transduktion mit T293 oder RD114.....	53
Abbildung 18: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} für das dritte in vivo-Experiment (ivE-3) in vitro.....	54
Abbildung 19: Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T _{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') ₂ P6 ex vivo.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Ausstattung	15
Tabelle 2: Verbrauchsgüter	16
Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien	17
Tabelle 4: Vorgefertige Produktketten (Kits)	19
Tabelle 5: Zytokine	19
Tabelle 6: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angewendet in der Durchflusszytometrie	20
Tabelle 7: Fluorochrom-gekoppelte Reagenzien angewendet in der Durchflusszytometrie	20
Tabelle 8: Puffer	21
Tabelle 9: Medien	22
Tabelle 10: Zelllinien	22
Tabelle 11: Software	23
Tabelle 12: Details zu aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') ₂	33
Tabelle 13: aTZRmu-F(ab') ₂ -Präparationen.....	34
Tabelle 14: Beobachtung der Versuchstiere in ivE-1	48

1 Einleitung

1.1 Immuntherapie von Tumoren

Krebserkrankungen (bösartige Neubildungen) waren im Jahr 2020 in Deutschland für 231.271 Sterbefälle verantwortlich. Damit sind Neubildungen, hinter den Erkrankungen des Kreislaufsystems, weiterhin die zweithäufigste Todesursache in Deutschland mit steigender Tendenz. (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2022)

Bei einer geschätzten Anzahl von 498.000 Neuerkrankungen im Jahr 2018 in Deutschland, rechnen Prognosen mit einem Anstieg der jährlichen Krebsneuerkrankungen um 23% zwischen 2015 und 2030 vor allem aufgrund der demografischen Entwicklung der deutschen Gesellschaft (Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2021). Insbesondere Karzinome weisen im höheren Lebensalter eine zunehmende Inzidenz auf, die gemäß der molekularen Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung auf der im Alter zunehmenden Akkumulation genetischer Regulationsstörungen vor allem der Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen basiert (Böcker, Denk et al. 2012 S.139-155). Derartige genetische Veränderungen werden begleitet von einer Expression tumorassoziierter Antigene, die beispielsweise tumorspezifisch veränderten Genprodukten von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen oder einer tumorassozierten Überexpression regulärer zellulärer Proteine entsprechen (Böcker, Denk et al. 2012 S.141-155; Van der Bruggen, Traversari et al. 1991) und die eine Erkennung und Kontrolle der Pathologie durch das Immunsystem ermöglichen könnten, entsprechend dem Konzept der immunologischen Überwachung von Tumoren (Immunosurveillance), wie es unter anderem von Burnet entwickelt wurde (Burnet 1970). Allerdings kann die genetische Instabilität und Vielfalt maligne transformierter Zellen (Lengauer, Kinzler et al. 1998) zum Verlust tumorassoziierter Antigene führen und durch diese reduzierte Immunogenität können Tumorzellen der Immunosurveillance entkommen (Tumor Escape). Derartige komplexe Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem werden aktuell als „Immunoediting“ diskutiert, das die Rolle des Immunsystems sowohl bei der Tumorüberwachung als auch der Selektion nicht-immunogener Tumorzellen beschreibt. (Dunn, Bruce et al. 2002)

Mit wachsendem Verständnis der tumorassozierten Immunreaktion wurde eine große Bandbreite immuntherapeutischer Strategien für die Behandlung von Patienten mit Tumorerkrankungen durch eine gesteigerte Effektivität des Immunsystems entwickelt:

- **Immunmodulierende Zytokine** wie Interferon- α (IFN α) oder Interleukin-2 (IL-2) werden eingesetzt, um das Immunsystem unter anderem im Hinblick auf die Immunosurveillance von Tumoren zu stimulieren. Hier stehen Modulationen der Pharmakokinetik und -dynamik im Fokus, um Limitationen durch die hohe Toxizität zu umgehen, während eine Verbesserung der klinischen Wirksamkeit auch insbesondere in der Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren angestrebt wird. (Berraondo, Sanmamed et al. 2019; Lasfar, Gogas et al. 2016)
- **Immuncheckpoint-Inhibitoren** wie anti-CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), anti-PD1 (programmed cell death protein 1) und anti-PD-L1 (programmed cell death protein-Ligand 1) verstärken die T Zell-vermittelte Zytotoxizität in der Immunosurveillance von Tumoren (Postow, Callahan et al. 2015; Vaddepally, Kharel et al. 2020). Das TZR-Signal nach Antigen-Kontakt auf entsprechendem Humanen Leukozytenantigen (HLA) kann eine T Zell-Aktivierung auslösen, wenn kostimulatorische Signale durch beispielsweise CD28-B7-Interaktion gegenüber inhibitorischen Signalen wie CTLA4-B7-Interaktion überwiegen (Schneider, Downey et al. 2006). Die Blockade von CTLA4 durch Ipilimumab, einen humanisierten monoklonalen anti-CTLA4-Antikörper, verlängerte das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem Melanom (Hodi, O'Day et al. 2010; Robert, Thomas et al. 2011). Nach der Eratzulassung von Ipilimumab für fortgeschrittene maligne Melanome hat die U. S. Food and Drug Administration (FDA) mittlerweile auch in der Therapie fortgeschrittener Nierenzellkarzinome und selektiver metastasierter kolorektaler Karzinome Ipilimumab in

Kombination mit Nivolumab zugelassen (Vaddepally, Kharel et al. 2020). Als anti-PD1-Antikörper ist Nivolumab unter anderem gegen immunsupprimierende PD1/PD-L1-Interaktionen zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Tumorzellen gerichtet (Topalian, Hodi et al. 2012), in denen vermehrt PD1 bzw. PD-L1 nachgewiesen wurde (Ahmadzadeh, Johnson et al. 2009; Sfanos, Bruno et al. 2009; Thompson, Kuntz et al. 2006). Die Wirkung Nivolumabs sowie weiterer anti-PD1- und anti-PD-L1-Antikörper wurde in mehreren klinischen Studien gegen verschiedene Tumorentitäten gezeigt (Topalian, Hodi et al. 2012; Borghaei, Paz-Ares et al. 2015; Brahmer, Reckamp et al. 2015; Robert, Ribas et al. 2014; Ribas, Puzanov et al. 2015; Schachter, Ribas et al. 2017; Migden, Rischin et al. 2018; Kaufman, Russel et al. 2016; Powles, O'Donnell et al. 2017; Necchi, Joseph et al. 2017). Daneben wurden multiple neue, mögliche Zielstrukturen identifiziert (Chihara, Madi et al. 2018). Hierzu gehören koinhibitorische Moleküle, wie das auf T Zellen exprimierte Tim3 oder das auf Tumorzellen exprimierte CD47, das neben der Rolle der T Zellen auch die Rolle der Makrophagen ins Blickfeld zieht (Advani, Flinn et al. 2018) ebenso wie ergänzende kostimulatorische Rezeptoren wie CD137/4-1BB und CD134/OX40, die zur Stimulation von T Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beitragen können (Turaj, Cox et al. 2018). Die Modulation derartiger Zielstrukturen wird unter anderem in der Tumorthherapie in multiplen präklinischen und klinischen Studien erprobt, häufig in verschiedenen Kombinationen (Advani, Flinn et al. 2018; Hernandez-Chacon, Li et al. 2011; Curti, Kovacsovic-Bankowski et al. 2013).

- Eine Methode um spezifisch gegen tumorassoziierte Antigene gerichtete Immunreaktionen hervorzurufen ist die **Impfung** mit einem oder einer Kombination an Zielstrukturen, deren Administration auf Zellbasis, in Form von Proteinen und Peptiden oder mittels dem kodierenden Material in Gestalt von DNA oder RNA, unter anderem über virale Systeme, vorgeschlagen wurde. Um Nebenwirkungen zu reduzieren und die Wirksamkeit zu verbessern, versprechen im Zuge der Entwicklung der Sequenzierung der nächsten Generation personalisierte Impfstoffe gegen Neoantigene durch deren Entstehung durch somatische Mutationen in Tumorzellen eine verbesserte Spezifität unter Umgehung der zentralen Toleranz des Immunsystems im Vergleich zu bekannten tumorassoziierten Antigenen (Hu, Ott et al. 2018; Blass, Ott 2021) und zeigten in ersten klinischen Studien spezifische T Zell-Antworten (Hu, Leet et al. 2021; Sahin, Derhovanessian et al. 2017; Ott, Hu et al. 2017; Carreno, Magrini et al. 2015).
- Eine andere Herangehensweise besteht darin, die Effektorzellen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems unter anderem für eine spezifische Erkennung ausgewählter tumorassoziiertes Antigene in vitro aufzurüsten, im Sinne des **adoptiven Zell-Transfers** (adoptive cell transfer = ACT) (siehe 1.1.1 und 1.1.2).

1.1.1 Adoptiver Zell-Transfer von NK-Zellen

Als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems weisen NK-Zellen eine Kombination genetisch determinierter aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren auf, deren Wirkungsweisen in detaillierten Analysen verschiedene Wege der Erkennung von Tumorzellen zugunsten einer Immunosurveillance versprechen. So könnten aktivierende Rezeptoren, wie beispielsweise NKG2D (Natural killer group 2 D), durch auf Tumorzellen im Zusammenhang mit Stressfaktoren vermehrt exprimierte Liganden die NK-Zell-Aktivierung ebenso auslösen wie eine mangelnde Stimulation inhibitorischer Rezeptoren, wie beispielsweise KIR (Killer immunoglobulin-like receptors), die körpereigene Haupthistokompatibilitätskomplex-I-Moleküle (major histocompatibility complex = MHC), konkret HLA-A, -B und -C binden (Matosevic 2018), deren reduzierte Expression in einer Vielzahl an Tumorentitäten, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, Brustkrebs und Pankreaskarzinom, sowie im Rahmen von Immuntherapien bei metastasiertem Melanom als potentieller Tumor Escape-Mechanismus beobachtet wurden (Korkolopoulou, Kaklamanis et al. 1996; Cabrera, Angustias Fernandez et al. 1996; Pandha, Rigg et al. 2007; Restifo, Marincola et al. 1996). Ein allogenes Behandlungskonzept, bei dem nach Chemotherapie mit Fludarabin und Cyclophosphamid in

morphologischer oder kompletter Remission haploidente NK-Zell-Infusionen mit anschließenden IL-2 Injektionen kombiniert wurden, zeigte bei 9 von 16 erwachsenen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) ein erkrankungsfreies Überleben nach im Median 22,5 Monaten Nachsorge, wobei das Ansprechen mit der Größe des alloreaktiven NK-Zell-Repertoires korrelierte (Curti, Ruggeri et al. 2016). Die Relevanz autologer NK-Zellen wurde durch die Beobachtung angedeutet, dass sich bei Patienten mit Multiplem Myelom nach autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation die Anzahl an NK-Zellen im Blut frühzeitig regenerierte und eine größere Anzahl nach einem Monat mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert war (Rueff, Medinger et al. 2014). Allerdings konnte nach autologem adoptiven NK-Zell-Transfer bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen des Verdauungstraktes, metastasiertem Melanom, Nierenzellkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphomen, Morbus Hodgkin oder metastasiertem Brustkrebs entsprechend verschiedenen Protokollen bisher kein klinisches Ansprechen nachgewiesen werden (Sakamoto, Ishikawa et al. 2015; Parkhurst, Riley et al. 2011; Burns, Weisdorf et al. 2003). Die genetische Veränderung mit viralen Vektoren oder Virus-unabhängigen Systemen, wie Elektroporation, der häufig verwendeten NK-Zellen aus dem peripheren Blut verzögerte sich aufgrund anfänglich geringer Erfolgsraten im Gegensatz zu genetischen T Zell-Modifikationen (Boissel, Betancur et al. 2012). In einer der ersten klinischen Studien erhielten 11 Patienten mit fortgeschrittenen Non-Hodgkin-Lymphomen oder chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) nach lymphozytendepletierender Chemotherapie anti-CD19-CAR-NK-Zellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen und mit gegen CD19 gerichteten Chimären Antigen-Rezeptoren (CAR) retroviral transduziert wurden, und es zeigten 8 der Patienten ein Ansprechen ohne dass sich Hinweise auf erhöhte Zytokin-Serumlevel oder Neurotoxizität ergaben (Liu, Marin et al. 2020). Weiterhin wurde der Sicherheitstest der NK-Zelllinie NK-92, transduziert mit einem anti-CD33-CAR und bestrahlt vor Infusion im Rahmen einer klinischen Studie, publiziert (Tang, Yang et al. 2018) und weitere klinische Studien mit genetisch modifizierten NK-Zellen in der Immuntherapie von Tumoren sind absehbar.

1.1.2 Adoptiver Zell-Transfer von T Zellen

Im Sinne des adaptiven Immunsystems exprimieren die meisten T Zellen im peripheren Blut (>95%) $\alpha\beta$ -TZR, deren Spezifität erst im Rahmen der T Zell-Reifung im Thymus durch somatische Genumlagerungen (gene rearrangement) der TZR-Gene zu einer jeweils einzigartigen Konfiguration entsteht. Als Genprodukt wird die jeweils einzigartige, spezifische Bindetasche von den variablen Regionen der α - und β -Kette gemeinsam gebildet, sie kann ein jeweils passendes prozessiertes Antigen, wenn dieses auf HLA-Rezeptoren präsentiert wird, binden und daraufhin, abhängig von begleitenden kostimulatorischen Signalen, eine klonale Expansion und gerichtete Immunreaktion auslösen. (Mahe, Pugh et al. 2018)

Die große Vielfalt der TZR birgt das Potential eine Vielzahl tumorassoziiertes Antigene zu erkennen. Der Nachweis tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) in metastasierten Melanomen und ihrer Zytotoxizität für autologe Melanomzellen in vitro nach Expansion überwiegend CD3-positiver T Zellen (Muul, Spiess et al. 1987) bestätigte die Vermutung, dass derartige Tumor-T Zell-Interaktionen zumindest in einigen Patienten auch tatsächlich stattfinden. Nachfolgend konnte der klinische Nutzen eines adoptiven Zell-Transfers autologer, in vitro expandierter TIL in Patienten mit metastasiertem Melanom gezeigt werden (Rosenberg, Packard et al. 1988; Dudley, Yang et al. 2008; Dudley, Gross et al. 2010; Rosenberg, Yang et al. 2011).

Ebenso konnte die therapeutische Wirkung allogener Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) durch einen verstärkten Graft-versus-Leukemia-Effekt bei Patienten mit rezidivierender chronisch myeloischer Leukämie (CML) nach allogener Stammzelltransplantation gezeigt (Kolb, Mittermüller et al. 1990; Barrett, Mavroudis et al. 1998) und die zugrundeliegende zentrale Rolle der enthaltenen T Zellen identifiziert werden (Horowitz, Gale et al. 1990; Hofmann, Schmitt et al. 2019). Dieses Konzept findet heute in der Therapie Epstein-Barr-Virus (EBV) positiver Posttransplantations-lymphoproliferativer Erkrankung mittels Infusion EBV-spezifischer allogener T Zellen mit geeigneter HLA-Restriktion genannt Tabelecleucel (Ebvallo®) Anwendung (European Medicines Agency 2023 „Ebvallo“).

Jedoch zeigten die DLI deutlich geringere Erfolgsraten bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und anderen hämatologischen Erkrankungen (Collins, Shpilberg et al. 1997; Barrett, Mavroudis et al. 1998; Horowitz, Gale et al. 1990), richtungsweisend für die Übertragbarkeit beider Verfahren auf andere Tumorentitäten, für die bisher keine überzeugenden Therapieerfolge gezeigt werden konnten. In der Folge stieg das Interesse an genetischen Zellmodifikationen mit tumorspezifischen Rezeptoren, um ein breiteres Spektrum an Zielstrukturen und damit Tumorentitäten der adoptiven Zell-Transfer-Therapie zugänglich zu machen. (Heslop, Ng et al. 1996; Morgan, Dudley et al. 2006; Pule, Savoldo et al. 2008; Rosenberg 2011) Im Fokus stehen dabei vor allem klassische $\alpha\beta$ -TZR und CAR (Rosenberg 2011), deren codierende Gene unter anderem mittels viraler Vektoren in T Zellen transduziert werden können (Kay 2011). Ein CAR besteht aus dem extrazellulären variablen Fragment eines Einzelketten-Antikörpers und einer intrazellulären TZR-Signaldomäne (CD3 ζ), sowie kostimulatorischen Domänen wie CD28 (Finney, Lawson et al. 1998) oder 4-1BB (CD137) (Imai, Mihara et al. 2004) oder deren Kombination (Wang, Jensen et al. 2007). So können CAR-T Zellen extrazelluläre Oberflächenantigene von Tumorzellen erkennen, unabhängig von MHC-Rezeptoren. Vielversprechende Studienergebnisse zeigten autologe anti-CD19-CAR-T Zellen bei hämatoonkologischen Erkrankungen (Maude, Frey et al. 2014; Neelapu, Locke et al. 2017; Schuster, Svoboda et al. 2017; Maude, Laetsch et al. 2018; Locke, Ghobadi et al. 2019; Schuster, Bishop et al. 2019), weshalb die ersten zwei ihrer Vertreter 2018 nach den USA auch in Europa zugelassen wurden: Tisagenlecleucel (Kymriah[®]; früher CTL019) ist indiziert bei jungen Patienten im Alter bis zu 25 Jahren mit refraktärer oder rezidivierter akuter lymphatischer B Zell-Leukämie (ALL) sowie bei erwachsenen Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem diffus großzelligen B Zell-Lymphom (DLBCL) bzw. follikulärem Lymphom (FL), während Axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®]; früher KTE-C19) für die Behandlung erwachsener Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem diffus großzelligen B Zell-Lymphom (DLBCL), B Zell-Lymphom von hoher Malignität, primären mediastinalen B Zell-Lymphom und follikulärem Lymphom (FL) zugelassen wurde. (European Medicines Agency 2023 „Kymriah“ bzw. „Yescarta“) Mittlerweile ist auch Brexucabtagene autoleucel (Tecartus[®]) zur Behandlung erwachsener Patienten mit refraktärem oder rezidiviertem Mantelzelllymphom (MCL) sowie refraktärer oder rezidivierter akuter lymphatischer B Zell-Leukämie (ALL) im Alter von 26 Jahren und älter in Europa zugelassen, ebenso wie Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi[®]) zur Behandlung erwachsener Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem diffus großzelligen B Zell-Lymphom (DLBCL), B Zell-Lymphom von hoher Malignität, primären mediastinalen B Zell-Lymphom und follikulärem Lymphom Grad 3B (FL3B) (European Medicines Agency 2023 „Tecartus“ bzw. „Breyanzi“).

Weitere Oberflächenantigene von B Zell-Tumoren, wie CD22, CD20 und Immunoglobulin κ Leichtketten, sowie beispielsweise CD30 bei Morbus Hodgkin lösten als Zielstrukturen einer CAR- T Zell-Therapie ein variables Tumorsprechen in ersten klinischen Studien aus (Ramos, Savoldo et al. 2016; Zhang, Wang et al. 2016; Ramos, Ballard et al. 2017; Fry, Shah et al. 2018; Ramos, Grover et al. 2020). Als erste neue Zielstruktur einer autologen CAR-T Zelltherapie wurde das B Zell-Reifungsantigen (B cell maturation antigen = BCMA), erkannt durch idecabtagene vicleucel (Abecma[®]) und ciltacabtagene autoleucel (Carvykti[®]), in Europa zugelassen in der Therapie erwachsener Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplen Myelom (European Medicines Agency 2023 „Abecma“ bzw. „Carvykti“). Neben der Vielzahl klinischer Studien zur CAR-T Zelltherapie hämatoonkologischer Erkrankungen werden die Möglichkeiten und Einschränkungen der CAR-T Zelltherapie solider Tumoren intensiv untersucht, einschließlich einer Vielzahl klinischer Studien (Wang, Gauthier et al. 2023), beispielsweise bis hin zu Therapieoptionen für Hirntumore (Majzner, Ramakrishna et al. 2022).

Da sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre prozessierte Proteine als Peptide auf MHC-Rezeptoren präsentiert werden und so der Erkennung durch TZR zugänglich sind (Böcker, Denk et al. 2012 S.77-78), entsprechen diese einer wesentlich breiteren Auswahl an potentiellen Zielstrukturen für eine gerichtete Anti-Tumor-Reaktion mittels TZR. In ersten klinischen Studien konnte durch die retrovirale Transduktion und Re-Infusion autologer Lymphozyten mit TZR, die gegen das MART-1 Melanom Melanozyten Antigen gerichtet waren, in zwei der behandelten Patienten eine Rückbildung der Läsionen metastasierter Melanome (Morgan, Dudley et al. 2006), sowie im Verlauf eine klinische Wirksamkeit in Form von partiellen Remissionen bei sechs weiteren Patienten mit metastasiertem

Melanom beobachtet werden (Johnson, Morgan et al. 2009). Erste vielversprechende Ergebnisse in Form von partiellen oder kompletten Remissionen generierten zudem TZR gegen NY-ESO-1 in Patienten mit metastasiertem Melanom (11 von 20 Patienten), in einem Patienten anhaltend über einen Zeitraum von mindestens 58 Monaten (Robbins, Kassim et al. 2015), ebenso wie in Patienten mit Synovialsarkom (D'Angelo, Melchiori et al. 2018). Zudem konnte in einer Phase-1 Studie ein klinisches Ansprechen auf die Therapie mit autologen, transduzierten Lymphozyten mit TZR, gerichtet gegen das Wilms' Tumor 1 (WT1) – Antigen, in Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom gezeigt werden (Tawara, Kageyama et al. 2017). In weiteren Studien zeigte sich eine zentrale Bedeutung Protokoll-bedingter Einflussfaktoren auf Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil von TZR, unter anderem der Kryokonservierung der Zellpräparate und der Konditionierungsregime der Patienten (Chodon, Comin-Anduix et al. 2014, Kageyama, Ikeda et al. 2015, Ramachandran, Lowther et al. 2019).

1.1.3 Nebenwirkungsprofil des adoptiven Zell-Transfers

Mit der Steigerung der klinischen Wirksamkeit der transduzierten Rezeptoren können auch die Nebenwirkungen zunehmen, wie sich beispielsweise in der Verwendung eines TZR mit höherer Avidität für die Zielstruktur MART-1 mit konsekutivem Nachweis erhöhter Serumlevel des Zytokins Interferon- γ (IFN γ) bei den behandelten Patienten zeigte, neben einem deutlich besseren Therapieansprechen (Johnson, Morgan et al. 2009). Die Produktion großer Mengen entzündungsassoziierter Moleküle kann in Form des sogenannten Zytokin-Freisetzungssyndroms (Cytokine Release Syndrome = CRS) Fieber, arterielle Hypotonie, Dyspnoe, Organschäden und Koagulopathie verursachen und ist unter anderem die häufigste Nebenwirkung der CAR-T Zell-Therapie (Davila, Riviere et al. 2014; Hay, Hanafi et al. 2017; Neelapu, Locke et al. 2017; Maude, Laetsch et al. 2018). Dabei konnte die rasche Freisetzung verschiedener Zytokine, insbesondere von IL-1 und IL-6, in Mausmodellen neben aktivierten T Zellen auch deren Interaktion mit Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zugeordnet werden (Norelli, Camisa et al. 2018; Giavridis, van der Stegen et al. 2018). Gemeinsam oder im Anschluss an ein CRS wurden zudem neurologische Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen, Delir, Bewusstseins Einschränkungen, Krampfanfälle und Koma bis hin zu letaler Neurotoxizität beobachtet (Maude, Laetsch et al. 2018; Santomaso, Park et al. 2018), wobei deren Auftreten in einigen Fällen auch ohne das Vorliegen eines CRS beobachtet wurde (Gust, Hay et al. 2017). In der Studie von Gust et al. traten bei 40% der 133 mit anti-CD19-CAR-T Zellen behandelten Patienten neurologische Nebenwirkungen, in vier Fällen mit letalen Folgen auf. Die Genese dieser neurologischen Nebenwirkungen wurde nicht abschließend geklärt, jedoch wurden Hinweise für eine Zytokin-vermittelte endotheliale Aktivierung mit gestörter Blut-Hirn-Schranke und erhöhter Zytokin-Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit in möglicherweise kausalem Zusammenhang gefunden. (Gust, Hay et al. 2017; Santomaso, Park et al. 2018) Das Spektrum der neurologischen Nebenwirkungen wurde unter dem Überbegriff des Immuneffektorzell-assoziierten Neurotoxizitätssyndroms (ICANS) zusammengefasst (Lee, Santomaso et al. 2019).

Weitere Nebenwirkungen können aufgrund der Antigen-Spezifität der Rezeptoren auftreten, wobei die sogenannte „on-target, off-tumor“ und „off-target“ Toxizität unterschieden werden (Sun, Hao et al. 2018). Genetisch modifizierte T Zellen mit hoher Rezeptor-Avidität können auch geringe, physiologische Mengen eines nicht-mutierten Zielantigens, das auf Tumorzellen überexprimiert wird, detektieren und dadurch gesunde Zellen schädigen. Der MART-1-spezifische TZR mit höherer Avidität (DMF5) in der Studie von Johnson et al. verursachte, im Sinne einer derartigen „on-target, off-tumor“ Toxizität, eine Destruktion normaler Melanozyten in der Haut, den Augen und Ohren. (Johnson, Morgan et al. 2009)

Ein gegen Carcinoembryonales Antigen (CEA) gerichteter TZR wurde in der Behandlung dreier Patienten mit metastasiertem therapierefraktärem kolorektalen Karzinom verwendet, die alle eine Abnahme des CEA-Serumspiegels, sowie in einem Fall eine vorübergehende partielle Remission zeigten. Jedoch entwickelten alle Patienten eine schwere autoimmune Kolitis, ausgelöst durch die genetisch modifizierten T Zellen mit CEA-spezifischen TZR, die wahrscheinlich auch die geringen

Mengen CEA, die physiologischerweise auf der Mucosa des Colons präsentiert werden, erkannt haben, im Sinne dosislimitierender Nebenwirkungen. (Parkhurst, Yang et al. 2011)

Eine unvorhergesehene Kreuzreaktion mit physiologischen körpereigenen Peptiden, die zusätzlich zum Zielantigen erkannt werden, entspricht der „off-target“ Toxizität eines transduzierten Rezeptors (Sun, Hao et al. 2018). Dies wurde beispielsweise beobachtet bei TZR, gerichtet gegen MAGE-A3, aus der Genfamilie Melanom-assoziiertes Antigen (MAGE) der Gruppe A, deren Expression nur in Tumoren und dem Hoden bekannt war (Chomez, De Backer et al. 2001); nach einer Behandlung mit autologen anti-MAGE-A3-TZR-modifizierten T Zellen zeigten 5 von 9 Patienten eine klinische Regression ihrer metastasierten Tumore, allerdings entwickelten 3 Patienten neurologische Symptome, die sich bei 2 Patienten in eine letztendlich letale Gehirnschädigung fortsetzten, weil der eingesetzte TZR das verwandte Epitop MAGE-A12 erkannte, dessen zerebrale Expression ebenfalls erst im Zuge der Ergebnisaufarbeitung bekannt wurde (Morgan, Chinnasamy et al. 2013).

Im Zuge einer anderen klinischen Studie konnte die Kreuzreaktivität eines anti-MAGE-A3-TZR mit gesteigerter Affinität gegen ein nicht verwandtes Peptid des Proteins Titin präsentiert auf aktiven Kardiomyozyten aufgedeckt werden, die bei den ersten beiden mit den modifizierten T Zellen behandelten Patienten einen letalen, kardiogenen Schock auslöste (Linette, Stadtmauer et al. 2013).

Neben dem Erhalt und der Optimierung der klinischen Wirksamkeit genetisch modifizierter T Zellen, die in den meisten genannten klinischen Studien gezeigt wurde (u.a. Johnson, Morgan et al. 2009; Davila, Riviere et al. 2014; Neelapu, Locke et al. 2017; Maude, Laetsch et al. 2018; Parkhurst, Yang et al. 2011; Morgan, Chinnasamy et al. 2013) ist daher die Reduktion und das Management der Nebenwirkungen entscheidend.

Bei der Auswahl des Zielantigens einer gerichteten adoptiven T Zell-Therapie würde das ‚ideale Antigen‘ ausschließlich auf malignen Zellen exprimiert werden oder alternativ dessen physiologische Expression auf nicht überlebensnotwendige Gewebe beschränkt sein, deren Destruktion kompensierbar wäre, wie im Falle der B Zell-Aplasie in Folge der gegen CD19 gerichteten CAR-T Zell-Therapie (Kalos, Levine et al. 2011; Grupp, Kalos et al. 2013). Daneben ist die Minimierung des Risikos von Kreuzreaktivitäten sowie Handlungsoptionen in unvorhergesehenen Fällen von großer Bedeutung. Derzeit gibt es verschiedene Ansätze die Sicherheit des Rezeptor-Transfers zu verbessern:

1.1.4 Ansätze zur Verbesserung der Sicherheit des Rezeptor-Transfers

Primär ist die korrekte Expression des Rezeptors erforderlich, insbesondere im Falle klassischer TZR. Durch Fehlpaarungen transduzierter α - oder β -TZR-Ketten mit endogenen TZR-Ketten können Rezeptoren mit unvorhersehbarer Neoreaktivität entstehen (Van Loenen, de Boer et al. 2010; Bendle, Linnemann et al. 2010), während die zielgerichtete Anti-Tumor-Reaktivität der transduzierten T Zellen herabgesetzt werden kann (Voss, Kuball et al. 2006). Genetische Modifikationen des verwendeten TZR-Konstruktes sollen dessen korrekte Oberflächenexpression in den transduzierten T Zellen erhöhen. Durch die sogenannte ‚Murinisierung‘ humaner TZR durch den Austausch der humanen konstanten Region durch das murine Gegenstück ebenso wie die Ergänzung einer zusätzlichen Disulfid-Brücke zwischen den konstanten Ketten konnten Fehlpaarungen zugeführter und endogener TZR-Ketten und damit das Risiko für Kreuzreaktivitäten reduziert und die TZR-Expression und damit Avidität und Wirksamkeit erhöht werden (Cohen, Zhao et al. 2006; Cohen, Li et al. 2007; Kuball, Dossett et al. 2007).

Wenn jedoch unvorhergesehene Nebenwirkungen, wie beispielsweise die genannten Kreuzreaktivitäten, auftreten, ist es notwendig die Aktivität bereits transfundierter Zellen kontrollieren zu können, im Sinne einer Notausgangsstrategie. Ein vielversprechender Ansatz basiert auf der induzierbaren Caspase 9 (iCasp9), einem modifizierten humanen Protein der intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Kette, bestehend aus zwei inaktiven Bausteinen, deren Dimerisierung die iCasp9 aktiviert und Apoptose durch DNA-Fragmentierung induziert. Die Verabreichung eines anderweitig inerten synthetischen Induktionsmoleküls löst selektiv in genetisch modifizierten Zellen, die Träger des sogenannten Suizid-Gens den Bausteinen für iCasp9 sind, deren Dimerisierung und

damit die Apoptose aus, wie in ersten klinischen Studien mit entsprechend genetisch modifizierten T Zell-Infusionen im Rahmen haploidenter hämatopoetischer Stammzelltransplantationen im Falle unerwünschter Graft-versus-Host-Effekte erfolgreich gezeigt wurde. (Di Stasi, Tey et al. 2011; Zhou, Dotti et al. 2015)

Die iCasp9 zeigt deutliche Vorteile in der klinischen Applizierbarkeit der Suizid-Gene im Vergleich zu deren ältestem bekannten Vertreter der Herpes simplex Virus 1-Thymidin-Kinase (HSV1-TK), deren Anwendung durch ihre Immunogenität, Aktivierung durch das auch in der Therapie viraler Infektionen relevante Ganciclovir und die auf teilungsaktive Zellen begrenzte Wirkung beschränkt ist (Morgan 2012; Moolten 1986). Derzeit adressiert werden weiterhin bestehende Herausforderungen der klinischen Applikation iCasp9-basierter Suizid-Gene, unter anderem im Hinblick auf den kombinierten genetischen Transfer und die korrekte Expression eines gerichteten, tumorspezifischen Rezeptors und eines Suizid-Gens (Stavrou, Philip et al. 2018; Duong, Collinson-Pautz et al. 2018).

Als alternative Notausgangsstrategie könnten genetische Modifikationen dahingehend ergänzt werden, dass sie die Expression eines Antigens an der Zelloberfläche umfassen, dessen spezifische Erkennung durch Antikörper zur selektiven Depletion der markierten Zellen führt. In dieser Funktion ausführlich getestet wurde CD20, das durch den klinisch zugelassenen therapeutischen Antikörper Rituximab detektiert werden kann, der Komplement-abhängig eine Zell-Lyse induziert (Introna, Barbui et al. 2000; Serafini, Manganini et al. 2004; Griffioen, van Egmond et al. 2009). Ein neueres Konstrukt (RQR8), bestehend aus den Epitopen von CD20 und CD34, wurde entwickelt, um die Funktion von CD20 als Suizid-Gen mit der Möglichkeit einer CD34-basierten Selektion und Markierung transduzierter Zellen zu kombinieren (Philip, Kokalaki 2014). Ebenso wurde ein gekürztes Polypeptid des humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor = EGFR) als Zielstruktur des klinisch zugelassenen Antikörpers Cetuximab für Selektion, Depletion und Markierung transduzierter Zellen untersucht, wobei unter anderem mögliche Einflüsse der Antikörper-Bindung auf die Zellfunktion in Betracht gezogen wurden (Wang, Chang et al. 2011). Die Apoptose einer durch Antikörper gebundenen Zelle kann ebenso wie ihre Aktivierung in Form veränderter Oberflächenantigenexpression, Stoffwechselaktivität oder Zytokinfreisetzung und ihre Proliferation ausgelöst und ihre Zytotoxizität beeinflusst werden (Przepiorka, Phillips et al. 1998; Carpenter, Pavlovic et al. 2000; Li, Wang et al. 2005; Shiheido, Chen et al. 2014). Derartige mögliche Einflüsse der Antikörper-Bindung auf therapeutisch eingesetzte T Zellen sind unter anderem auch in der Antikörper-basierten in vivo-Darstellung der T Zellen durch nicht-invasive Bildgebung (Noninvasive Imaging) von großer Bedeutung, durch die ein verbessertes Verständnis verbunden mit erhöhter Sicherheit des Rezeptor-Transfers angestrebt wird (siehe 1.2).

1.2 Nicht-invasive Bildgebungstechniken für T Zellen in vivo

Nicht-invasive Bildgebung kann wertvolle Informationen über die Biodistribution und Funktionalität genetisch modifizierter T Zellen in vivo liefern, idealerweise zu verschiedenen Zeitpunkten der T Zell-Therapie, um die bisher begrenzten Erkenntnisse über Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der T Zell-Therapie zu erweitern. Dies wäre sowohl in der Entwicklung in präklinischen Modellen als auch in der Verlaufsbeurteilung der T Zell-Therapie in der klinischen Anwendung von großem Nutzen.

Ein vielversprechender Ansatz ist das PET/CT. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht durch ihre hohe Gewebepenetration die Darstellung tiefer Strukturen und liefert in Kombination mit der Computertomografie (CT) eine hohe räumliche Auflösung und Quantifizierbarkeit bei guter Sensitivität im Vergleich zur Magnetresonanztomografie (MRT) (Koya, Mok et al. 2010; Dobrenkov, Olszewska et al. 2008). Klinisch angewendete Radionuklid-gekoppelte niedermolekulare Bausteine metabolischer Prozesse wie F18-Fluorodesoxyglucose (F18-FDG) oder F18-Fluorthymidin (F18-FLT) können Gewebe mit gesteigerter Glykolyse-Aktivität oder Proliferation bei entzündlichen sowie malignen Erkrankungen im PET/CT darstellen, bleiben jedoch weitgehend unspezifisch (Ribas, Benz et al. 2010). In anderen beschriebenen PET/CT-basierten Techniken zur in vivo Darstellung von T Zellen erfolgte die T Zell-Markierung häufig ex vivo, einem in der klinischen Anwendung nicht

relevanten Verfahren mit zeitlich stark begrenztem Informationsgewinn (Bhatnagar, Li et al. 2013; Griessinger, Kehlbach et al. 2014).

Alternativ sind genetische Modifikationen in Entwicklung, die vergleichbar mit dem Prinzip der Suizid-Gene die Expression von Proteinen zur Steuerung der Akkumulation eines Radionuklid-gekoppelten Markers als sogenannte Reporter-Gene ermöglichen. Dieser Ansatz umfasst das Potential für eine wiederholte Darstellungen vitaler genetisch modifizierter Zellen in vivo im Zeitverlauf, jedoch ist der erfolgreiche Transfer entsprechend großer genetischer Konstrukte als Herausforderung zu betrachten, die eine breite klinische Anwendung auch durch regulatorische Anforderungen erschwert. (Keu, Witney et al. 2017; McCracken, Vatakis et al. 2015; Krebs, Ahad et al. 2018)

Mall et al. schlugen daher die Verwendung des transgenen, tumorreaktiven TZR als universelle Zielstruktur einer Antikörper-basierten Bildgebungsmethode vor, die ohne zusätzliche genetische Modifikation, d.h. ohne Vergrößerung des transduzierten Gen-Konstruktes auskommt (Mall, Yusufi et al. 2016).

1.2.1 Immuno-PET/CT Bildgebung transgener T Zellen in vivo

Die direkte Markierung transgener T Zellen in vivo durch Antikörper oder deren Fragmente, gekoppelt an radioaktive Nuklide, hat das Potential wiederholter Bildgebung im Zeitverlauf und kommt je nach Auswahl der Antikörper-Zielstruktur ohne zusätzliche genetische Manipulation der T Zellen aus. Die Antikörper-basierte Darstellung von Tumoren in vivo im PET/CT wird bereits in klinischen Studien angewendet (Pandit-Taskar, O'Donoghue et al. 2016). Murine T Zellen konnten im Rahmen ihrer Immunantwort in einem Kolitis-Mausmodell durch Indium-111-markierte anti-CD4-Antikörper in der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie/CT (SPECT/CT) dargestellt werden (Kanwar, Gao et al. 2008). Weiterhin konnten murine T Zellen über die T Zell-Oberflächenantigene CD4 und CD8 als Zielstrukturen Zirconium-89 (⁸⁹Zr)-gekoppelter Antikörper-Derivate in verschiedenen murinen Immuntherapie-Modellen mittels PET/CT verfolgt werden (Tavaré, McCracken et al. 2015; Tavaré, Escuin-Ordinas et al. 2016). Durch einen Kupfer-64 (⁶⁴Cu)-gekoppelten Antikörper, gerichtet gegen die variable Domäne eines monoklonalen murinen TZR, gelang bereits die Markierung monospezifischer muriner T Zellen in vitro sowie nicht-invasive in vivo Bildgebung der markierten Zellen nach intraperitonealer Injektion im Mausmodell mittels PET/CT (Griessinger, Maurer et al. 2015). Jedoch besteht der Verdacht auf eine reduzierte Vitalität der T Zellen nach Bindung des ⁶⁴Cu-gekoppelten Antikörpers (Griessinger, Maurer et al. 2015). Detaillierte Untersuchungen der Einflüsse der Markierungstechniken auf die T Zell-Funktionalität stehen noch aus. Weiterhin sind die genannten Ansätze bisher alle mausspezifisch für die Darstellung muriner T Zellen und damit weit entfernt von einer klinischen Translation.

1.2.2 Immuno-PET/CT Bildgebung transgener, humaner T Zellen in vivo

Die Bindung humaner, genetisch modifizierter T Zellen ist durch einen Antikörper gegen murinisierte Anteile der konstanten Kette humaner, transgener TZR möglich. Durch die intravenöse Applikation eines entsprechenden ⁸⁹Zr-gekoppelten F(ab')₂-Fragments in vivo gelang in unserer Arbeitsgruppe eine nicht-invasive in vivo Darstellung der Biodistribution humaner, transgen-tumorreaktiver T Zellen 5 Tage nach intravenösem Zell-Transfer im Mausmodell mittels PET/CT. Der murinisierte Anteil der konstanten Kette transgener TZR als Zielstruktur der Antikörper-Bindung eröffnet die Möglichkeit der Übertragung der Bildgebungsmethode auf verschiedene tumorspezifische TZR, unabhängig von der TZR-Spezifität, und die dargestellten humanen T Zellen müssen allein den tumorreaktiven TZR als genetische Modifikation tragen.

Jedoch sind Einflüsse auf die Funktionalität der T Zellen sowohl räumlich durch eine Antikörper-Bindung an den TZR als auch intrinsisch durch mögliche intrazelluläre Signalkaskaden nicht auszuschließen. (Mall, Yusufi et al. 2016)

2 Ziel dieser Studie

Vor dem Hintergrund der Erkenntnisse des Immunoediting gewinnen im adoptiven Zell-Transfer von T Zellen genetische Modifikationen mit TZR gerichtet gegen verschiedene Tumorantigene zunehmend an Bedeutung für ein besonders breites Spektrum an Zielstrukturen in der Immuntherapie von Tumoren. Durch adoptiven Zell-Transfer von T Zellen modifiziert mit transgenen TZR gerichtet gegen MART-1, gp100 und NY-ESO-1 zeigte sich ein klinisches Ansprechen in Patienten mit fortgeschrittenem Melanom, Sarkom oder Myelom (Johnson, Morgan et al. 2009; Robbins, Kassim et al. 2015; Rapoport, Stadtmauer et al. 2015; D'Angelo, Melchiori et al. 2018). Die Identifizierung neuer Zielstrukturen und TZR sowie die Optimierung transgener TZR und klinischer Anwendungsprotokolle ebenso wie die Evaluation von Kombinationstherapien ist weiterhin von großem Interesse. Eine besondere Herausforderung ist dabei die Verbesserung der Sicherheit des TZR-Transfers, nachdem schwere Nebenwirkungen sogar mit letalem Ausgang in ersten klinischen Studien aufgetreten sind (Morgan, Chinnasamy et al. 2013; Linette, Stadtmauer et al. 2013). Mit nicht-invasiven Bildgebungsmethoden wird ein verbessertes Verständnis der Biodistribution und Anti-Tumor-Reaktion transgener T Zellen in vivo angestrebt. Neben dem primären Ziel des gesteigerten Informationsgewinns in präklinischen Untersuchungen ist insbesondere eine klinische Translation für ein verbessertes Verständnis der Pharmakokinetik und -dynamik im Menschen im Rahmen der klinischen Wirkung mit dem Potential für ergänzende Sicherheitsmechanismen in Gestalt der Depletion autoreaktiver T Zellen von Interesse. Essentielle Voraussetzung eines informativen Bildgebungsverfahrens ist dabei die unveränderte Funktionalität der dargestellten T Zellen. Die Auswahl des transgenen tumorreaktiven TZR als Zielstruktur einer Antikörper-basierten Bildgebungsmethode, die im Therapieverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt werden könnte, kommt ohne zusätzliche genetische Zellmodifikationen aus. Weiterhin ermöglicht die von unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagene Antikörper-Bindung eines murinisierten Anteils der konstanten Kette des transgenen TZR die Markierung ausschließlich tumorreaktiver, transgener, humaner T Zellen, unabhängig von der TZR-Spezifität. (Mall, Yusufi et al. 2016) Jedoch bergen Manipulationen des TZR als zentrales Element der T Zellentwicklung und -funktion ein hohes Risiko der Einflussnahme auf Antigen-Bindung und Reaktivität sowohl durch intrinsische Signalkaskaden als auch sterische Faktoren. Positive wie negative Einflüsse auf Aktivierung, Proliferation, Apoptose und Funktionalität könnten Nebenwirkungsprofil und Wirksamkeit des Transfers transgener T Zellen beeinflussen (Mall, Yusufi et al. 2016). Eine detaillierte Analyse des Einflusses einer Antikörper-Bindung an humane tumorreaktive T Zellen über den transgenen TZR in vitro und in vivo ist daher unabdingbar für aussagekräftige, bildgebende Informationen in präklinischen Modellen und insbesondere eine klinische Translation.

3 Material

3.1 Technische Ausstattung

Tabelle 1: Technische Ausstattung

Gerät	Hersteller
Analysenwaage SI-64	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Axiovert 40C Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland
Bestrahlungsanlage	Gulmay, Byfleet, UK
Elektrophorese-System	VWR, Darmstadt, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)/ Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80°C)	Buchner Labortechnik, Pfaffenhofen, Deutschland
Inkubator BBD6220	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
LC-20A Prominence HPLC System	Shimadzu, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan
LSRII Zytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Megafuge 1.0R	DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, UK
Mikroplattenleser (Sunrise)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop BX53	Olympus, Tokio, Japan
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multi- und Einzelkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-100	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Nanophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hech, Sondheim/Röhn, Deutschland
Pipetboy	INTEGRA Biosciences, Fernwald, Deutschland
Präzisionswaage 440-35N	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
SE-HPLC BioSep (SEC-S3000 Säule)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Laminar Flow	BDK, Sonnenbühl-Genkigen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Laminar Flow	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
HERAsafe	
StepOnePlus	Life Technologies, Carlsbad, USA
TGradient Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland

Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV-Transilluminator Biodoc Analyze	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	Bender & Hobein GmbH, München, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge J2-HS	Beckman Coulter, Brea, USA

3.2 Verbrauchsgüter

Tabelle 2: Verbrauchsgüter

Verbrauchsgut	Hersteller
Abdeckfolie	Alpha laboratories, Hampshire, UK
Aspirationspipette (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CryoPure Röhrchen (1,6ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen mit Rundboden	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Filter-Pipettenspitzen (10/200/1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gefrierbox	Nunc, Roskilde, Dänemark
Handschuhe latex	Sempermed, Wien, Österreich
Handschuhe nitril	KCL, Eichenzell, Deutschland
ImmunoPlates	Nunc, Roskilde, Dänemark
MACS Säulen (LD, LS, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroröhrchen (1,2ml)	Alpha laboratories, Hampshire, UK
Nicht-behandelte 6/24 Wannen-Platten	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen (10/200/1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Gefäß (0,2/0,5ml)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Eppendorf-Gefäß (1,5/2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sephadex G-25 M, PD10 Säule	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Serologische Pipetten (2/5/10/25/50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter (0,22µm und 0,45µm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Stericup-Vakuumfilter (0,22µm)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Sub-Q Spritze (1ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Spritzen (5/10/50ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellsieb (40µm)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Zellkultur-behandelte 96 Wannen-Platte mit Rundboden	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-behandelte 6/12/24/96 Wannen-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

3.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Hersteller
100bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, UK
1kb DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, UK
6x DNA-Gel-Ladefarbstoff	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
7-Aminoactinomycin D (7AAD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DEPC-H ₂ O	Invitrogen, Carlsbad, USA
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Carlsbad, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-PBS (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ SO ₄ (1M)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HBSS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Heparin	B. Braun, Melsungen, Deutschland

HEPES	Invitrogen, Carlsbad, USA
Humanserum (HS)	TU München, München, Deutschland
Isofluran	CP Pharma, Burgendorf, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maus-Fc-Blockade-Antikörper (2.4G2)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mycophenolsäure (MPA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaN ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protaminsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Protein A Sepharose	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
RetroNectin	Takara, Kusatsu, Japan
RNase Out	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI-1640 (RPMI)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TransIT-293 Transfektions-Reagenz	Mirus, Madison, USA
Trypsin EDTA (0,5%)	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Tween20	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ultrafiltrationsapparat Amicon Ultra 0,5ml	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.4 Vorgefertigte Produktketten (Kits)

Tabelle 4: vorgefertigte Produktketten (Kits)

Kits	Hersteller
AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthese Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Anti-PE/Anti-APC/Anti-FITC Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Dynabeads human T Activator CD3/CD28	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pierce F(ab') ₂ Preparation Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Humanes IFN γ ELISA Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
KOD Hot Start Polymerase Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
QiAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
TMB Substrate Reagenzien Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

3.5 Zytokine

Tabelle 5: Zytokine

Zytokine	Hersteller
Humanes IL-2 (hIL-2)	PeptoTech, London, UK
Humanes IL-7 (hIL-7)	PeptoTech, London, UK
Humanes IL-15 (hIL-15)	PeptoTech, London, UK

3.6 Antikörper und Reagenzien in der Durchflusszytometrie

3.6.1 Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angewendet in der Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angewendet in der Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
Isotyp-Kontrolle	MOPC-21	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD16	3G8	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD3	UCHT-1	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD32	FLI8.26	mIgG _{2b} K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD4	RPA-T4	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD45	HI30	mIgG ₁ K	Beckman Coulter, Brea, USA
α-hCD45RA	HI100	mIgG _{2b} K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD45RO	UCHL1	mIgG _{2a} K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD5	BL1a	mIgG _{2a}	Beckman Coulter, Brea, USA
α-hCD62L	DREG-56	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD64	10.1	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hCD8	RPA-T8	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-Hamster IgG2/3	G70-204	mIgG ₁ K	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-mTZRβ (αTZRmu-IgG)	H57-597	Armen. Hamster IgG ₂ λ1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Isotyp-Kontrolle	Ha4/8	Armen. Hamster IgG ₂ λ1	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α-hTZRαβ	T10B9.1A-31	mIgMκ	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

3.6.2 Fluorochrom-gekoppelte Reagenzien angewendet in der Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Fluorochrom-gekoppelte Reagenzien angewendet in der Durchflusszytometrie

Reagenz	Hersteller
Annexin V	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CellTrace Violet	Life Technologies, Carlsbad, USA
CellTrace CFSE	Life Technologies, Carlsbad, USA

3.7 Puffer

Tabelle 8: Puffer

Name	Inhaltsstoffe	Verwendung
10x Bindungspuffer	1,4M NaCl 25mM CaCl ₂ 0,1M HEPES in H ₂ O	Apoptose-Bestimmung
10x TAE-Puffer	0,4mM Tris-HCl, pH 7,8	Gel-Elektrophorese
ACK Lyse-Puffer	150mM NH ₄ Cl 10mM KHCO ₃ 0,1mM EDTA in H ₂ O	Erythrozytenlyse
Coating-Puffer	100mM NaHCO ₃ 30mM Na ₂ CO ₃ in H ₂ O, pH 9,5	ELISA
FACS-Puffer	PBS; 1% ΔFCS	FACS
Waschpuffer	PBS; 0,05% Tween20	ELISA
ΔFCS	Inaktiviertes FCS (20min bei 58°C)	Medienherstellung
ΔHS	Inaktiviertes HS (20min bei 58°C)	FACS, Medienherstellung
Isolationspuffer	PBS; 0,2% ΔFCS, 2mM EDTA	Zellisolation
RetroNectin-Lösung	PBS; 12µg/ml RetroNectin	Transduktion

3.8 Medien

Tabelle 9: Medien

Medium	Zusammensetzung
cRPMI	RPMI supplementiert mit 10% (v/v) Δ FCS, Natriumpyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), nicht-essentiellen Aminosäuren (10mM) und Penicillin/Streptomycin (100IU/ml)
cDMEM	DMEM supplementiert mit 10% (v/v) Δ FCS, Natriumpyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), nicht-essentiellen Aminosäuren (10mM) und Penicillin/Streptomycin (100IU/ml)
Einfriermedium	Δ FCS supplementiert mit 10% DMSO
Hybridom-Medium	RPMI supplementiert mit 10% (v/v) ultra-geringem IgG- Δ FCS, Natriumpyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), nicht-essentiellen Aminosäuren (10mM) und Penicillin/Streptomycin (100IU/ml)
T Zell-Medium	RPMI supplementiert mit 5% (v/v) Δ FCS, 5% (v/v) Δ HS, Natriumpyruvat (1mM), L-Glutamin (2mM), nicht-essentiellen Aminosäuren (10mM), HEPES (10mM), Penicillin/Streptomycin (100IU/ml) und Gentamycin (16 μ g/ml)

3.9 Zelllinien

Tabelle 10: Zelllinien

Zelllinie und Verwendung	Ursprung
ML2-Zellen	Humane Akute Myeloische Leukämie
H57-597-Hybridom	Das CABRI Consortium
NSO-IL-15	Herstellung von aTZRmu-IgG
T293	Murine Myelomzellen
RD114	Herstellung von retroviralen Partikeln
	S. R. Riddell (Wang, Berger et al. 2011)
	ATCC
	ATCC

3.10 Software

Tabelle 11: Software

Software
Chromatography Data System Chromeleon 6.8
Graph Pad prism Version 5.01
Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint) 2010-2021
Windows EndNote X7.4
BioDoc Analyze digital System (BioMetra)
StepOne Software v2.3
Flow Jo

4 Methoden

4.1 Allgemeine Arbeiten mit Zellen

4.1.1 Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen d.h. an sterilen Sicherheitswerkbänken mit laminarem Luftstrom und unter Verwendung steriler Zellkulturmaterialien und autoklavierter Pipetten durchgeführt. Kultiviert wurden die Zellen unter Standardkulturbedingungen (im Begasungsbrutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Volumenanteil von 5,0% CO₂). Alle Zellen wurden routinemäßig auf Mycoplasmen-Infektion getestet. Humane Blutproben und Retroviren wurden gemäß den Anforderungen der Sicherheitsstufe S2 verwendet.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit 500g für 5 Minuten (min) bei 20°C zentrifugiert, nach Abkippen des Überstandes in 1ml Einfriermedium (Δ FCS + 10% DMSO) resuspendiert und in ein CryoPure Röhrchen überführt. Im CryoPure Röhrchen erfolgte durch Aufbewahrung in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox bei -80°C über Nacht ein langsames Abkühlen vor der Lagerung der Röhrchen in flüssigem Stickstoff, für eine erfolgreiche Kryokonservierung unter Reduktion von Zellschäden durch die Bildung von Eiskristallen (Pegg 2015).

Zur Re-Kultivierung wurden die Zellen im CryoPure Röhrchen im warmen Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und in 10ml RPMI aufgenommen. Nach Zentrifugation mit 500g für 5min bei 20°C und Abkippen des Überstandes wurden die Zellen in das jeweilige Kulturmedium und -gefäß (siehe 4.2 und 4.4.3) zur Inkubation bei Standardkulturbedingungen überführt.

4.1.3 Zellzählung

Für die Zählung lebender Zellen wurden mindestens 10µl einer gut gemischten Zellsuspension von 1:2 bis 1:20 mit 4% Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgewertet. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran nahmen die Färbung mit Trypanblau nicht auf und wurden so von gefärbten absterbenden oder toten Zellen mit einer geschädigten Zellmembran abgegrenzt und gezählt. Für Zellzählungen direkt nach ihrer Isolation aus dem Blut wurde der Trypanblau-Lösung Essigsäure (3%v/v) zugegeben, um Erythrozyten zu lysieren. Mit der folgenden Formel wurde der Mittelwert der gezählten Zellen pro Eckquadrat umgerechnet in Zellen pro ml:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen pro Eckquadrat}}{\text{Anzahl der Eckquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.2 Kultivierung von Zelllinien

ML2-Zellen in Suspension wurden in cRPMI (Tab. 9) kultiviert und alle 3-4 Tage mit frischem Medium resuspendiert und verdünnt. Die semi-adhären Zellen T293 und RD114 wurden in cDMEM (Tab. 9) kultiviert und durch sanfte Erschütterung mittels Klopfen an den Kulturflaschen ausreichend gelockert, um ebenfalls alle 3-4 Tage mit frischem Medium resuspendiert, verdünnt und neu ausgesät zu werden. Die adhären NSO-Zellen wurden in cDMEM mit 0,008% Mycophenolsäure kultiviert und nach Entfernung des Mediums mit PBS gewaschen bevor ihre Adhärenz durch die Zugabe von Trypsin EDTA für ca. 5min bei 37°C gelöst wurde. Nach erneuter Zugabe von Kulturmedium wurden die Zellen resuspendiert, mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und in frischem Kulturmedium verdünnt bevor sie neu ausgesät wurden. Für die Weiterverarbeitung erfolgte die Verdichtung der Zellen am Boden einer Suspension durch Zentrifugation mit 500g für 5min bei 20 °C, wenn nicht anders angegeben.

4.3 Aufreinigung primärer Zellen

4.3.1 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Venöses Blut wurde gesunden Spendern abgenommen, nachdem eine informierte Zustimmung gemäß den Anforderungen der lokalen Ethikkommission und der Deklaration von Helsinki eingeholt wurde. Dabei wurden je 50ml Blut 700µl EDTA zugesetzt und eine direkte Weiterverarbeitung mittels Dichtegradientenzentrifugation für die Isolation von PBMC angeschlossen. Hierfür wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit RPMI verdünnt und auf jeweils 15ml Ficoll in 50ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation mit 880g für 25min bei 21°C ohne Bremsen wurde die Zwischenphase mit den PBMC vorsichtig geerntet und zweimal mit RPMI gewaschen (jeweils Zentrifugation mit 500g für 5min bei 20°C). Nach Resuspension in T Zell-Medium (Tab. 9) erfolgte die Zählung und Aktivierung für die retrovirale Transduktion (siehe 4.3.3 und 4.4). Im Falle einer anschließenden Isolation von CD8+ zentralen Gedächtnis-T Zellen (T_{cm}) (siehe 4.3.2) erfolgte die Resuspension und Zählung der PBMC im zugehörigen Isolationspuffer (Tab. 8).

4.3.2 Isolation und Aufreinigung CD8+ CD62L+ CD45RA- T_{cm}

Um CD8+ T_{cm} zu gewinnen erfolgte als erster Schritt eine Depletion CD4+ und CD45RA+ Zellen bevor im zweiten Schritt CD62L+ Zellen angereichert wurden. Für die Depletion wurden 3×10^8 frisch aufgereinigte PBMC in 800µl Isolationspuffer resuspendiert und mit 100µl FITC-anti-CD4-Antikörper und 100µl APC-anti-CD45RA-Antikörper für 15min bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Isolationspuffer wurden die Zellen in 2400µl Isolationspuffer resuspendiert und mit 300µl anti-FITC MicroBeads und 600µl anti-APC MicroBeads erneut 15min bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Isolationspuffer wurden gemäß Herstellerangaben maximal 10^8 Zellen in 500µl Isolationspuffer je LD-Säule appliziert und die nicht markierte Zellfraktion gesammelt, die durch Zugabe von 2x1ml Isolationspuffer hindurchfloss. Diese CD4- CD45RA- Zellfraktion wurde gezählt, zentrifugiert und 2×10^7 Zellen in 160µl Isolationspuffer resuspendiert, um mit 40µl PE-anti-CD62L-Antikörper für 15min bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert zu werden. Nach einmaligem Waschen mit Isolationspuffer wurden die Zellen in 160µl Isolationspuffer resuspendiert und mit 40µl anti-PE MicroBeads erneut 15min bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Isolationspuffer wurden die Zellen in 500µl Isolationspuffer (maximal 10^8 Zellen/500µl) resuspendiert, gemäß Herstellerangaben auf die LS-Säule appliziert und durch Zugabe von 3x3ml Isolationspuffer gewaschen. Danach wurde die LS-Säule vom Magneten getrennt und die markierte Zellfraktion mit 5ml Isolationspuffer hinausgedrückt. Die isolierten CD4- CD45RA- CD62L+ Zellen wurden nach Zentrifugation in T Zell-Medium resuspendiert, gezählt und für die retrovirale Transduktion aktiviert (siehe 4.3.3). Für jeden Schritt der Isolation und Aufreinigung der T_{cm} wurden Phänotyp und Reinheit der gewonnenen Zellen durch Durchflusszytometrie kontrolliert (siehe 4.6).

4.3.3 Aktivierung primärer Zellen

Für die retrovirale Transduktion (siehe 4.4) wurden isolierte PBMC oder T_{cm} in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in T Zell-Medium aufgenommen. Dieses enthielt zur Aktivierung der PBMC 30 ng/ml OKT3 und 50 IU/ml hIL-2 (Tab. 5). Isolierte T_{cm} wurden mit CD3/CD28-Dynabeads im Verhältnis 1:1 und 50 IU/ml hIL-2 aktiviert. Hierfür wurden die CD3/CD28-Dynabeads gemixt und jeweils 25ul pro 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und dem T Zell-Medium zugefügt. Die entstandenen Zellsuspensionen wurden in der Konzentration 1×10^6 Zellen/ml je Wanne einer Zellkultur-behandelten Platte mit 24 Wannern (24W-Platte) ausgesät und für 2 bis 3 Tage unter Standardkulturbedingungen inkubiert.

4.4 Retrovirale Transduktion primärer Zellen

Primäre Zellen wurden durch retrovirale Transduktion gemäß den Anforderungen der Sicherheitsstufe S2 genetisch modifiziert.

4.4.1 Herstellung von Virus-Partikeln

Retrovirale Partikel wurden mit Hilfe der Verpackungszelllinien T293 oder RD114 produziert. Hierfür wurden 2×10^5 Zellen in 3ml cDMEM pro Wanne einer Zellkultur-behandelten 6W-Platte ausgesät. Am nächsten Tag waren die Zellen adhärent. Nach vorsichtigem Mixen wurden 9µl TransIT-293 Transfektions-Reagenz mit 200µl DMEM gemischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden je 1µg DNA der Vektoren pcDNA3.1-MLV (enthält „gag-pol“), pALF10A1-GALV (enthält „env“) und pMP71 (enthält das gewünschte Gen-Konstrukt TZR 2.5D6 oder TZR 2.5D6-iRFP) (Weigand, Liang et al. 2012; Klar, Schober et al. 2014; Mall, Yusufi et al. 2016) zugegeben, vorsichtig mit der Pipette gemischt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Das cDMEM-Medium der adhärennten Verpackungszelllinie wurde erneuert und 200µl der Transfektionsmischung je Wanne tropfenweise zugegeben. Für die leer-transduzierten Kontrollen wurde 200µl reines DMEM je Wanne zugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken der Platten wurden diese für 48 Stunden (h) bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, mit 500g für 5min bei 20 °C zentrifugiert, um verbliebene Zellen zu entfernen, und durch einen 0,45µm Spritzenvorsatz gefiltert.

4.4.2 Transduktion aktivierter primärer Zellen (PBMC oder T_{cm})

Die Transduktion erfolgte durch Zentrifugation der Zielzellen in RetroNectin-beschichtete 24W-Platten mit den Viruspartikeln. Vorbereitend wurden 400µl RetroNectin-Lösung (12,5µg/ml in PBS) pro Wanne einer nicht-Zellkultur-behandelten 24W-Platte, umwickelt mit Parafilm, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Abnehmen des RetroNectin folgte die Blockade durch Zugabe von 500µl 2% BSA in PBS pro Wanne zur Inkubation für 30min bei Standardkulturbedingungen. Im Anschluss wurde jede Wanne mit 2ml PBS 2,5% HEPES gewaschen und mit 1ml PBS 2,5% HEPES bei 4°C gelagert bis dieses vor der unmittelbaren Durchführung der Transduktion entfernt wurde. Für die Transduktion wurden die aktivierten PBMC oder T_{cm} geerntet, gezählt und 1×10^6 Zellen in 1ml T Zell-Medium mit 4µg/ml Protaminsulfat, 1% HEPES und 100 IU/ml hIL-2 (bezogen auf das Endvolumen von 2ml) je RetroNectin-beschichtete Wanne ausgesät. Jeweils 1ml produzierter Virusüberstand (siehe 4.4.1) wurde zugegeben und die Platten für 90min mit 880g bei 32°C zentrifugiert ohne Bremsen. Nach Inkubation unter Standardkulturbedingungen über Nacht wurde eine zweite Transduktion der Zellen durchgeführt. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet, mit 820g für 5min bei 20°C zentrifugiert und der Gewinn aus je 2 Wannen resuspendiert in 5ml frischem T Zell-Medium pro Zellkulturflasche supplementiert mit je 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 alle 3 Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen wurde die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie transduzierter Fluoreszenz-Proteine (iRFP oder GFP) oder einer Antikörper-Färbung des transduzierten TZR bestimmt (siehe 4.6.1). Nach Ausschluss viraler RNA im Kulturmedium erfolgte die Abstufung auf die Sicherheitsstufe S1 (siehe 4.5) vor Verwendung transduzierter Zellen in vivo.

4.4.3 Kultivierung von PBMC und T_{cm}

Nach Aktivierung und Transduktion primärer Zellen wurden diese in Suspension in T Zell-Medium mit 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 kultiviert und alle 3-4 Tage mit frischem Medium inklusive Zytokine resuspendiert und verdünnt. Für die Weiterverarbeitung erfolgte die Verdichtung der Zellen am Boden einer Suspension durch Zentrifugation mit 500g für 5min bei 20 °C, wenn nicht anders angegeben, zusätzlich wurden aus den T_{cm} nach Resuspension am Magneten die CD3/CD28-Dynabeads entfernt.

4.5 Ausschluss viraler RNA im Kulturmedium vor Abstufung auf die Sicherheitsstufe S1

4.5.1 Aufreinigung viraler RNA aus Kulturmedium

Um retrovirale RNA im Kulturmedium nachzuweisen, wurde jeweils aus 140µl Kulturmedium transduzierter Zellen virale RNA mit dem QiAmp Viral RNA Mini Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und bei -20 °C aufbewahrt bis zur Weiterverwendung zur cDNA-Synthese.

4.5.2 cDNA-Synthese viraler RNA

Für die cDNA-Synthese wurde die „AffinityScript Multiple Temperature“ Reverse Transkriptase gemäß Herstellerangaben mit leichten Modifikationen verwendet. Initial wurden 9µl der aus dem Kulturmedium aufgereinigten viralen RNA mit 2µl A3-Reverse Primer (10pM) und 1µl dNTP (10mM) gemixt und 5min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe für 10min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 4µl „AffinityScript“ Puffer und 2µl DTT (0,1M), Mixen und Inkubation für 2min bei 42°C wurden 1µl dNTP (10mM), 0,5µl „RNase Block“ Ribonuklease Inhibitor (RNase Out 40U/µl) und 1µl „AffinityScript Multiple Temperature“ Reverse Transkriptase zugegeben. Diese Mischung wurde für 1h bei 47,5°C inkubiert, dann für 15min bei 70°C und dann abgekühlt auf 4°C im TGradient Thermocycler für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ggf. erfolgte vor oder nach PCR erneut eine Aufbewahrung bei -20°C.

4.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung synthetisierter cDNA wurde eine PCR mit Hilfe des KOD Hot Start Polymerase Kits durchgeführt und die folgenden Reagenzien gemixt:

10x KOD-Puffer	4µl
MgSO ₄ (25mM)	1,2µl
A3-Forward Primer (10pM)	2µl
A3-Reverse Primer (10pM)	2µl
dNTPs (10mM)	0,8µl
KOD-Polymerase	0,5µl
cDNA	2µl
DEPC-H ₂ O	27,5µl

Im Anschluss wurde die PCR der Mischung im TGradient Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C	2 Minuten	} 38 Zyklen
94°C	30 Sekunden	
56°C	30 Sekunden	
72°C	1 Minute	
72°C	10 Minuten	
4°C	∞	

4.5.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Untersuchung synthetisierter und vervielfältigter DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese ergänzt. Hierfür wurden 1,5% Agarose-Gele nach Erhitzen von 1,5g Agarose in 10ml 1xTAE-Puffer und Zugabe von 8µl Ethidiumbromid gegossen. Die Proben wurden mit entsprechender Menge 6x DNA-Gel-Ladefarbstoff gemischt und in die Taschen des Agarose-Gels platziert. Der DNA-Marker 1kb oder 100bp wurde als Vergleich zur Interpretation der erwarteten DNA verwendet. Die DNA-Fragmente wurden für 20-40min bei 110V in einer Elektrophorese-Kammer midi horizontal getrennt und die Ergebnisse mit Hilfe des BioDoc Analyse System visualisiert und interpretiert.

4.5.5 Abstufung auf Sicherheitsstufe S1

Nachdem möglicherweise verbliebene virale RNA aus dem Kulturmedium aufgereinigt, umgeschrieben in cDNA und mittels PCR vervielfältigt wurde, erfolgte deren Nachweis mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Wenn kein vervielfältigtes Produkt in der Gel-Elektrophorese im Vergleich zur entsprechend prozessierten positiven Kontrolle aus Virus-Überstand der Verpackungszelllinie und negativen Kontrolle aus DEPC-H₂O nachweisbar war, erfolgte die Abstufung der getesteten Zellkultur auf Sicherheitsstufe S1.

4.6 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Für die Messung der Proben mittels Durchflusszytometrie wurde der LSRII (BD Biosciences) verwendet.

4.6.1 Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

1x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen wurden mit 500g für 5min bei 4°C zentrifugiert und mit FACS-Puffer gewaschen (Tab. 8). Durch Inkubation mit 50µl ΔHS für 10min bei 4°C folgte die Blockade der Fc-Rezeptoren und die Proben wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen.

Wenn bereits vor der Färbung oberflächengebundene Antikörper nachgewiesen werden sollten, wurden primär je 1,5µl Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper zugegeben, die Proben gemixt und für 20min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wurden zur Färbung von Molekülen der Zelloberfläche je 1,5µl Fluorochrom-gekoppelte Antikörper oder Fluorochrom-gekoppelte Isotyp-Kontrollen zugegeben, die Proben gemixt und für 20min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Bei jeder Färbung erfolgte ein Ausschluss toter Zellen durch Kombination der Antikörper-Zugabe mit 0,5µl 7AAD (0,5mg/ml in PBS). Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mit FACS-Puffer gewaschen und direkt mittels Durchflusszytometrie gemessen. Alternativ wurden die Proben mit 200µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt bis zur Messung an den Folgetagen.

4.6.2 Apoptose-Bestimmung

Für die Etablierung wurden 1-2x10⁵ Zellen in 100µl T Zell-Medium ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ versetzt (0,05mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 1,5mM) und über Nacht bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Die weiteren Analysen erfolgten nach Antikörper-Stimulation (siehe 4.8).

Die Messung der Apoptose erfolgte durch Markierung von Zellen mit negativ geladenen Außenmembranen im Zuge eines frühen Apoptose-Stadiums mit Fluorochrom-gekoppeltem-Annexin V (F-A5) und nach Verlust der Membranintegrität mit 7AAD in der Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die Zellen mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Es folgte die Färbung durch Resuspension der Zellen mit 3-5µl F-A5 und 0,5µl 7AAD in 100µl 1x Bindungspuffer (Tab. 8) und Inkubation für 15min in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Proben mit je 400µl 1x Bindungspuffer versetzt und innerhalb einer Stunde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.6.3 Proliferations-Bestimmung

1×10^5 bis 1×10^6 Zellen wurden mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und in 1ml PBS resuspendiert. Der CellTrace Violet-Farbstoff (CTV) und der CellTrace CFSE-Farbstoff (CFSE) wurden gemäß Herstellerangaben unmittelbar vor der Anwendung durch Mixen mit DMSO vorbereitet (5mM) und jeweils 1µl CTV bzw. 0,5µl CFSE pro ml Zellsuspension ergänzt. Nach Inkubation für 10min in Dunkelheit bei Standardkulturbedingungen (37°C) wurden die Proben mit mindestens dem 5-fachen des Färbevolumens an kaltem PBS 2%ΔFCS für 5min bei 4 °C inkubiert, um freien Farbstoff in der Lösung zu reduzieren. Nach Zentrifugation mit 500g für 5min bei 4 °C und Waschen mit PBS 2% ΔFCS wurden für die Etablierung $0,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl vorgewärmtem T Zell-Medium mit $1,5 \times 10^5$ CD3/CD28-Dynabeads gemäß Herstellerangaben und hIL-2 (50IU/ml) je Wanne aktiviert und 3 Tage in Zellkultur-behandelten 96W-Platten mit Rundboden bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Für die Antikörper-Stimulation (siehe 4.8) in den weiteren Analysen wurden die Zellen nach Zentrifugation und Waschen mit PBS 2% ΔFCS in vorgewärmtem T Zell-Medium mit 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 resuspendiert. Zur Kontrolle der CTV- bzw. CFSE-Färbung in der Durchflusszytometrie wurden am Tag der Färbung 1×10^5 Zellen der jeweiligen Färbungen mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Proben mit 0,5µl 7AAD gemixt und für 15min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen, mit 200µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt bis zur Messung in der Durchflusszytometrie an den Folgetagen. Zu den gewählten Zeitpunkten wurde jeweils eine Apoptose-Bestimmung (siehe 4.6.2) ergänzt und die CTV-Färbung bzw. CFSE-Färbung parallel mit der Apoptose in der Durchflusszytometrie analysiert.

4.7 Aufreinigung, Fragmentierung und Umpufferung des aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂

Die Antikörper-Isolation und F(ab')₂-Fragmentierung wurden durch Dr. Nahid Yusufi und Dr. Calogero D'Alessandria durchgeführt, Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik München. Die Aufreinigung des aTZRmu-IgG erfolgte mit Unterstützung von Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum München.

4.7.1 Aufreinigung des aTZRmu-IgG und F(ab')₂-Fragmentierung

Die H57-597-Hybridom-Zelllinie (ATCC HB-218), die den Armenischen (Armen.) Hamster IgG₂ λ1-Antikörper, gerichtet gegen die konstante Region der TZRβ-Kette der Maus, im Folgenden aTZRmu-IgG genannt, produziert, wurde in Hybridom-Medium mit bovinem IgG-freiem Serum (Tab. 9) bei Standardkulturbedingungen über 2 Wochen kultiviert und expandiert. Mittels Protein A Sepharose erfolgte eine Affinitätsaufreinigung von aTZRmu-IgG mit anschließender Dialyse gegen PBS über Nacht. Die F(ab')₂-Fragmentierung erfolgte durch Pepsin-Verdauung und Protein A-Aufreinigung mit Hilfe des F(ab')₂-Preparationskits gemäß den Herstellerangaben. Die F(ab')₂-Herstellung wurde mittels SE-HPLC-Messungen (Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography) kontrolliert unter Verwendung einer SEC-S3000 LC Säule und 0,15M NaCl 0,05M Phosphat-Puffer pH 7,0 als mobile Phase bei einer isokratischen Flussrate von 1,0 ml/min für UV-VIS Profile bei 280nm. Aufbewahrt wurde aTZRmu-F(ab')₂ in PBS 0,05% NaN₃ bei 4°C stabil über mehrere Monate. Die Konzentration von aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ wurde mittels Nanophotometer gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

4.7.2 Umpufferung

Zur Entfernung NaN₃-haltiger Pufferlösung erfolgte die Zentrifugation von aTZRmu-IgG, Isotyp-IgG, aTZRmu-F(ab')₂ und Isotyp-F(ab')₂ mit Hilfe des Amicon Ultra (30kDa) Filters gemäß Herstellerangaben und eine Resuspension in reinem PBS. Die Konzentration von aTZRmu-IgG, Isotyp-IgG, aTZRmu-F(ab')₂ und Isotyp-F(ab')₂ wurde mittels Nanophotometer gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

4.8 Stimulation durch aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ in vitro

4.8.1 Stimulationsansätze

Nach der Transduktion und Kultivierung (siehe 4.4) wurden PBMC oder T_{cm} ggf. nach Proliferationsfärbung (siehe 4.6.3) in frischem T Zell-Medium mit 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 resuspendiert und in Eppendorf-Gefäßen mit den entsprechenden molaren Konzentrationen aTZRmu-IgG, aTZRmu-F(ab')₂, Isotyp-IgG und Isotyp-F(ab')₂ bei 4°C gemischt. Im Anschluss folgte die Inkubation von 1-2x10⁵ Zellen in 100µl/Wanne einer Zellkultur-behandelten 96W-Platte mit Rundboden in Triplets jeder Konzentration unter Standardkulturbedingungen für 12h bzw. 3 Tage (d).

Für die Analyse der 5-minütigen Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen wurden die Platten nach 5min Inkubation bei 37°C unter Standardkulturbedingungen mit 500g für 5min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und 200µl PBS/Wanne zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation mit 500g für 5min und Abnahme der Überstände wurden die Zellen je Wanne mit 200µl T Zell-Medium mit 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 resuspendiert und über Nacht unter Standardkulturbedingungen inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C aufbewahrt bis zur Analyse mittels IFN γ -ELISA (siehe 4.8.2), während die Zellen durch Apoptose-Bestimmung (siehe 4.6.2) analysiert wurden. Im Falle einer zusätzlichen Zellzählung wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände mit 50µl PBS/Wanne intensiv resuspendiert, jeweils 10µl Zellsuspension in 10µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C aufbewahrt bis zu Zellzählung (siehe 4.1.3), während die übrige Zellsuspension durch Apoptose-Bestimmung analysiert wurde. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte je Triplet mit Standardabweichung dargestellt.

4.8.2 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ELISA)

Für die Beurteilung der IFN γ -Sekretion der T Zellen nach Antikörper-Stimulation in vitro oder in vivo wurde die IFN γ -Konzentration im Zellmedium bzw. Blutplasma mithilfe eines humanen IFN γ -ELISA bestimmt. In 96W-Nunc-Immuno-Polystyren-Maxisorp-ELISA-Platten wurden die flachen Wannböden mit spezifischem Antikörper (Capture-Antikörper) in Beschichtungs-Pufferlösung (Coating-Puffer) über Nacht bei 4°C beschichtet, indem jede Wanne mit 50µl einer Mischung aus 4µl Capture-Antikörper pro 1ml Coating-Puffer vollständig bedeckt und die Platte versiegelt wurde. Im Anschluss wurden die Platten gemäß Herstellerangaben dreimalig mit Waschpuffer (Tab. 8) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 200µl 1% Milchpulver in PBS/Wanne für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin wurden die Platten erneut gemäß Herstellerangaben dreimalig gewaschen. Der IFN γ -Standard wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe (1000pg/ml bis 31,25pg/ml) bereitgestellt und jeweils 50µl in Duplikaten je Platte aufgetragen. 50µl der Proben in Triplikaten wurden ergänzt und 1-2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-maligem Waschen gemäß Herstellerangaben wurde ein biotinylierter spezifischer Nachweis-Antikörper (Detection-Antikörper) (1:250) und Streptavidin-Horseradish Peroxidase-Konjugat (1:250) in 1% Milchpulver in PBS 50µl/Wanne zugegeben und 1h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach 7-maligem Waschen gemäß Herstellerangaben wurden je Wanne 100µl Substratlösung (TMB Substrate Reagenzien Set, BD) zugegeben und 10-20min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Wenn der Standard in schwachen bis starken Blautönen sichtbar war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl H₂SO₄ (1M)/Wanne beendet. Die Absorption wurde bei 450nm gemessen mit 570nm als Referenz-Wellenlänge im ELISA-Mikroplattenleser (Sunrise Photometer – Tecan).

4.8.3 Durchflusszytometrie-basierte Zytotoxizitäts-Testung

Für die Untersuchung der Zytotoxizität wurden transduzierte T Zellen sowohl zeitgleich mit aTZRmu-IgG oder Isotyp-IgG und GFP+ ML2-Zellen koinkubiert als auch sequentiell nach primärer Antikörper-Stimulation für 12h sekundär mit GFP+ ML2-Zellen inkubiert.

Für die zeitgleiche Koinkubation wurden PBMC nach Transduktion und Kultivierung (siehe 4.4) in frischem T Zell-Medium resuspendiert und in Eppendorf-Gefäßen mit den entsprechenden molaren Konzentrationen aTZRmu-IgG und Isotyp-IgG bei 4°C gemischt. Im Anschluss folgte die Inkubation von $0,5 \times 10^5$ T Zellen mit $0,5 \times 10^5$ Tumorzellen im Verhältnis 1:1 in 100µl/Wanne einer Zellkultur-behandelten 96W-Platte mit Rundboden in Triplets jeder Konzentration bei 37°C unter Standardkulturbedingungen für 12h bzw. 20h.

Für die sequentielle Stimulation wurden T_{cm} nach Transduktion und Kultivierung (siehe 4.4) in frischem T Zell-Medium mit 5ng/ml hIL-7 und hIL-15 resuspendiert und in Eppendorf-Gefäßen mit den entsprechenden molaren Konzentrationen aTZRmu-IgG, aTZRmu-F(ab')₂, Isotyp-IgG und Isotyp-F(ab')₂ bei 4°C gemischt. Im Anschluss folgte die Inkubation von $0,5 \times 10^5$ Zellen in 100µl/Wanne einer Zellkultur-behandelten 96W-Platte mit Rundboden in Triplets jeder Konzentration bei 37°C unter Standardkulturbedingungen für 12h. Danach wurden die Platten mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Daraufhin wurden $0,5 \times 10^5$ Tumorzellen in 100µl frischem T Zell-Medium je Wanne zugegeben, mit den bereits stimulierten Zellen resuspendiert und bei 37°C unter Standardkulturbedingungen für weitere 20h bzw. 24h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen, während die Zellen mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert und mit PBS gewaschen wurden. Danach wurden die Proben mit 0,5µl 7AAD in einem Gesamtvolumen von 100µl PBS gemixt und für 15-20min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 200-300µl PBS versetzt und zeitnah mittels Durchflusszytometrie von GFP und 7AAD analysiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte je Triplet mit Standardabweichung dargestellt.

4.9 Tiermodell

Die NSG-Mäuse (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ – Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) wurden in unseren Ställen gemäß den institutionellen Leitlinien untergebracht und im Alter von 8-12 Wochen in unseren Versuchen genehmigungskonform eingesetzt.

4.9.1 Adoptiver T_{cm} -Transfer

Nach der Transduktion auf Sicherheitsstufe S1 herabgesetzte humane TZR 2.5D6-iRFP-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Hierfür wurden $1,5 \times 10^7$ T_{cm} resuspendiert in 200µl PBS je Injektion verwendet. Nach einer Ganzkörperbestrahlung am Vortag der T_{cm} -Injektion wurde bei den Mäusen mit den intraperitonealen Injektionen hIL-15-produzierender, bestrahlter (80Gy) NSO-Zellen (NSO-IL-15), jeweils $1,5 \times 10^7$ in 200µl PBS, 3x/Woche begonnen.

4.9.2 Ganzkörperbestrahlung

Eine niedrigdosierte Ganzkörperbestrahlung der Mäuse wurde mit der Gulmay Bestrahlungsanlage zur Verbesserung des Anwachsens der T_{cm} durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgt mit 1Gy unter den folgenden standardisierten Bedingungen: 200kV, 15mA, Filter 5, Tisch-Position 500.

4.9.3 Stimulation durch aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ in vivo

Für eine angestrebte Blutkonzentration von 500nM wurde die kalkulierte Menge aTZRmu-IgG, Isotyp-IgG, aTZRmu-F(ab')₂ oder Isotyp-F(ab')₂ umgepuffert in 200µl reinem PBS intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert und regelmäßige Gewichtskontrollen und Schmerz-Beurteilungen gemäß Burkholder et al. (Burkholder, Foltz et al. 2012) unter Berücksichtigung klinischer Zeichen humaner Endpunkte (Animal Research Advisory Committee ARAC 2022) durchgeführt.

4.9.4 Blutentnahme aus der Vena facialis

24h nach der Stimulation durch aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ in vivo wurde im Rahmen des zweiten in vivo-Experiments erfolgreich eine Blutentnahme aus der Vena facialis unter Isofluran-Betäubung ergänzt. Das Blut wurde mit 1400g für 20min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse mittels humanem IFN γ -ELISA (siehe 4.8.2) aufbewahrt.

4.9.5 Ex vivo-Analyse - Biodistribution

An den Versuchsendpunkten mit Isofluran-Betäubung und Genickbruch der Tiere wurden die Organe und Blut aus dem Herzen entnommen.

Milz, Lunge und Knochenmark wurden mit Druck durch ein 40 μ m Nylon-Zellsieb in FACS-Puffer suspendiert und mit 500g für 5min bei 20°C zentrifugiert vor Entfernung des Überstandes.

Das Blut wurde mit 1400g für 20min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse mittels humanem IFN γ -ELISA (siehe 4.8.2) aufbewahrt.

In der übrigen Suspension der korpuskulären Blutbestandteile sowie den Organsuspensionen folgte eine Erythrozytenlyse durch Inkubation mit 2ml ACK Lyse-Puffer (Tab. 8) für 2min bei Raumtemperatur mit anschließender Zugabe von FACS-Puffer, Zentrifugation mit 500g für 5min bei 20°C und Entfernung des Überstandes. Für die Blutproben wurde diese Erythrozytenlyse insgesamt zweimalig durchgeführt.

Es folgte die Inkubation mit 50 μ l Δ HS + 1 μ l Maus-Fc-Blockade-Antikörper je Probe im FACS-Röhrchen für 10min bei 4°C und die Proben wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Nach der Blockade der Fc-Rezeptoren wurde die Färbung der Proben und Analyse mittels Durchflusszytometrie gemäß Abschnitt 4.6.1 fortgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte je Kondition mit Standardabweichung dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl des Antikörpers

Der monoklonale Antikörper H57-597 (aTZRmu-IgG) bindet an der konstanten Region der TZR β -Kette der Maus, weshalb er sowohl zur Markierung aller murinen $\alpha\beta$ -TZR-tragenden Zellen unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität, als auch zum Nachweis homodimerer $\beta\beta$ -TZR auf unreifen murinen T Zelllinien eingesetzt werden kann (Kubo, Born et al. 1989; Groettrup, Baron et al. 1992). Im Zuge des Gen-Transfers murinisierte, antigenspezifischer TZR (TZRmu) in humane T Zellen ermöglicht die Expression des transgenen TZR die Bindung der murinen konstanten TZR β -Kette durch den Armenischen Hamster aTZRmu-IgG auch auf humanen, erfolgreich genetisch modifizierten T Zellen in der T Zell-Therapie (Weigand, Liang et al. 2012; Klar, Schober et al. 2014; Mall, Yusufi et al. 2016). Dies hat den Vorteil, dass auch in einem Gemisch mit natürlichen humanen T Zellen von der Seite des Spenders oder des Empfängers eine spezifische Markierung derjenigen Zellen erfolgen kann, die einen transgenen TZR an ihrer Oberfläche und damit das beabsichtigte Potential für eine gerichtete Anti-Tumor-Reaktion tragen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Bindung des aTZRmu-IgG an transgene humane T Zellen deren Funktionalität beeinflusst. Für murine T Zellen sind in Folge der Behandlung mit aTZRmu-IgG unter anderem eine Depletion und eine langfristig verringerte antigenspezifische Reaktivität in vivo beschrieben (Henrickson, Reid et al. 1995; Drobyski, Majewski 1996; Kishimoto, Furukawa et al. 2000; Deng, Khattar et al. 2014) und eine mögliche kurzfristige Aktivierung wird diskutiert (Kubo, Born et al. 1989; Murakami, Kong et al. 1995; Henrickson, Reid et al. 1995). Bei der Behandlung muriner T Zellen mit aTZRmu-F(ab')₂ wurden im Vergleich zum aTZRmu-IgG die immunsuppressiven Effekte in deutlich geringerer Ausprägung beobachtet (Henrickson, Reid et al. 1995). Es ist unklar, ob und in welcher Form sich diese Ergebnisse von murinen Zellen auf transgene humane Zellen übertragen lassen, daher sollen im Folgenden die Effekte des aTZRmu-IgG und des aTZRmu-F(ab')₂ auf humane TZR-transgene T Zellen in vitro und in vivo untersucht werden.

5.1.1 Verwendete Varianten des aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂

Um den Einfluss ihrer Oberflächenbindung auf Zelleigenschaften zu analysieren, wurden aTZRmu-IgG und sein Isotyp-IgG nach Herstellerangaben in einer Pufferlösung mit $\leq 0,09\% \text{NaN}_3$ für eine Stimulation transgener humaner T Zellen verwendet. Nach F(ab')₂-Fragmentierung wurde aTZRmu-F(ab')₂ und sein Isotyp-F(ab')₂ in $0,05\% \text{NaN}_3$ -haltiger Pufferlösung gleichermaßen verwendet. Um mögliche zytotoxische Nebeneffekte durch NaN_3 auszuschließen wurden im weiteren Verlauf alle genannten Antikörper und F(ab')₂-Fragmente durch Umpufferung in reinem PBS gelöst (Tab. 12).

Tabelle 12: Details zu aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂

Name	Klon	Isotyp	Antigen	Puffer 1	Puffer 2
aTZRmu-IgG	H57-597	Armen. Hamster IgG ₂ λ 1	mTZR β	$\leq 0,09\% \text{NaN}_3$	reines PBS
aTZRmu-F(ab')₂	H57-597	Armen. Hamster IgG ₂ λ 1-F(ab') ₂	mTZR β	$0,05\% \text{NaN}_3$	reines PBS
Isotyp-IgG	Ha4/8	Armen. Hamster IgG ₂ λ 1	KLH	$\leq 0,09\% \text{NaN}_3$	reines PBS
Isotyp-F(ab')₂	Ha4/8	Armen. Hamster IgG ₂ λ 1-F(ab') ₂	KLH	$0,05\% \text{NaN}_3$	reines PBS

5.1.2 F(ab')₂-Reinheit

Insgesamt wurden sechs verschiedene aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen (Tab. 13) jeweils aus aTZRmu-IgG hergestellt von Dr. Nahid Yusufi und zeitnah verwendet. Mögliche Anteile an residualem Vollantikörper wurden mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (Abb. 1). Dabei ließ sich insbesondere bei den Präparationen P3 und P5 aTZRmu-IgG nachweisen, während sich in den übrigen Präparationen der Gehalt an Vollantikörper an der Grenze der Nachweisbarkeit im Vergleich zu den Negativkontrollen zeigte. Ein geringer Anteil an residualem Vollantikörper konnte jedoch für alle aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen nicht ausgeschlossen werden. Daher ist in den folgenden Versuchen ein möglicher Einfluss residualen Vollantikörpers in den aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen zu berücksichtigen.

Tabelle 13: aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen

Name	aTZRmu-F(ab') ₂ -Konzentration (Puffer)
P1	4,4mg/ml (0,05%NaN ₃)
P2	4,68mg/ml (0,05%NaN ₃)
P3	1,3 mg/ml (0,05%NaN ₃)
P4	3,92mg/ml (0,05%NaN ₃); 3,13mg/ml (PBS)
P5	2,6 mg/ml (PBS)
P6	2,45 mg/ml (PBS)

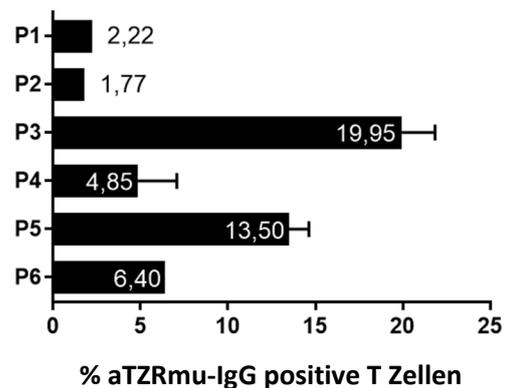


Abbildung 1: Anteil residualen Vollantikörpers in den aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen.

TZRmu-exprimierende humane T Zellen wurden über Nacht mit den jeweiligen aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen in einer Konzentration von 500nM inkubiert und oberflächengebundener aTZRmu-IgG mit Hilfe eines sekundären FITC-anti-Hamster IgG2/3-Antikörpers in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 1-3 Messungen je Präparation mit Standardabweichung. Nach Inkubation mit 500nM Isotyp-IgG oder ohne Antikörper-Zugabe zeigten sich jeweils < 1% aTZRmu-IgG positive T Zellen in der Färbung mit sekundärem FITC-anti-Hamster IgG2/3-Antikörper in der Durchflusszytometrie.

5.2 Zellcharakterisierung

Eine genetische Modifizierung humaner T Zellen erfolgte durch retrovirale Transduktion des TZR 2.5D6, der von Klar et al. ausführlich charakterisiert wurde (Klar, Schober et al. 2014). Seine variable Region bindet unter der Voraussetzung einer Präsentation auf HLA-B*07:02 (HLA-B7) spezifisch an ein Peptid (MPO5) der Myeloperoxidase, die im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung oder maligner Entartung exprimiert wird. Die konstante Region des verwendeten humanen TZR 2.5D6-Konstruktes wurde murinisiert und bietet daher eine Bindungsstelle für aTZRmu-IgG.

Als Ausgangsmaterial für die retrovirale Transduktion wurden humane, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gesunder Spender verwendet, die unter für T Zellen optimierten Kulturbedingungen überwiegend aus CD8+ und CD4+ T Zellen bestanden.

Der Prozentsatz erfolgreich transduzierter T Zellen wurde in der Durchflusszytometrie mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppeltem aTZRmu-IgG (F-aTZRmu-IgG) gemessen (Abb. 2), bevor sie mit freiem aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ in den unten beschriebenen Stimulationsansätzen inkubiert und analysiert wurden.

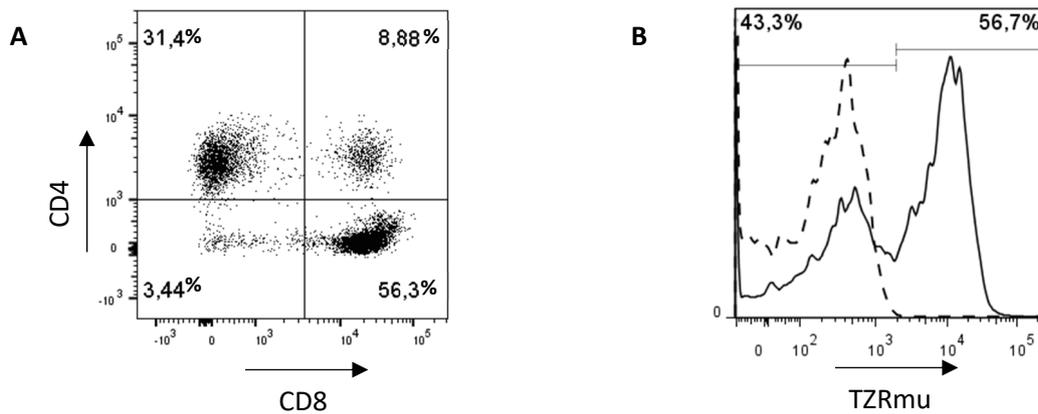


Abbildung 2: Charakterisierung TZR 2.5D6-transduzierter PBMC.

(A) Charakterisierung humaner PBMC, die aus dem Blut gesunder Spender gewonnen und für mindestens eine Woche unter für T Zellen optimierten Bedingungen kultiviert wurden.

(B) Repräsentative Auswertung der TZR 2.5D6-Expression in transduzierten (schwarze Linie) und ohne Vektor (leer)-transduzierten (gestrichelte Linie) PBMC, gemessen mit Hilfe einer F-aTZRmu-IgG Färbung in der Durchflusszytometrie.

Im Hinblick auf die in vivo-Analysen wurden weiterhin CD8+ zentrale Gedächtnis-T Zellen (T_{cm}) aus humanen PBMC gesunder Spender isoliert und retroviral transduziert. Hier wurde ebenfalls das TZR 2.5D6-Konstrukt verwendet (Abb. 3).

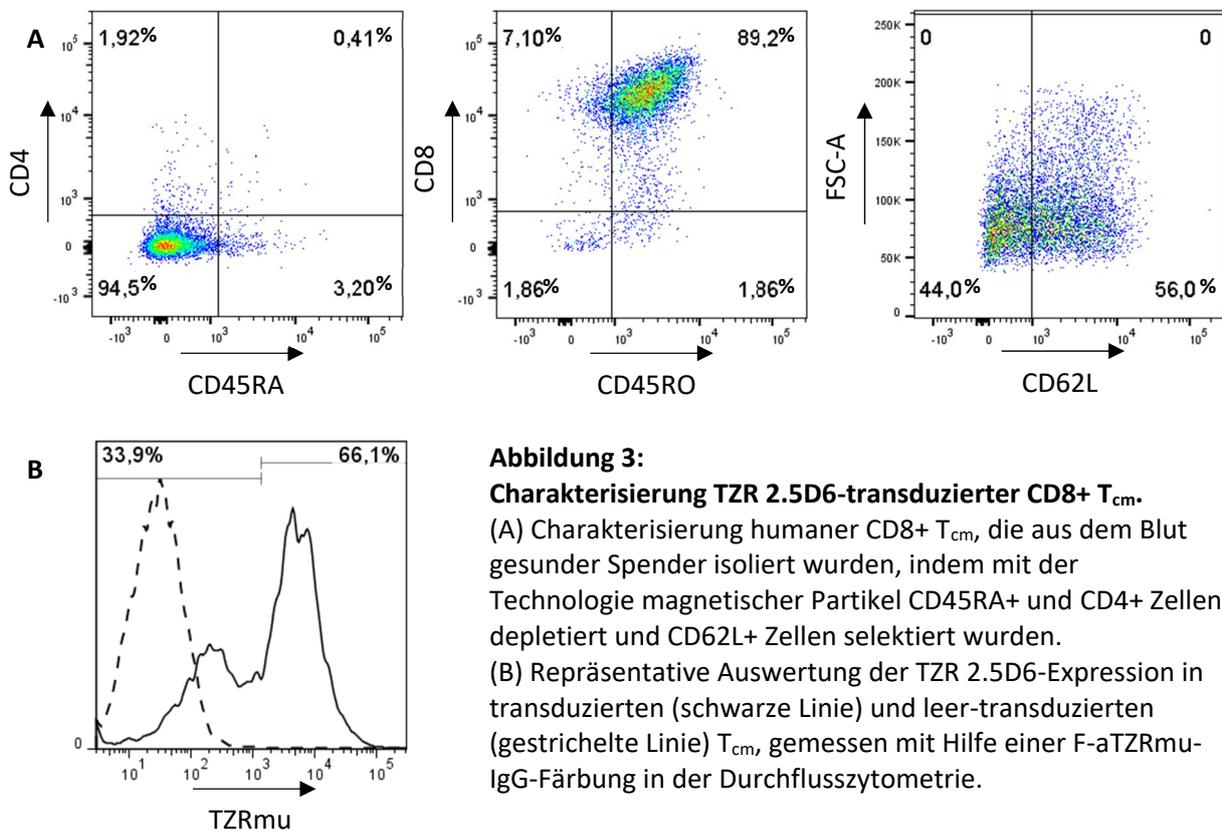


Abbildung 3:

Charakterisierung TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T_{cm} .

(A) Charakterisierung humaner CD8+ T_{cm} , die aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden, indem mit der Technologie magnetischer Partikel CD45RA+ und CD4+ Zellen depletiert und CD62L+ Zellen selektiert wurden.

(B) Repräsentative Auswertung der TZR 2.5D6-Expression in transduzierten (schwarze Linie) und leer-transduzierten (gestrichelte Linie) T_{cm} , gemessen mit Hilfe einer F-aTZRmu-IgG-Färbung in der Durchflusszytometrie.

Um eine Antikörper-unabhängige Nachweismethode des Transduktionserfolges in der Durchflusszytometrie zu ergänzen, wurde zudem mit einem Vektor transduziert, auf dem das TZR 2.5D6-Konstrukt über ein T2A-Element an ein Phytochrom-basiertes nahe-infrarot-Fluoreszenz-Protein (iRFP) gekoppelt wurde (Mall, Yusufi et al. 2016) (Abb. 4). Dieser Vektor wurde von Henrique Bianchi für die retrovirale Transduktion in humane T Zellen optimiert und ermöglichte dank der hohen intrazellulären Stabilität und geringen Zytotoxizität des iRFP (Filonov, Piatkevich et al. 2011) eine gut nachweisbare Markierung transduzierter T Zellen während deren Expansionsphase über mindestens drei Wochen (Daten nicht gezeigt).

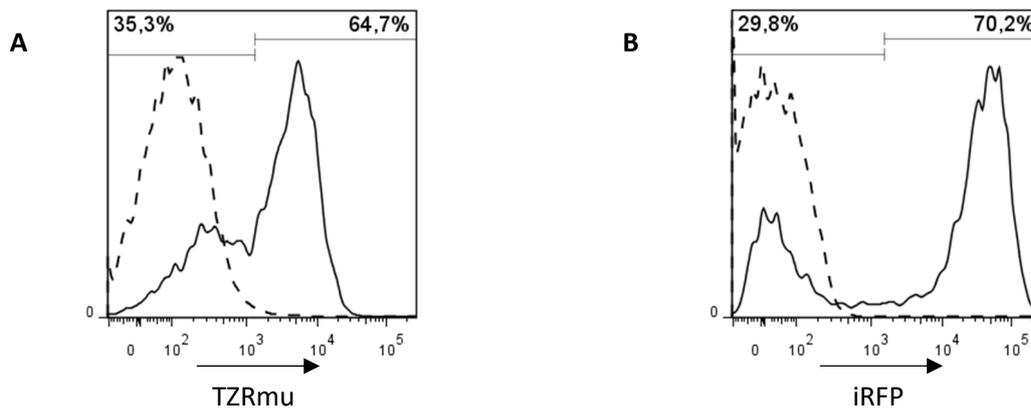


Abbildung 4: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm}.

(A-B) Repräsentative Auswertung zum Nachweis der Transduktion und Expression von TZR 2.5D6 in TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten (schwarze Linie) und leer-transduzierten (gestrichelte Linie) T_{cm}, gemessen mit Hilfe einer F-aTZRmu-IgG-Färbung in der Durchflusszytometrie (A) oder in Gestalt des iRFP-Signals in der Durchflusszytometrie (B).

5.3 Stimulation in vitro

5.3.1 Apoptose

Als rekurrendes Merkmal einer Behandlung mit aTZRmu-IgG in vivo wurde eine Depletion muriner T Zellen beschrieben, die meist zuvorderst eine Reduktion CD4+ T Zellen widerspiegelte (Deng, Khattar et al. 2014; Miyahara, Khattar et al. 2012; Drobyski, Majewski 1996). Da basierend auf CD8+ T_{cm} die Anti-Tumor-Reaktion des TZR 2.5D6 in präklinischen Mausmodellen beobachtet wurde (Klar, Schober et al. 2014), stellte sich vorrangig die Frage, ob eine relevante Zytotoxizität des aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ gegen humane, transgene CD8+ T_{cm} besteht. Daher wurde ein Nachweisverfahren früher und später Apoptosestadien der Zellen in der Durchflusszytometrie etabliert (Abb. 5A) und für TZR 2.5D6-transduzierte CD8+ T_{cm} nach 12 Stunden (h) Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des aTZRmu-IgG, aTZRmu-F(ab')₂, Isotyp-IgG oder Isotyp-F(ab')₂ in Pufferlösungen mit NaN₃ angewendet, im Vergleich zu leer-transduzierten CD8+ T_{cm}. Entscheidend für stabile verwertbare Ergebnisse war hier eine Supplementierung des Inkubationsmediums mit hIL-7 und hIL-15. Nach Inkubation mit zunehmender Konzentration an aTZRmu-IgG stieg der Anteil apoptotischer Zellen der transduzierten T_{cm} stärker als mit Isotyp-IgG und im Vergleich zu leer-transduzierten T_{cm}, während sich dieser Effekt nach Inkubation mit aTZRmu-F(ab')₂ nicht darstellte (Abb. 5). Dies deutete auf eine spezifisch TZRmu-vermittelte Zytotoxizität des aTZRmu-IgG hin, wobei der Anstieg der Apoptose bei 500nM Isotyp-IgG und 500nM aTZRmu-IgG in der leer-transduzierten Kontrolle auch auf unspezifische Begleitfaktoren hinwies.

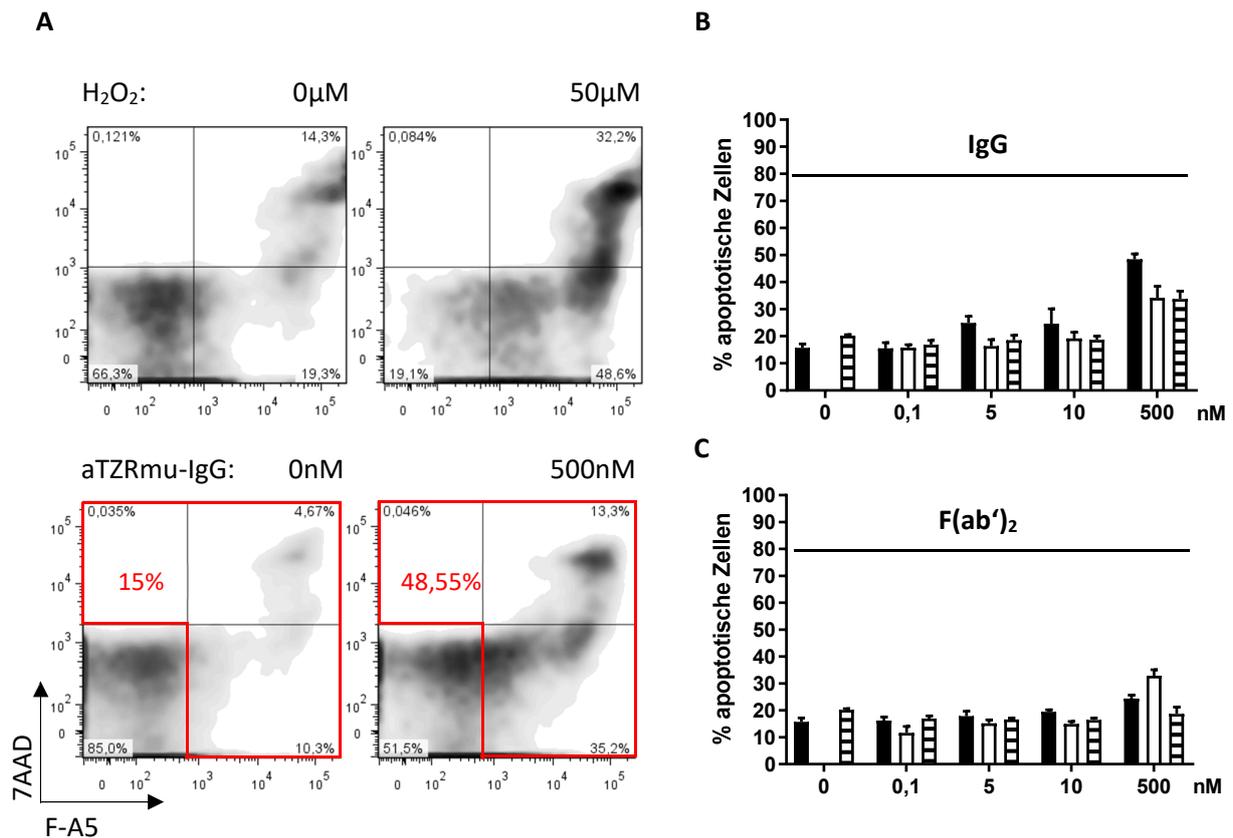


Abbildung 5: Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ P2 in vitro.

(A) Repräsentative Apoptose-Messung durch Markierung von Zellen mit negativ geladenen Außenmembranen im Zuge eines frühen Apoptosestadiums mit Fluorochrom-gekoppeltem Annexin V (F-A5) und Zellen nach Verlust der Membranintegrität mit 7-Aminoactinomycin D (7AAD) in der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind T Zellen ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und nach Apoptoseinduktion durch Inkubation mit 50μM H₂O₂ über Nacht (obere Zeile) im Vergleich zu TZR 2.5D6-transduzierten CD8+ T_{cm} ohne Zugabe von aTZRmu-IgG und mit Zugabe von 500nM aTZRmu-IgG in Pufferlösung mit NaN₃, inkubiert für 12h (untere Zeile). Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ergibt sich aus der Summe F-A5+ und/oder 7AAD+ Zellen (vgl. roter Rahmen).

(B) Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG (gestreifte Balken) inkubiert und gemessen.

(C) Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-F(ab')₂ P2 (schwarze Balken) oder Isotyp-F(ab')₂ (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-F(ab')₂ P2 (gestreifte Balken) inkubiert und gemessen.

Um das gesamte zytotoxische Potential des aTZRmu-IgG zu untersuchen, wurde die Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter PBMC, mit einem hohen Anteil CD4+ T Zellen (Abb. 2), unter vergleichbaren Bedingungen wie bei den CD8+ T_{cm} analysiert. Außerdem erfolgte eine längere Inkubation mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ für drei Tage (3d).

Nach 12h Inkubation zeigte sich eine stärkere Zunahme apoptotischer Zellen bei den transduzierten PBMC mit steigenden aTZRmu-IgG-Konzentrationen, im Vergleich zu den Isotyp-IgG-Kontrollen, ohne dass die Differenz, die möglicherweise auf einer spezifischen aTZRmu-IgG bedingten Apoptose

beruhte, stärker hervortrat als bei den CD8+ T_{cm} (Abb. 5 und 6). Am dritten Tag der Koinkubation transduzierter PBMC mit aTZRmu-IgG war der Anteil apoptotischer Zellen erneut gestiegen, allerdings für die Maximalkonzentration von 500nM in nahezu gleichem Ausmaß wie mit dem Isotyp-IgG. Zu erwähnen ist die verwendete Zellkultur aus ca. 52% TZR 2.5D6-transduzierten PBMC. Der aTZRmu-IgG-bindende Anteil (ca. 52%) könnte bei 500nM aTZRmu-IgG bereits nach 12h überwiegend depletiert gewesen sein (41,5-49,9%, Mittelwert 45,3% apoptotische Zellen, siehe Abb. 6), sodass die Differenz zur 500nM Isotyp-IgG-Kontrolle im Verlauf stagnierte, während sich bei 10nM Antikörpern nach 3d eine höhere Differenz zeigte als nach 12h. Zudem fiel insbesondere nach 3d eine relativ hohe Basisapoptose in der unbehandelten Kontrolle ins Auge, die den Anteil apoptotischer Zellen in Proben mit minimalen Protein-Konzentrationen deutlich übertraf (Abb. 6). Falls es sich dabei nicht um einen systematischen Fehler handelt, könnte dies ein Hinweis auf allgemeine, stimulierende Effekte der Protein-Zugabe sein, die in Form einer kompensierenden Proliferation möglicherweise mit den Apoptose-Ergebnissen interferierten.

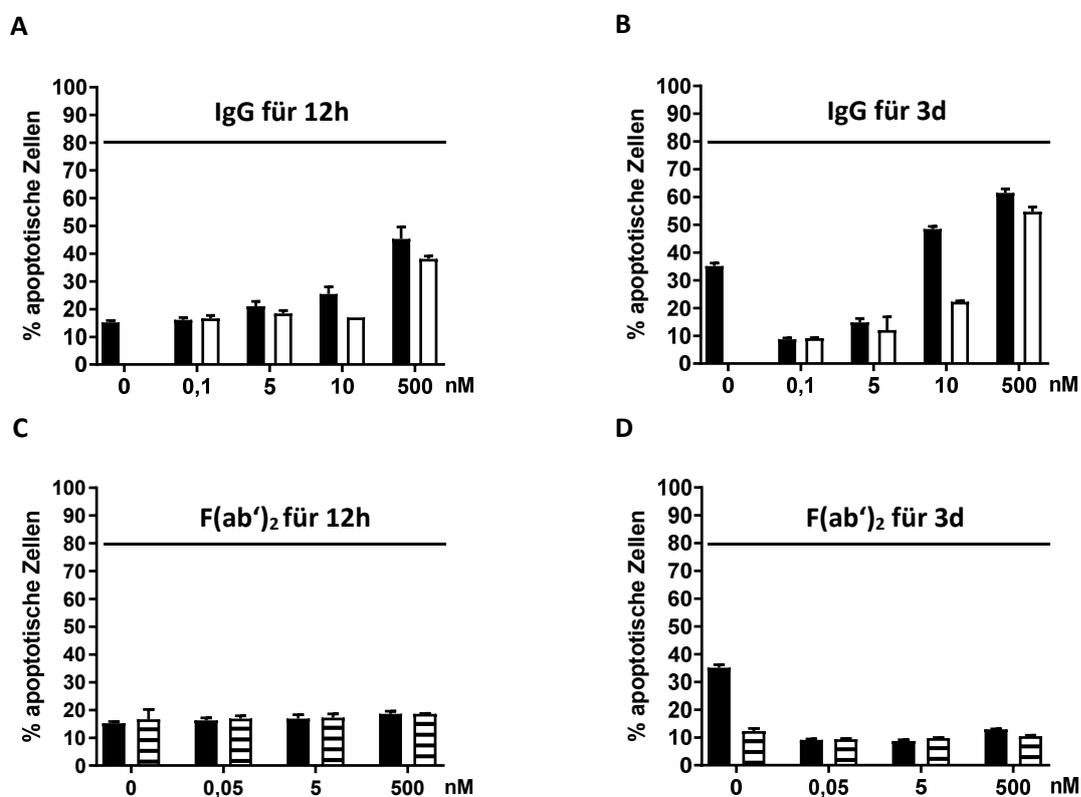


Abbildung 6: Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h bzw. 3d Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ P3 in vitro.

(A-B) Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h (A) oder 3d (B) Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃.

(C-D) Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h (C) oder 3d (D) Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-F(ab')₂ P3 (schwarze Balken) in Pufferlösung mit NaN₃. Leer-transduzierte PBMC wurden gleichermaßen mit aTZRmu-F(ab')₂ P3 (gestreifte Balken) inkubiert und gemessen.

5.3.2 Proliferation

Für die Analyse der Proliferation in der Durchflusszytometrie wurde eine CellTrace Violet (CTV)-Färbung ausgewählt, deren Prinzip einer permanenten Zellfärbung durch Kopplung an intrazelluläre Proteine einer CFSE-Färbung entspricht, die jedoch im Beobachtungszeitraum eine geringere Zytotoxizität aufwies. Im Vergleich der Zell-Generierungen in Form der CTV- bzw. CFSE-Spitzen bei abnehmenden Intensitäten zeigten beide Färbungen sehr ähnliche Intensitätsverschiebungen und eine gleichwertige Abgrenzbarkeit (Abb. 7A). Die Proliferation TZR 2.5D6-transduzierter PBMC unter aTZRmu-Bindung wurde sowohl durch CTV-Messungen in der Durchflusszytometrie als auch durch manuelle Zellzählung nach 12h und 3d Inkubation kontrolliert. In der CTV-Färbung wurde ersichtlich in welchem Anteil der Zellen einer Probe mindestens eine Zellteilung stattgefunden hat und wie groß der Anteil nicht proliferierender Zellen war. Deutliche Unterschiede zeigten sich nach 3d Inkubation mit aTZRmu-IgG und Isotyp-IgG, deren hohe Konzentrationen weitgehend unspezifisch die Zellproliferation hemmten, während bei niedrigen Antikörper-Konzentrationen bis 5nM der Großteil aller Zellen proliferiert war, wie dies auch bei allen F(ab')₂-Konzentrationen der Fall war (Abb. 7B, C). Obwohl in der begleitenden unbehandelten Kontrolle transduzierter PBMC eine deutlich geringere proliferative Zellfraktion vorlag, erschien aufgrund der Konzentration- und Protein-übergreifenden Übereinstimmung der übrigen proliferierten Proben ein spezifischer proliferativer Stimulus unwahrscheinlich und eher eine isolierte Mangelsituation der einen Kontrolle passend, die auch in der Langzeitanalyse der prozentualen Apoptose erkennbar war (Abb. 6) und vernachlässigt wurde. Außerdem spiegelte die beobachtete Proliferation überwiegend eine bis zwei Zellteilungen in drei Tagen wider, was der T Zellproliferation unter Standardkulturbedingungen mit hIL-7 und hIL-15 entsprach (Abb. 7B, C). Insgesamt konnte so eine unspezifische Proliferationshemmung durch hohe Antikörper-Konzentrationen ohne spezifische proliferative Stimuli in den übrigen Konditionen als Einflussfaktoren auf die Zellzahl, neben der Apoptose, identifiziert werden. Diese Ergebnisse ließen sich anhand der absoluten Zellzahlen bestätigen. Nach 12h zeigte sich eine leichte Verringerung der Zellzahl bei den höheren Antikörperkonzentrationen bei insgesamt geringen Unterschieden. Die Zellzahlen nach 3d, abzüglich der variierenden Ausgangsmittelwerte nach 12h, zeigten eine Stagnation bei hohen Antikörper-Konzentrationen sowie eine deutliche Zunahme bei den übrigen Proben (Abb. 7D).

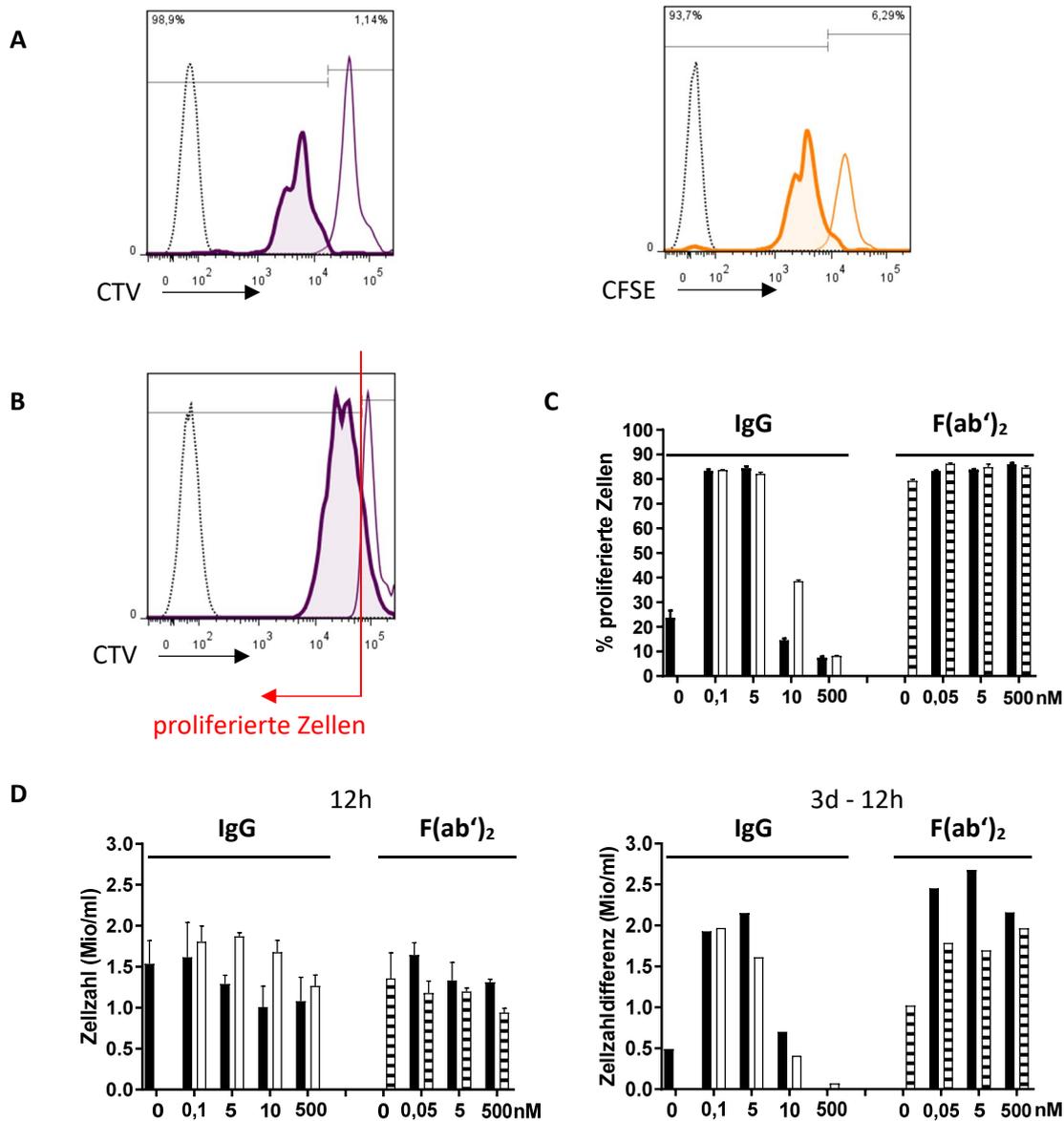


Abbildung 7: Proliferation TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h bzw. 3d Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ P3 in vitro.

(A) Etablierung der CTV-Färbung (lila) als Proliferationsnachweis in der Durchflusszytometrie im Vergleich zu einer CFSE-Färbung (orange) von transduzierten T Zellen unter Stimulation mit CD3/CD28-Dynabeads (dicke farbige Linie) oder ohne Stimulation (dünne farbige Linie) für 3d nach dem jeweiligen Färbungsverfahren, jeweils im Vergleich zu einer ungefärbten Population (gepunktete schwarze Linie).

(B) Repräsentative Auswertung der CTV-Fluoreszenz TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 3d Inkubation mit 500nM aTZRmu-IgG (dünne lila Linie) oder 500nM aTZRmu-F(ab')₂ P3 (dicke lila Linie) im Vergleich zu einer ungefärbten Population (gepunktete schwarze Linie).

(C) CTV-basierte Proliferationsmessung TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 3d Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P3 (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃. Leer-transduzierte PBMC wurden gleichermaßen mit aTZRmu-F(ab')₂ P3 (gestreifte Balken) inkubiert und gemessen.

(D) Absolute Zellzahl TZR 2.5D6-transduzierter PBMC nach 12h Inkubation (linke Abb.) und Differenz der Mittelwerte absoluter Zellzahlen nach 3d zu 12h Inkubation (rechte Abb.) mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P3 (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃. Leer-transduzierte PBMC wurden gleichermaßen mit aTZRmu-F(ab')₂ P3 (gestreifte Balken) inkubiert und gemessen.

5.3.4 Funktionalität

Um zu untersuchen in welchem Maße die Funktionalität TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen nach Inkubation mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ beeinträchtigt ist, wurden als Zielzellen die Zelllinie ML2-B7 verwendet im Vergleich zur Zelllinie ML2-B15, die aufgrund des Fehlens von HLA-B7 nicht erkannt werden sollte. Denn ausgehend jeweils von der Zelllinie ML2 einer akuten myeloischen Leukämie, die endogen MPO exprimiert (Klar, Schober et al. 2014), erfolgt die Erkennung der MPO-Peptide in Kombination mit HLA-B7 (ML2-B7), aber nicht HLA-B15 (ML2-B15) in Folge einer retroviralen Transduktion der ML2 mit dem entsprechenden GFP-gekoppelten HLA-Gen in Kombination mit einer GFP-basierten Sortierung und Grenzverdünnungsklonierung (Mall 2016).

Um unmittelbare sowie verzögerte Effekte zu prüfen, führten wir zum einen eine zeitgleiche Koinkubation von TZR 2.5D6-transduzierten T Zellen mit aTZRmu-IgG oder Isotyp-IgG und ML2-B7 für einen Zeitraum von 12h und 20h durch. Darüber hinaus erfolgte auch eine sequentielle Stimulation, bei der nach einer initialen Wirkphase des Antikörpers von 12h ML2-B7 für die nächsten 20h bzw. 24h zugegeben wurden. Für beide Ansätze wurde nach den jeweiligen Inkubationszeiten der Anteil verbliebener GFP+ Tumorzellen in der Durchflusszytometrie verglichen.

Nach 12h Koinkubation zeigte sich die Anti-Tumor-Reaktivität der T Zellen beeinträchtigt bei den 500nM Antikörper-Konzentrationen, die im gleichen Zeitraum zuvor auch die stärkste Apoptose-Induktion transduzierter T Zellen hervorriefen. Trotz dieser Verzögerung depletierten die überlebenden TZR 2.5D6-transduzierten T Zellen dennoch nahezu vollständig die Tumorzellen in allen Proben nach längerer Inkubationszeit. Dass das Überleben funktioneller transduzierter T Zellen nicht unmittelbar an die Anwesenheit der Tumorzellen gekoppelt ist, zeigten ähnliche Ergebnisse bei den zeitversetzten Stimulationen, in denen sich eine deutliche Differenz zwischen 500nM aTZRmu-IgG und den übrigen Proben nach 20h Anti-Tumor-Reaktion der T Zellen zeigte, möglicherweise aufgrund der fortgeschritteneren Apoptose. Jedoch überlebten wiederum ausreichend funktionelle transduzierte T Zellen um die Tumorzellen nach 24h nahezu vollständig zu depletieren. Bei sequentieller Stimulation TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen mit verschiedenen aTZRmu-F(ab')₂-Konzentrationen und ML2-B7 zeigten die T Zellen die gleiche Zytotoxizität wie in der unbehandelten Kontrolle nach 20h ebenso wie 24h Anti-Tumor-Reaktion (Abb. 8). Die Funktionalität TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen wurde durch aTZRmu-F(ab')₂ nicht erkennbar beeinflusst und selbst unter dem Einfluss hoher Konzentrationen von aTZRmu-IgG überlebten genügend funktionelle transduzierte T Zellen, um eine Tumorzellreduktion zu bewirken.

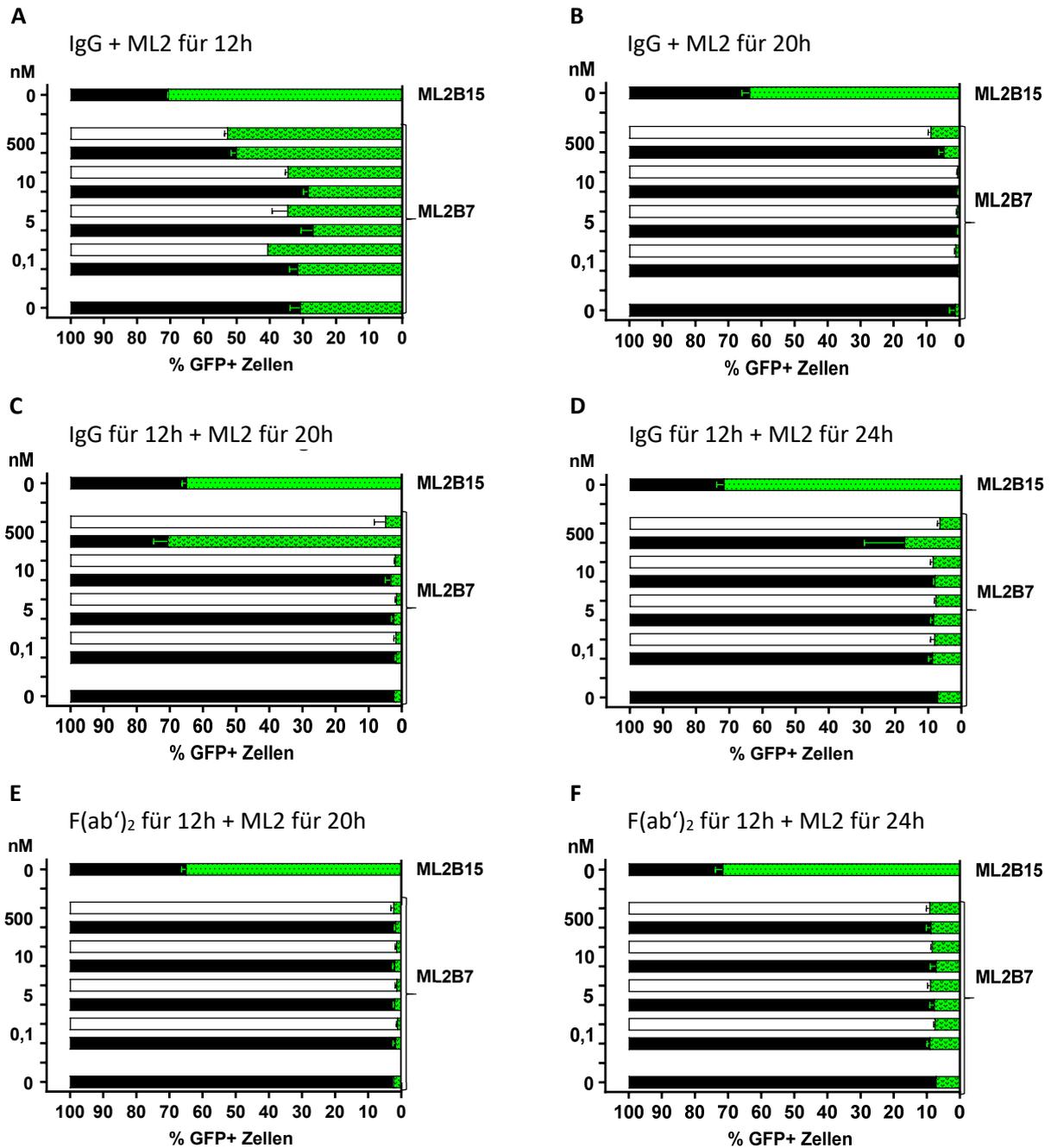


Abbildung 8: Funktionalität TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen in vitro.

(A-F) Der Anteil GFP+ Tumorzellen ML2-B15 oder ML2-B7 (grüne Balken) in der Lymphozyten-Zellpopulation wurde in der Durchflusszytometrie gemessen nach:

(A-B) Koinkubation TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃ und ML2-B7 oder ML2-B15 im Zellverhältnis 1:1 für 12h (A) bzw. 20h (B).

(C-D) Inkubation TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃ für 12h mit anschließender Zugabe der gleichen Zellzahl ML2-B7 oder ML2-B15 wie verwendete T Zellen für weitere 20h (C) bzw. 24h (D).

(E-F) Inkubation TZR 2.5D6-transduzierter T Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an aTZRmu-F(ab')₂ P4 (schwarze Balken) oder Isotyp-F(ab')₂ (weiße Balken) in Pufferlösungen mit NaN₃ für 12h mit anschließender Zugabe der gleichen Zellzahl ML2-B7 oder ML2-B15 wie verwendete T Zellen für weitere 20h (E) bzw. 24h (F).

5.3.5 Aktivierung

Während ein die Funktionalität erhaltender Anteil transduzierter T Zellen unter Behandlung mit aTZRmu-IgG überlebte, ging ein Teil der Zellen in Apoptose über, die mit der Bindung des aTZRmu-IgG an den TZR zusammenhängen könnte. Daher wurde eine Aktivierung aTZRmu-bindender T Zellen in Gestalt ihrer IFN γ -Sekretion im Zusammenhang mit ihrer Apoptose untersucht. Dabei zeigten sowohl CD8+ T $_{cm}$ als auch PBMC, die sowohl CD8+ wie CD4+ T Zellen enthielten, nach TZR 2.5D6-Transduktion bei Inkubation mit steigenden aTZRmu-IgG-Konzentrationen eine stufenartig ansteigende IFN γ -Sekretion, die mit einer Zunahme der Apoptose korrelierte (Abb. 9). In dem ausgewählten Experiment zeigte sich in schwächerer Ausprägung ein vergleichbarer Effekt nach Inkubation mit aTZRmu-F(ab') $_2$ P3. Anzumerken ist die gezeigte Verunreinigung der verwendeten F(ab') $_2$ -Präparation P3 mit fast 20% Vollantikörper (Tab. 1).

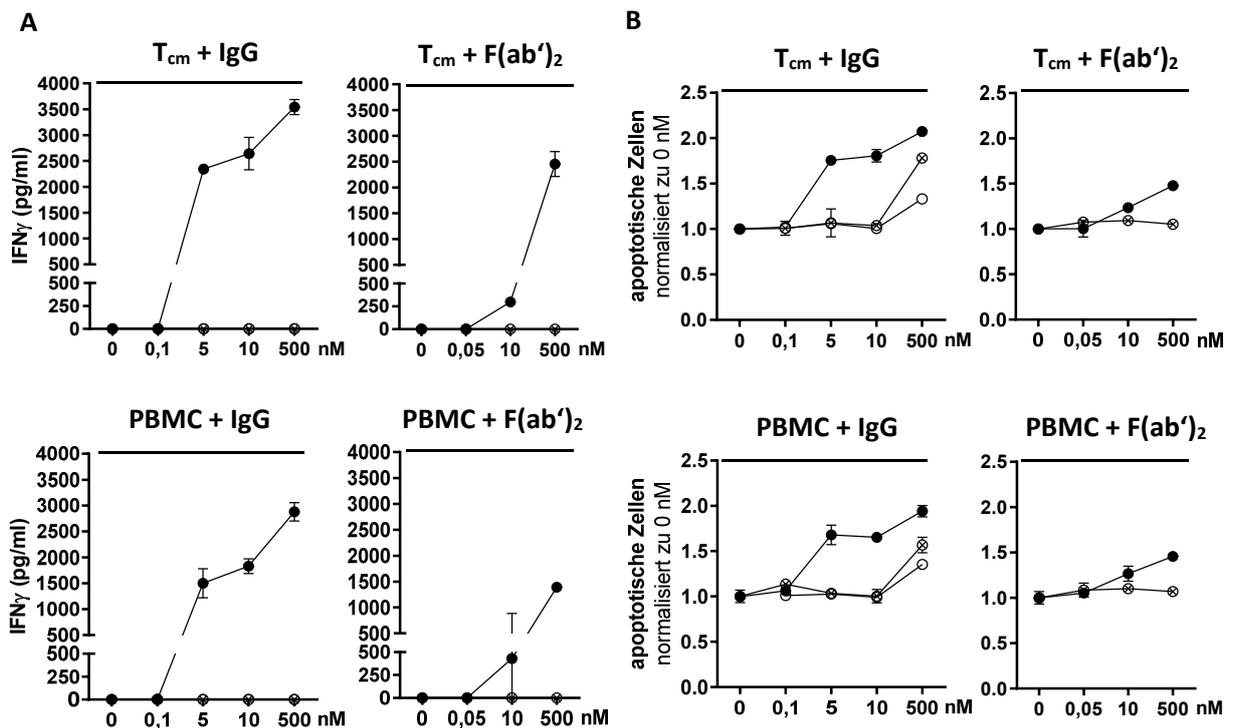


Abbildung 9: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-transduzierter CD8+ T $_{cm}$ und PBMC nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab') $_2$ P3 in vitro.

(A-B) TZR 2.5D6-transduzierte CD8+ T $_{cm}$ (50% F-aTZRmu-IgG+) (obere Abbildungen) und TZR 2.5D6-transduzierte PBMC (35% F-aTZRmu-IgG+) des gleichen Spenders (untere Abbildungen) wurden für 12h mit verschiedenen Konzentrationen von aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab') $_2$ P3 (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte) in Pufferlösung mit NaN $_3$ inkubiert und ihre IFN γ -Sekretion (A) ebenso wie ihr Anteil apoptotischer Zellen, jeweils normalisiert zur unbehandelten Kontrolle 0nM, (B) analysiert. Leer-transduzierte CD8+ T $_{cm}$ (obere Abbildungen) und leer-transduzierte PBMC (untere Abbildungen) wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab') $_2$ P3 (gestrichelte Punkte) inkubiert und gemessen.

5.3.6 Apoptose und Aktivierung mit Antikörpern und deren Derivaten in PBS

Da bei Zugabe der maximalen Mengen aTZRmu-IgG für 12h regelmäßig auch leer-transduzierte T Zellen einen leichten Anstieg der Apoptose zeigten, gleichermaßen wie maximale Mengen des Isotyp-IgG einen solchen bedingten (Abb. 9), sollte abgeklärt werden, ob dies in den unspezifisch hohen Proteinkonzentrationen oder den dafür zugegebenen, höheren Volumina an Antikörper-Lösung, deren Zusammensetzung oder möglichen Verunreinigungen begründet war. Die Pufferlösung aller verwendeten Antikörper und F(ab')₂-Präparationen wurde mittels Umpufferung durch reines PBS ersetzt. Erneute Stimulationen mit aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ für 12h resultierten in einem wiederholten Anstieg der IFN γ -Sekretion mit steigenden aTZRmu-IgG-Konzentrationen, der mit einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen korrelierte (Mall, Yusufi et al. 2016). Da in Folge der Umpufferung der Antikörper keine vermehrte Apoptose mehr in den Kontrollen zu beobachten war, ist von einem negativen Einfluss der Pufferlösungen mit NaN₃ auf das Überleben der T Zellen in den früheren Versuchen auszugehen. Nach 12h Inkubation mit aTZRmu-F(ab')₂-Präparation P4 mit einem nachgewiesenen Anteil des Vollantikörpers <5% war die IFN γ -Sekretion der transduzierten CD8+ T_{cm} bei maximaler F(ab')₂-Konzentration geringfügig erhöht, was keinen Einfluss auf das Überleben der T_{cm} bei im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle unveränderter Apoptose erkennen ließ (Abb. 10) (Mall, Yusufi et al. 2016). In der Zusammenschau der geringen Effekte der aTZRmu-F(ab')₂-Bindung, bezüglich IFN γ -Sekretion und Apoptose, auf transduzierte T Zellen mit der Reinheit der F(ab')₂-Präparationen lassen sich kaum spezifische Einflüsse auf Aktivierung und Lebensdauer der transduzierten T Zellen dem aTZRmu-F(ab')₂ zuordnen. Wohingegen eine Bindung des aTZRmu-IgG an transduzierte CD8+ T_{cm} spezifisch deren IFN γ -Sekretion induzierte und einen Teil der Zellen in die Apoptose überführte (Mall, Yusufi et al. 2016), möglicherweise in Form eines durch Aktivierung induzierten Zelltods (AICD).

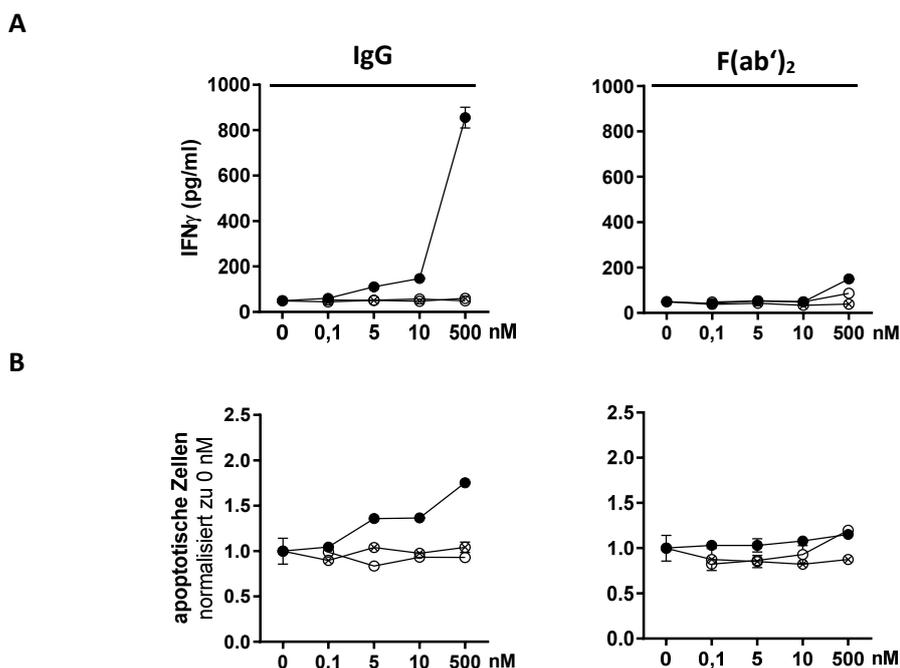


Abbildung 10: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ P4 in vitro nach Umpufferung aller Antikörper bzw. F(ab')₂-Präparate.

(A-B) Messung der IFN γ -Sekretion (A) und Apoptose (B) von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P4 (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG bzw. Isotyp-F(ab')₂ (weiße Punkte) in reinem PBS. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂P4 in reinem PBS (gestrichelte Punkte) inkubiert und gemessen. (Mall, Yusufi et al. 2016)

Um die Voraussetzung einer 12-stündigen Stimulation mit den entsprechenden aTZRmu-IgG-Konzentrationen für deren Wirkung zu überprüfen, wurde der Inkubationszeitraum auf 5 Minuten (min) mit den gleichen Konzentrationen des Vollantikörpers verkürzt, daraufhin nicht-gebundener Antikörper entfernt und wiederum IFN γ -Sekretion und Apoptose nach 12h analysiert. Dabei zeigten die transduzierten CD8+ T $_{cm}$ eine vergleichbare IFN γ -Sekretion und Apoptose wie zuvor, woraus sich die initiale Konzentration und Bindung des aTZRmu-IgG für 5min als ausreichend für dessen Wirkung ableiten ließ. Dies bildete die Grundlage für eine mögliche Übertragbarkeit der in vitro-Ergebnisse in vivo.

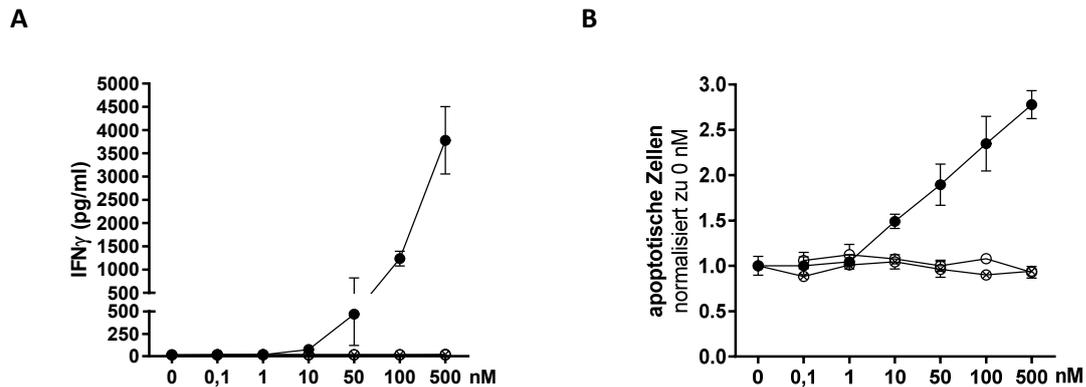


Abbildung 11: IFN γ -Sekretion und Apoptose TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T $_{cm}$ nach 5min Inkubation mit aTZRmu-IgG in den genannten Konzentrationen in vitro.

(A-B) Messung der IFN γ -Sekretion (A) und Apoptose (B) von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten CD8+ T $_{cm}$ nach 5min Inkubation mit den genannten Konzentrationen aTZRmu-IgG (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte) in reinem PBS, anschließendem Waschen der Proben und Inkubation für 12h. Leer-transduzierte CD8+ T $_{cm}$ wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG in reinem PBS (gemusterte Punkte) inkubiert und gemessen.

5.4 Stimulation in vivo

5.4.1 Versuchsaufbau der Stimulation in vivo

Aus den Erkenntnissen der in vitro-Analysen ergab sich die Frage, ob sich die Aktivierung und Apoptose transgener T Zellen durch aTZRmu-IgG in vivo reproduzieren ließe. In dem weniger kontrollierbaren Zytokinmilieu wären Effekte des aTZRmu-IgG möglicherweise abgeschwächt und von geringerer Relevanz. Außerdem erforderte das Potential des aTZRmu-F(ab') $_2$ für eine in vivo-Bildgebung, die mittels radioaktiv markiertem aTZRmu-F(ab') $_2$ spezifisch TZR-transgene T Zellen im PET/CT detektierte (Mall, Yusufi et al. 2016), einen Ausschluss negativer Einflüsse des F(ab') $_2$ -Fragments auf gebundene Zellen in vivo. In Anlehnung an das xenogene Mausmodell, verwendet für die Etablierung der in vivo-Bildgebung, wurde der Einfluss von aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab') $_2$ auf humane TZR-transgene T Zellen in NSG-Mäusen untersucht (Mall, Yusufi et al. 2016). Die Reduktion des körpereigenen Immunsystems, insbesondere muriner T Zellen, B Zellen und NK-Zellen, in Tieren dieser Mauslinie erlaubte ein Anwachsen humaner T Zellen (Shultz, Ishikawa et al. 2007; Ali, Flutter et al. 2012). Außerdem wurde das Anwachsen der T Zellen durch niedrigdosierte Ganzkörperbestrahlung mit 1Gy vor Administration der humanen T Zellen und anschließend begleitende Injektionen bestrahlter NSO-IL-15-Zellen, die humanes IL-15 produzieren, in die Bauchhöhle weiter verbessert (Wang, Berger et al. 2011). Unter den genannten Bedingungen wurden humane TZR 2.5D6-iRFP-transduzierte CD8+ T $_{cm}$ in

die Schwanzvene von NSG-Mäusen injiziert. Dabei wurde ein Anteil von 40-60% TZR 2.5D6+, PE-aTZRmu-IgG-bindenden T_{cm} in der Durchflusszytometrie vorab angestrebt und im Falle höherer Transduktionsraten durch Zugabe leer-transduzierter T_{cm} reguliert für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse und um unspezifische Effekte ausschließen zu können. Daraufhin folgten gleichermaßen intravenöse Injektionen des aTZRmu-IgG, Isotyp-IgG, aTZRmu-F(ab')₂ oder Isotyp-F(ab')₂ in reinem PBS mit dem Ziel jeweils Blutkonzentrationen von 500nM zu erreichen, entsprechend den maximalen Konzentrationen in den in vitro-Versuchen, bei denen sich die deutlichsten Effekte zeigten. Eine Beobachtung der Versuchstiere erfolgte durch regelmäßige Gewichtskontrolle und Schmerz-Beurteilung gemäß Burkholder et al. (Burkholder, Foltz et al. 2012) unter Berücksichtigung klinischer Zeichen humaner Endpunkte (Animal Research Advisory Committee ARAC 2022). Dies resultierte in eine finale ex vivo-Analyse der Biodistribution humaner T Zellen und ihres Anteils iRFP+ transgener Zellen in ausgewählten Organen mit Hilfe der Durchflusszytometrie sowie der humanen IFN γ -Konzentration des Blutplasmas, die teilweise durch eine ergänzende Blutabnahme auch im Versuchsverlauf beurteilt wurde (Abb. 12). Insgesamt wurden drei derartige in vivo-Experimente durchgeführt.

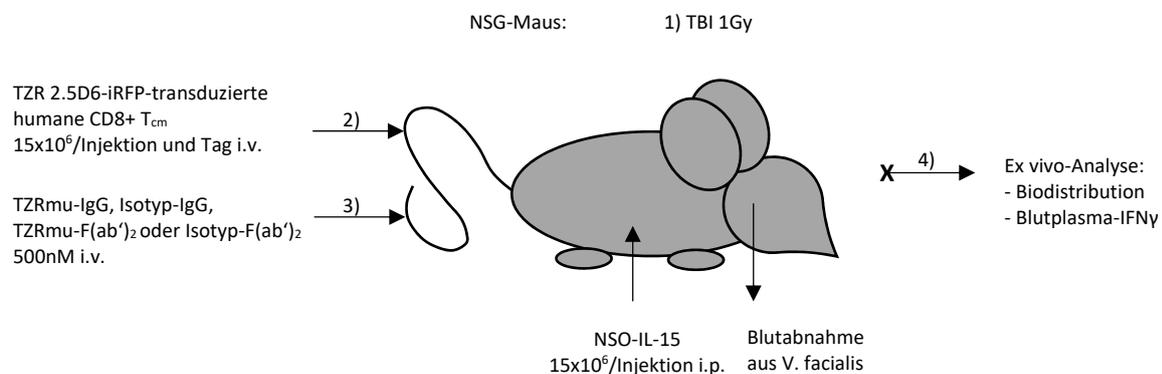


Abbildung 12: Versuchsaufbau zur Analyse des Einflusses von aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ auf TZR 2.5D6-iRFP-transduzierte CD8+ T_{cm} in vivo.

NSG-Mäuse erhielten eine Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation, TBI) mit 1Gy und am Folgetag humane TZR 2.5D6-iRFP-transduzierte CD8+ T_{cm} (40-60% PE-aTZRmu-IgG+), wobei jeweils 15×10^6 T_{cm} pro Tag für maximal zwei Tage in die Schwanzvene injiziert wurden. Im Anschluss wurden für eine angestrebte Blutkonzentration von 500nM, bezogen auf das geschätzte Gesamtblutvolumen von 1,6-2ml (gewichtsadaptiert 70 μ l Blutvolumen/g Körpergewicht), einmalig 126-150 μ g Antikörper bzw. 93-110 μ g F(ab')₂-Fragment in reinem PBS in die Schwanzvene injiziert. Teilweise erfolgte nach 24h eine ergänzende Blutabnahme aus der V. facialis. Für die gesamte Versuchsdauer wurden 3x/Woche 15×10^6 bestrahlte NSO-IL-15-Zellen intraperitoneal injiziert. Dem jeweiligen Endpunkt (X) folgten ex vivo-Analysen der Biodistribution humaner T Zellen und ihres Anteils iRFP+ Zellen in Blut, Milz, Knochenmark (Km) und Lunge mit Hilfe der Durchflusszytometrie sowie Messungen der humanen IFN γ -Konzentration im Blutplasma.

5.4.2 Spezifische Depletion TZR 2.5D6-iRFP+ T_{cm} durch aTZRmu-IgG in vivo

Um das beschriebene Modell als Nachweismethode für Einflüsse auf humane transgene T Zellen in vivo zu testen, sollte primär die Wirkung des aTZRmu-Vollantikörpers, die in vitro bereits nachgewiesen wurde, in vivo untersucht werden. Da die Reaktionen transgener T_{cm} in Stimulationsversuchen mit 500nM aTZRmu-IgG nach 12h in vitro sowohl bezüglich ihrer IFN γ -Sekretion zwischen 856 – 3778 pg/ml als auch bezüglich ihres zusätzlichen Anteils apoptotischer Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, zwischen 15-45% variierten, wurde die möglicherweise auch spenderabhängige Suszeptibilität der verwendeten T_{cm} zuvor in vitro geprüft. Nach der Transduktion humaner CD8+ T_{cm} mit TZR 2.5D6-iRFP zeigten diese nach 12h Inkubation mit 500nM aTZRmu-IgG in vitro eine deutliche IFN γ -Sekretion von 1847pg/ml bei eher geringer Apoptose, die 15% mehr Zellen als in den Kontrollen betraf. Indem jedoch eindeutig spezifische Reaktionen in vitro zu erkennen waren, war ihre Voraussetzung für eine Prüfung der Nachweisbarkeit möglicher Effekte im in vivo-Modell gegeben. Am Tage der ersten T_{cm}-Injektion der Versuchstiere betrug der Anteil TZR 2.5D6+ T_{cm} gemäß PE-aTZRmu-IgG-Färbung (PE-aTZRmu-IgG+) in der Durchflusszytometrie 53%. Gleichzeitig wurde ein Anteil von 57% iRFP+ T_{cm} gemessen (Abb. 13). Insgesamt wurde diese T_{cm}-Injektion an zwei Folgetagen nach TBI der Versuchstiere durchgeführt.

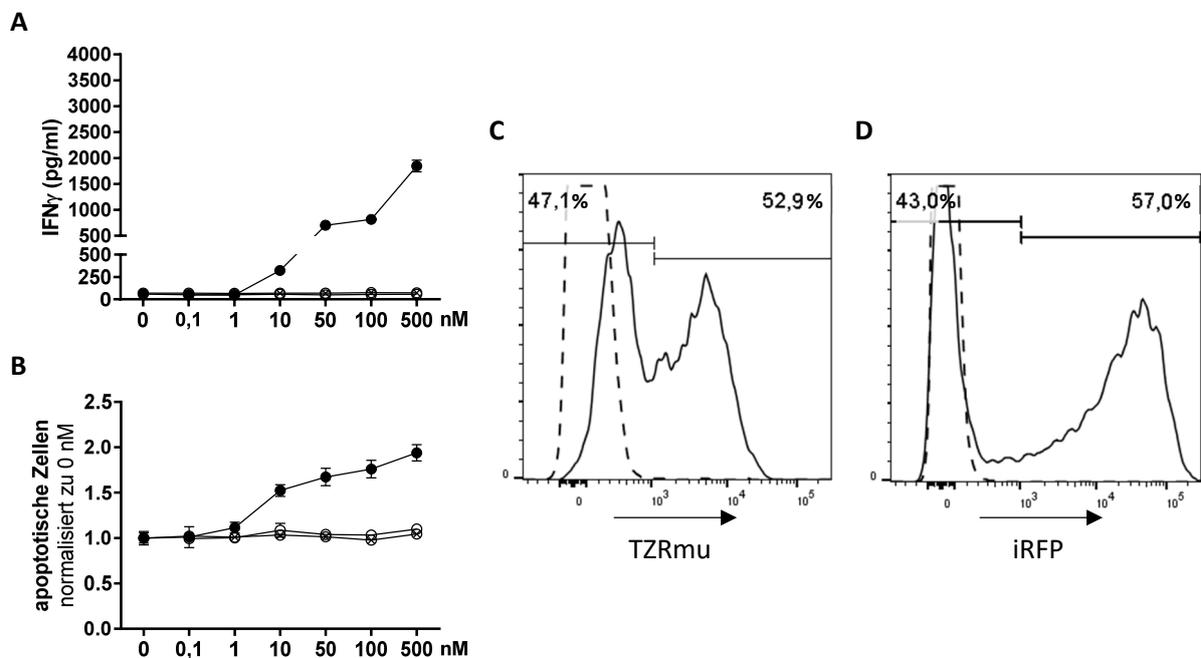


Abbildung 13: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} für das erste in vivo-Experiment (ivE-1) in vitro.

(A-B) Messung der IFN γ -Sekretion (A) und Apoptose (B) von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte) in reinem PBS. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG (gemusterte Punkte) in reinem PBS inkubiert und gemessen.

(C-D) TZR 2.5D6-Expression, gemessen mit Hilfe einer PE-aTZRmu-IgG-Färbung (PE-aTZRmu-IgG+) (C) und mit Hilfe des iRFP-Signals (D), von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten (schwarze Linie) und leer-transduzierten T_{cm} (gepunktete Linie) in der Durchflusszytometrie am Tage ihrer ersten Injektion in die Versuchstiere.

Zum Zeitpunkt der anschließenden Antikörper-Injektion (T0) zeigten die Versuchstiere keine Anzeichen für Schmerz, Stress oder Krankheit. Nach aTZRmu-IgG-Administration wiesen alle vier Tiere dieser Gruppe einen schlechteren Zustand als Tiere nach Isotyp-IgG-Gabe am Folgetag (T1) auf. Unter der Annahme einer höheren Zytokinfreisetzung durch die T Zellen nach Kontakt mit aTZRmu-IgG, wurde die Beobachtung von zwei Tieren mit Anzeichen für geringen Schmerz oder Stress in Form einer leicht verringerten Fellpflege fortgesetzt. Für die anderen zwei aTZRmu-IgG-Tiere wurde der Versuch wegen lethargischen Verhaltens in Kombination mit struppigem Fell beendet und eine ex vivo-Analyse im Vergleich zu einem gesunden Isotyp-IgG-Tier durchgeführt. Nachdem über Nacht das aTZRmu-IgG-Tier #2 verstorben war, wurde aufgrund des fortschreitenden Gewichtsverlusts des letzten aTZRmu-IgG-Tieres bei jedoch uneingeschränkter Aktivität der Versuch vier Tage nach Antikörper-Gabe (T4) vorsorglich beendet (Tab. 14).

Tabelle 14: Beobachtung der Versuchstiere in ivE-1

Es wurden die Zeitpunkte der Beobachtung der Versuchstiere durch Schmerz-Beurteilung und Gewichtskontrolle unter Berücksichtigung klinischer Zeichen humaner Endpunkte mit relevanten Ergebnissen für den Versuchsverlauf (T0, T1, T4) dargestellt.

	T0		T1		T4		
	S	K	S	K	S	K	
♂ aTZRmu-IgG #1	1)	-	2)	-	1)	A ->X	Schmerz-Beurteilung (S) 1) Keine Anzeichen von Schmerz oder Stress 2) geringer Schmerz und Stress 3) moderater Schmerz und Stress 4) starker Schmerz und Stress
♂ aTZRmu-IgG #2	1)	-	2)	-	tot im Käfig		
♀ aTZRmu-IgG #3	1)	-	3)	B,C ->X			
♀ aTZRmu-IgG #4	1)	-	3)	B,C ->X			
♂ Isotyp-IgG #1	1)	-	1)	-	1)	- ->X	Klinische Zeichen (K) für den Endpunkt (X), die im Versuchsverlauf auftraten A schneller/ fortschreitender Gewichtsverlust B struppiges Fell C Lethargie
♂ Isotyp-IgG #2	1)	-	1)	-	1)	- ->X	
♀ Isotyp-IgG #3	1)	-	1)	- ->X			
♀ Isotyp-IgG #4	1)	-	1)	-	1)	- ->X	

♂ = männlich
♀ = weiblich

Die ex vivo-Analysen der Biodistribution humaner T Zellen an T1 und T4 zeigten reduzierte Anteile iRFP+ Zellen in den Organen der aTZRmu-IgG-Tiere. Dabei war im Blut dieser Tiere mit 40% iRFP+ Zellen ihr geringster Anteil nachweisbar, im Gegensatz zu einem weitgehend konstanten Anteil von ca. 60% iRFP+ Zellen in den Organen der Isotyp-IgG-Tiere, näherungsweise entsprechend der injizierten Zusammensetzung der T_{cm} (Abb. 14B). Gleichzeitig wurde der Anteil iRFP+ transgener Zellen, der sich noch durch PE-aTZRmu-IgG anfärben ließ, das heißt eine freie aTZRmu-Bindungsstelle aufwies, überprüft. Dabei zeigte der Großteil iRFP+ Zellen nach aTZRmu-IgG-Behandlung in vivo keine freie aTZRmu-Bindungsstelle, anders als nach Isotyp-IgG-Gabe, was für eine erfolgreiche und erhaltene aTZRmu-IgG-Bindung an überlebende transgene T_{cm} in vivo spricht oder für eine induzierte TZR-Internalisierung durch aTZRmu-IgG (Abb. 14C). Tatsächlich ließ sich durch sekundäre FITC-anti-Hamster IgG2/3-Antikörper-Färbung in der Durchflusszytometrie an T1 in vivo gebundener Antikörper an den T Zellen beider aTZRmu-IgG-Tiere nachweisen (Abb. 14D). Außerdem fanden sich in den aTZRmu-IgG-Tieren an T1 hohe IFN γ -Spiegel im Blutplasma, während das aTZRmu-IgG-Tier an T4 keine erhöhten IFN γ -Werte aufwies (Abb. 14E).

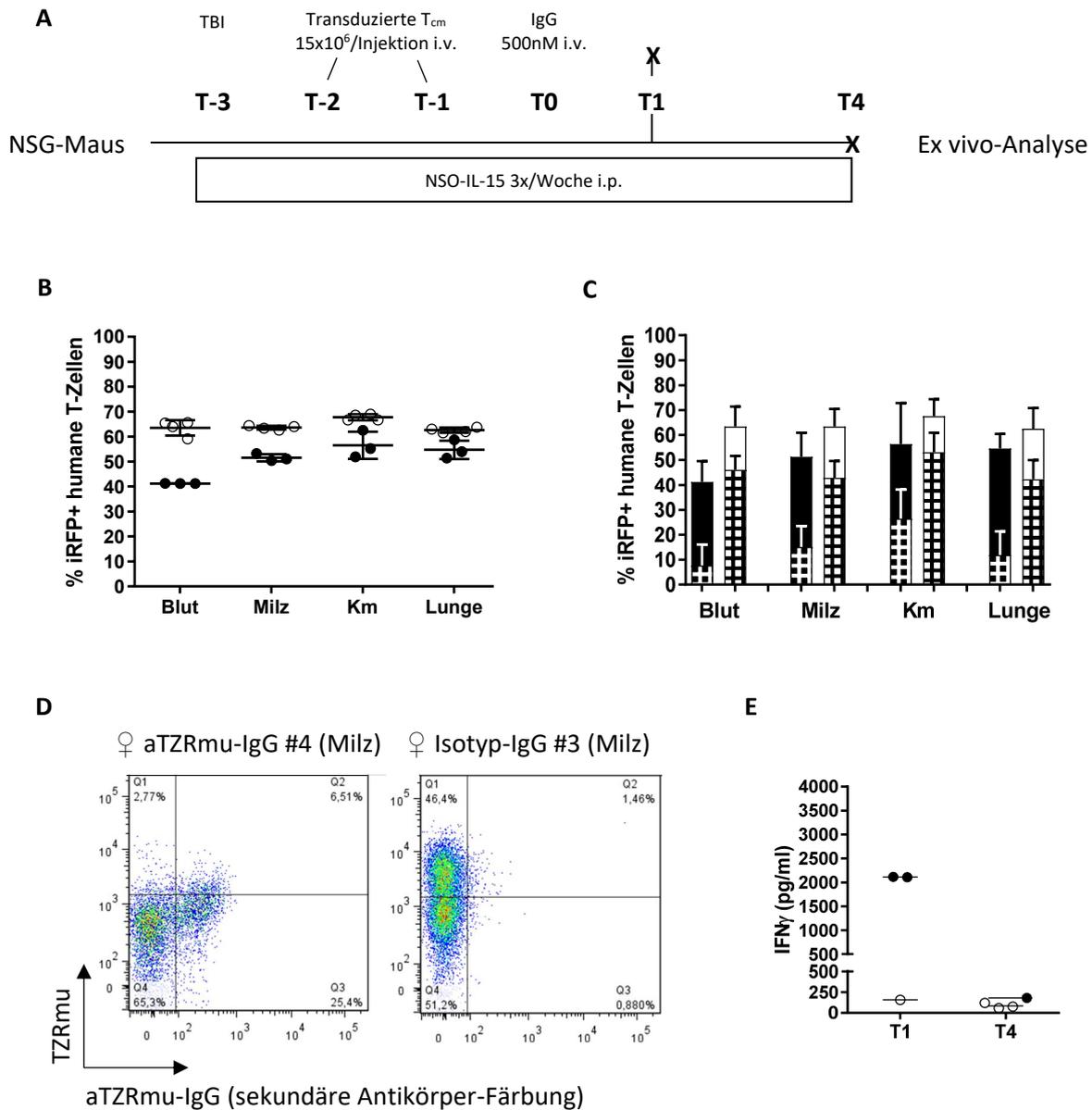


Abbildung 14:

Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG ex vivo.

(A) Überblick über den Versuchsablauf.

(B) Anteil iRFP+ Zellen der humanen T Zellen (7AAD-, hCD45+, hCD3+, hCD5+) in Blut, Milz, Knochenmark (Km) und Lunge der Mäuse an T1 und T4 nach Behandlung mit aTZRmu-IgG (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte).

(C) Anteile der durch PE-aTZRmu-IgG markierbaren (karierten Anteil) und nicht markierbaren (Anteil ohne Musterung) iRFP+ humanen T Zellen (7AAD-, hCD45+, hCD3+, hCD5+, iRFP+) in Blut, Milz, Km und Lunge der Mäuse an T1 und T4 nach Behandlung mit aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken).

(D) exemplarische Abbildungen der Färbung mit sekundärem FITC-anti-Hamster IgG2/3-Antikörper, der in vivo gebundenen aTZRmu-IgG detektiert, und mit PE-aTZRmu-IgG, der freie aTZRmu-Bindungsstellen markiert, auf humanen T Zellen der Milz einer aTZRmu-IgG-Maus (linke Abb.) und einer Isotyp-IgG-Maus (rechte Abb.) an T1.

(E) IFN γ -Konzentration im Blutplasma der aTZRmu-IgG-Tiere (schwarze Punkte) und Isotyp-IgG-Tiere (weiße Punkte) an T1 und T4.

5.4.3 aTZRmu-F(ab')₂ ohne Auswirkung auf TZR 2.5D6-iRFP+ T_{cm} in vivo

Unter Anwendung des unter 5.4.1 beschriebenen Versuchsmodells sollte weiterhin der Einfluss des aTZRmu-F(ab')₂ auf humane transgene T Zellen in vivo, im Vergleich zu seinem Vollantikörper, untersucht werden. Nach Transduktion CD8+ T_{cm} mit TZR 2.5D6-iRFP zeigten diese sowohl eine IFN γ -Sekretion von 996pg/ml als auch einen zusätzlichen Anteil apoptotischer Zellen von 35% im Vergleich zu den Kontrollen, nach 12h Inkubation mit 500nM aTZRmu-IgG in vitro. Eine 12h Inkubation mit 500nM aTZRmu-F(ab')₂ steigerte weder die IFN γ -Sekretion noch die Apoptose transgener T_{cm} in vitro (Abb. 15A, B). Als Reaktion auf die Zustandsverschlechterung der Mäuse nach aTZRmu-IgG-Gabe in ivE-1, vermutlich aufgrund der induzierten Zytokinfreisetzung der bindenden T Zellen, wurde die Zahl übertragener T_{cm} halbiert. Am Tag nach der TBI erfolgte eine einmalige Injektion der T_{cm}, die sich in der Durchflusszytometrie aus 60% PE-aTZRmu-IgG+ im Vergleich zu 69% iRFP+ T_{cm}, und 31% leer-transduzierten T_{cm} zusammensetzten (Abb. 15C, D).

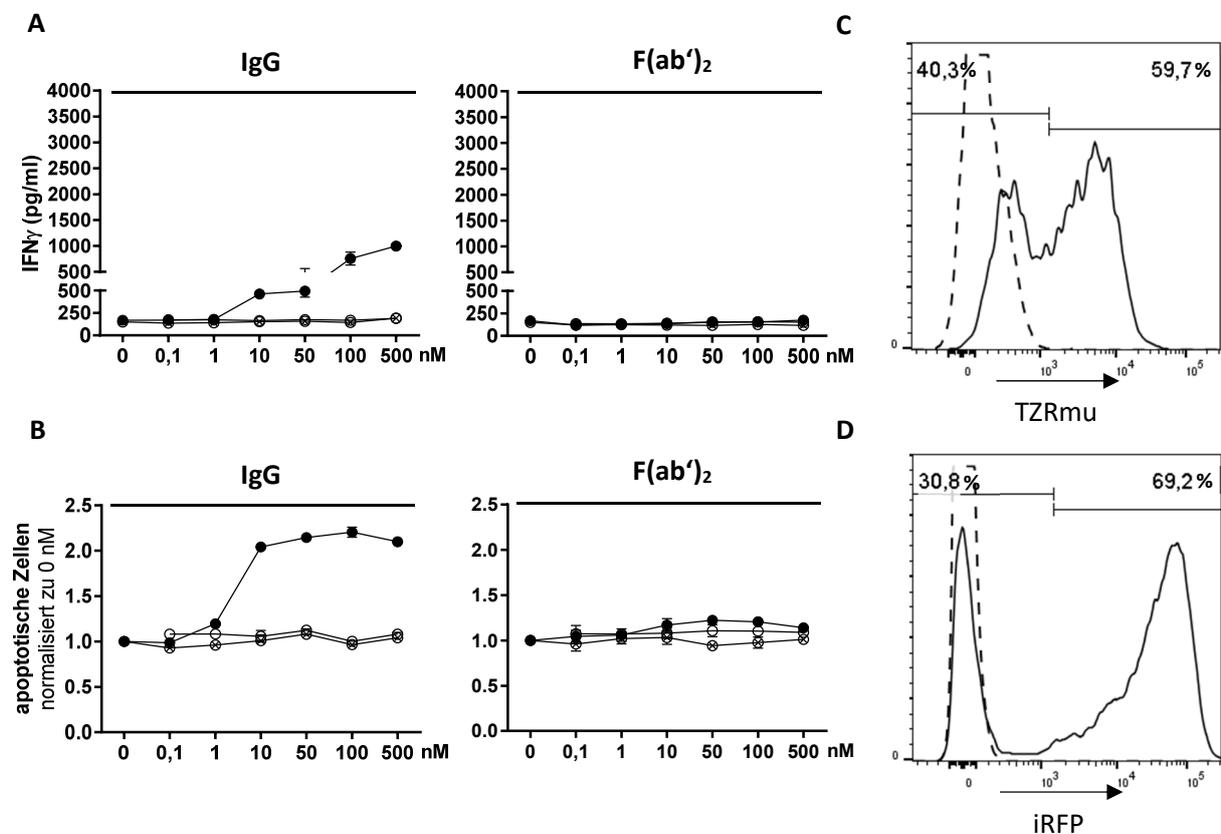


Abbildung 15: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} für das zweite in vivo-Experiment (ivE-2) in vitro.

(A-B) Messung der IFN γ -Sekretion (A) und Apoptose (B) von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P4 (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG bzw. Isotyp-F(ab')₂ (weiße Punkte) in reinem PBS. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P4 (gemusterte Punkte) in reinem PBS inkubiert und gemessen. (C-D) TZR 2.5D6-Expression, gemessen mit Hilfe einer PE-aTZRmu-IgG-Färbung (PE-aTZRmu-IgG+) (C) und mit Hilfe des iRFP-Signals (D), von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten (schwarze Linie) und leer-transduzierten T_{cm} (gepunktete Linie) in der Durchflusszytometrie am Tage ihrer Injektion in die Versuchstiere.

Vor der anschließenden Injektion der Antikörper oder F(ab')₂-Fragmente (T0) waren alle Mäuse gesund und auch im weiteren Versuchsverlauf zeigte keines der Versuchstiere Anzeichen für Schmerz, Stress oder klinische Symptome. Weiterhin ließen sich am Tag nach der Antikörper- oder F(ab')₂-Injektion (T1) in keinem Versuchstier erhöhte IFN γ -Spiegel im Blutplasma im Rahmen einer Blutabnahme aus der V. facialis nachweisen (Daten nicht gezeigt). Mit dem Versuchsendpunkt 6 Tage nach Antikörper- oder F(ab')₂-Injektion (T6) wurde der Zeitraum für eine Effektbildung durch aTZRmu-Bindung um zwei Tage verlängert (Abb. 16A).

Die ex vivo-Analyse des iRFP+ Anteils humaner T Zellen zeigte erneut eine deutliche Reduktion iRFP+ Zellen im Blut der aTZRmu-IgG-Tiere auf 30-50% je nach Individuum, im Gegensatz zu einem Anteil von ca. 70% iRFP+ Zellen in den Organen der Isotyp-IgG-Tiere, näherungsweise entsprechend der injizierten Zusammensetzung der T_{cm}. Außerdem war auch der Anteil iRFP+ Zellen in Milz und Knochenmark der aTZRmu-IgG-Tiere stärker reduziert als in ivE-1 (Abb. 16B). (Mall, Yusufi et al. 2016)

Nach aTZRmu-F(ab')₂-Behandlung blieb der iRFP+ Anteil humaner T Zellen in allen Organen der Tiere bei ca. 70% in nahezu gleicher Weise wie für die Isotyp-F(ab')₂-Tiere (Abb. 16C) (Mall, Yusufi et al. 2016).

Während die überlebenden iRFP+ Zellen der aTZRmu-IgG-Tiere kaum freie aTZRmu-Bindungsstellen mehr aufwiesen, war der Anteil iRFP+ Zellen mit freier aTZRmu-Bindungsstelle in aTZRmu-F(ab')₂-Tieren nur geringfügig gegenüber den Isotyp-F(ab')₂-Kontrollen reduziert, was zu einer Freigabe vieler TZR im Zuge der geringeren Plasma-Halbwertszeit des F(ab')₂-Fragments passen würde (Abb. 16D, E).

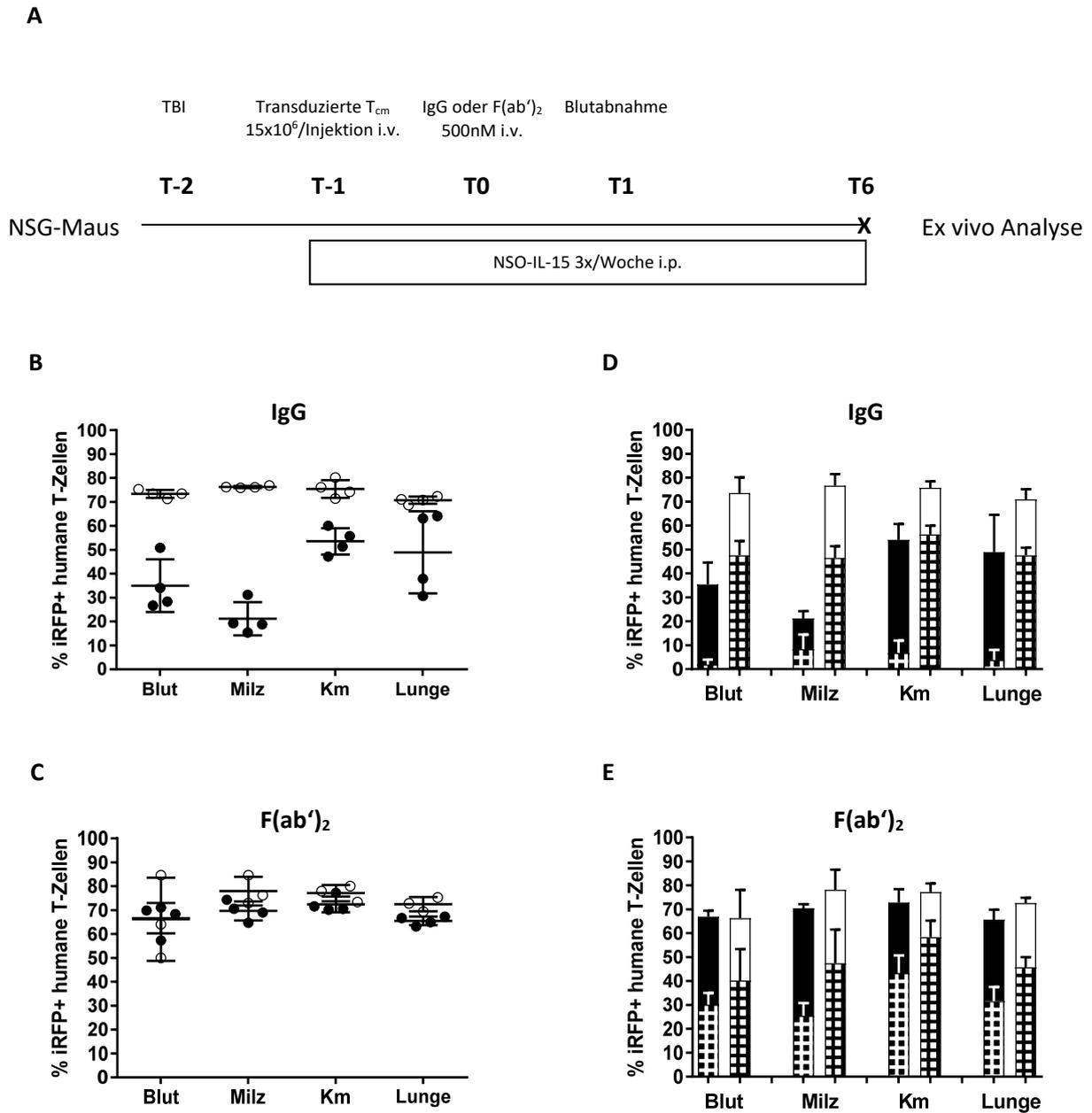


Abbildung 16: Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter $CD8^+$ T_{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG oder aTZRmu- $F(ab')_2$ P4 ex vivo.

(A) Überblick über den Versuchsablauf.

(B-C) Anteil iRFP+ Zellen der humanen T Zellen ($7AAD^-$, $hCD45^+$, $hCD3^+$, $hCD5^+$) in Blut, Milz, Km und Lunge der Mäuse an T6 nach Behandlung mit den Vollantikörpern aTZRmu-IgG (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte) (B) bzw. mit den $F(ab')_2$ -Fragmenten aTZRmu- $F(ab')_2$ P4 (schwarze Punkte) oder Isotyp- $F(ab')_2$ (weiße Punkte) (C).

(D-E) Anteile der durch PE-aTZRmu-IgG markierbaren (kariierter Anteil) und nicht markierbaren (Anteil ohne Musterung) iRFP+ humanen T Zellen ($7AAD^-$, $hCD45^+$, $hCD3^+$, $hCD5^+$, iRFP+) in Blut, Milz, Km und Lunge der Mäuse an T6 nach Behandlung mit den Vollantikörpern aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp-IgG (weiße Balken) (D) bzw. mit den $F(ab')_2$ -Fragmenten aTZRmu- $F(ab')_2$ P4 (schwarze Balken) oder Isotyp- $F(ab')_2$ (weiße Balken) (E).

5.4.4 TZR-Dichte als Einflussfaktor für das Überleben transgener T_{cm} nach aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂-Behandlung in vivo

Nach der retroviralen Transduktion des TZR 2.5D6-iRFP mit Hilfe der optimierten Verpackungszelllinie RD114 (RD-Td) war zum einen der Anteil erfolgreich transduzierter, F-aTZRmu-IgG+ T_{cm} in der Durchflusszytometrie, mit regelmäßig über 80%, deutlich höher als bei Verwendung der bisherigen Verpackungszelllinie T293 (T293-Td). Außerdem zeigten, im direkten Vergleich einer parallelen RD-Td und T293-Td, die mittels RD-Td hergestellten transgenen T_{cm} ein stärkeres Fluoreszenzsignal, assoziiert mit einer größeren Anzahl gebundener PE-aTZRmu-Antikörper am ehesten an vermehrt exprimierten transgenen TZR je Zelle. Eine Expression zelleigener TZR der T_{cm} , die nach T293-basierter Transduktion anteilig noch vorhanden war, ließ sich nach RD114-basierter Transduktion kaum nachweisen (Abb. 17).

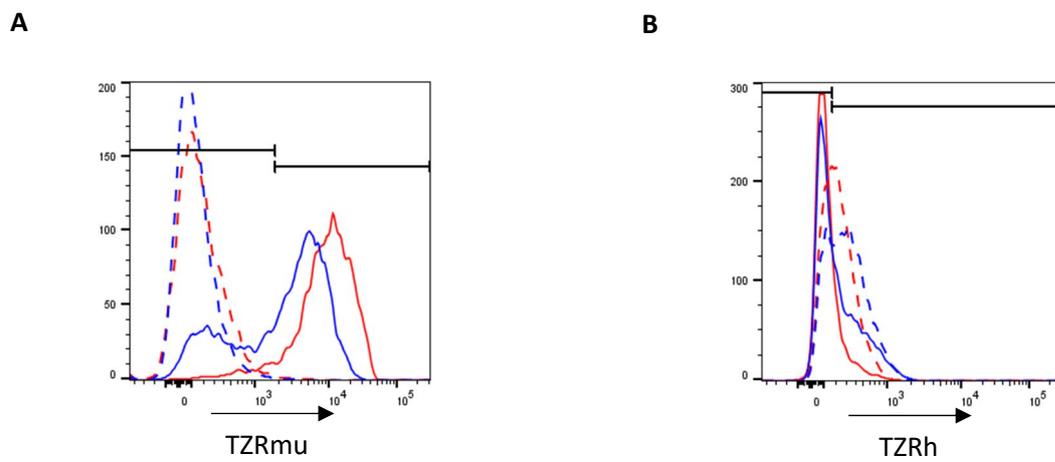


Abbildung 17: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} nach Transduktion mit T293 oder RD114.

(A-B) vergleichende Messung der PE-aTZRmu-IgG-Färbung (A) und FITC-aTZRh-IgG-Färbung (B) von CD8+ T_{cm} nach T293-basierter (blaue Linie) oder RD114-basierter (rote Linie), paralleler Transduktion mit TZR 2.5D6-iRFP (durchgezogene Linie) oder ohne Transduktionsvektor (gestrichelte Linie) in der Durchflusszytometrie.

Dem gleichen Vorgehen wie in ivE-1 und -2 folgend sollte die Wirkung von aTZRmu-IgG und aTZRmu-F(ab')₂ nun auf T_{cm} mit höherer Dichte transgener TZR als Bindungsstellen in vitro und in vivo verglichen werden. Nach RD114-basierter Transduktion mit TZR 2.5D6-iRFP zeigten die humanen CD8+ T_{cm} eine deutliche IFN γ -Sekretion von 2213pg/ml und einen zusätzlichen Anteil apoptotischer Zellen von 25% im Vergleich zu den Kontrollen nach 12h Inkubation mit 500nM aTZRmu-IgG in vitro. Auffällig war die IFN γ -Produktion von 543pg/ml in Kombination mit einem zusätzlichen Anteil apoptotischer Zellen von 22% im Vergleich zu den Kontrollen nach 12h Inkubation in vitro mit 500nM aTZRmu-F(ab')₂ P6, das einen Anteil des Vollantikörpers von 6,4% (Abb. 1) aufwies (Abb. 18A, B).

Für das in vivo-Experiment betrug der Anteil TZR 2.5D6+ T_{cm} gemäß PE-aTZRmu-IgG-Färbung in der Durchflusszytometrie 42%, im Vergleich zu 45% iRFP+ T_{cm} , nach Zugabe leer-transduzierter T_{cm} (Abb. 18C, D). An zwei Folgetagen nach der TBI wurde diese Mischung aus 45% iRFP+ transgenen und 55% leer-transduzierten T_{cm} den Versuchstieren injiziert.

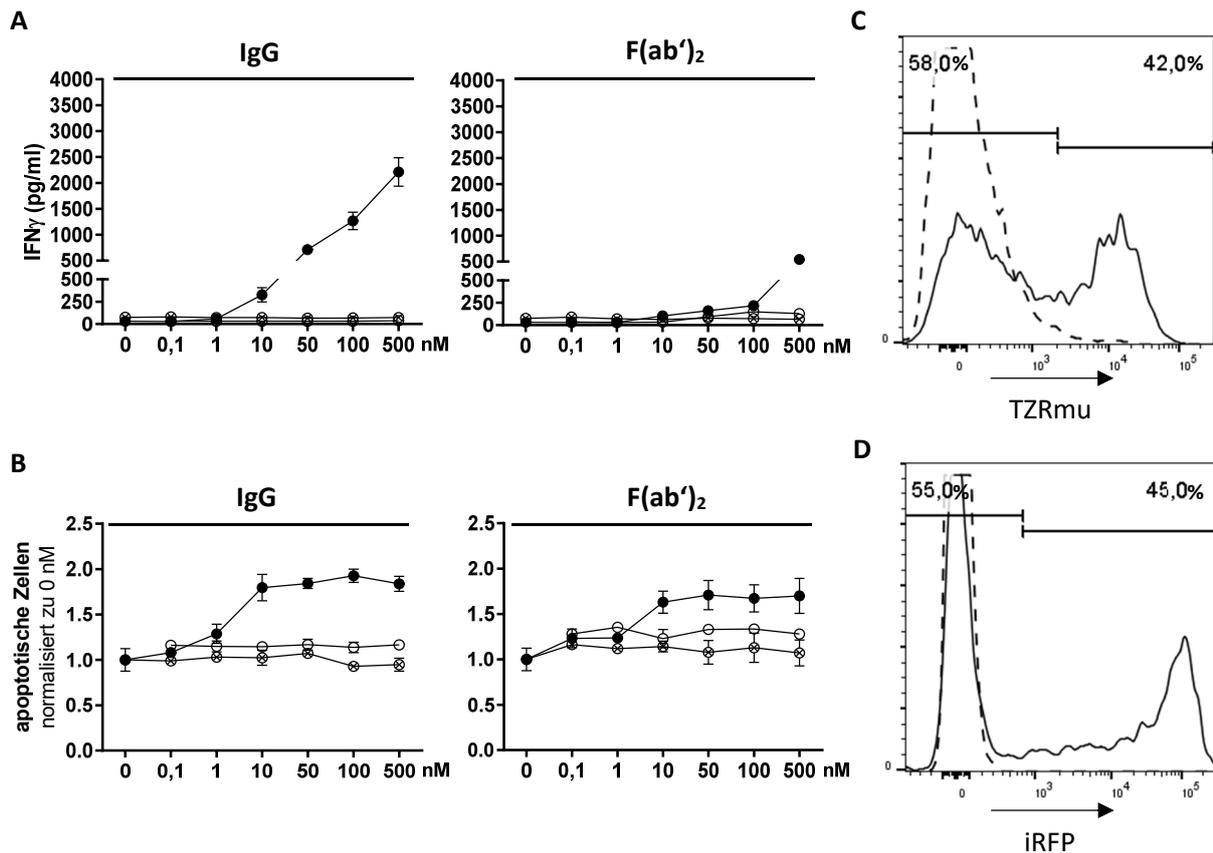


Abbildung 18: Charakterisierung TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter CD8+ T_{cm} für das dritte in vivo-Experiment (ivE-3) in vitro.

(A-B) Messung der INF γ -Sekretion (A) und Apoptose (B) von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten CD8+ T_{cm} nach 12h Inkubation mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P6 (schwarze Punkte) oder Isotyp-IgG bzw. Isotyp-F(ab')₂ (weiße Punkte) in reinem PBS. Leer-transduzierte CD8+ T_{cm} wurden gleichermaßen mit aTZRmu-IgG bzw. aTZRmu-F(ab')₂ P6 in reinem PBS (gemusterte Punkte) inkubiert und gemessen.

(C-D) TZR 2.5D6-Expression, gemessen mit Hilfe einer PE-aTZRmu-IgG-Färbung (C) und mit Hilfe des iRFP-Signals (D), von TZR 2.5D6-iRFP-transduzierten (schwarze Linie) und leer-transduzierten T_{cm} (gepunktete Linie) in der Durchflusszytometrie am Tage ihrer ersten Injektion in die Versuchstiere.

Alle Versuchstiere waren bei der Injektion des aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ P6 oder der jeweiligen Isotyp-Kontrollen (T0) gesund und keine der vier Versuchsgruppen zeigte eine Verschlechterung des Allgemeinzustands im weiteren Verlauf. Vier Tage nach der Antikörper-Gabe (T4) verstarb ein aTZRmu-IgG-Tier vorzeitig in Folge einer intraperitonealen Blutung nach NSO-IL15-Injektion, woraufhin gewonnenes Material (Milz, Km, Lunge) bei -80°C aufbewahrt wurde. In Anlehnung an ivE-2 wurde der Versuchsendpunkt (T7) gewählt und eine gemeinsame ex vivo-Analyse aller Tiere durchgeführt (Abb. 19A). Diese wies nahezu keine iRFP+ humanen T Zellen im Blut der beiden bis T7 beobachteten aTZRmu-IgG-Tiere nach sowie deutlich reduzierte Anteile iRFP+ Zellen in den übrigen Organen, im Vergleich zu einem nahezu konstanten ca. 50% iRFP+ Anteil humaner T Zellen in den Isotyp-IgG-Tieren, näherungsweise entsprechend der Zusammensetzung der injizierten T_{cm}. Keines der aTZRmu-F(ab')₂-Tiere zeigte eine Reduktion iRFP+ humaner T Zellen in allen Organen, jedoch ließen isoliert reduzierte iRFP+ Anteile in einem einzelnen Organ jedes Tieres in Kombination mit einem tendenziell reduzierten Anteil iRFP+ Zellen im Knochenmark im Vergleich zu den Isotyp-F(ab')₂-Tieren eine geringe depletierende Wirkung des aTZRmu-F(ab')₂ nicht vollständig ausschließen (Abb. 19B, C). Erneut präsentierten überlebende iRFP+ Zellen der aTZRmu-IgG-Tiere kaum freie aTZRmu-Bindungsstellen mehr, während der Anteil iRFP+ Zellen ohne freie aTZRmu-Bindungsstelle in aTZRmu-F(ab')₂-Tieren dem der Isotyp-F(ab')₂-Kontrollen nahezu entsprach (Abb. 19D, E).

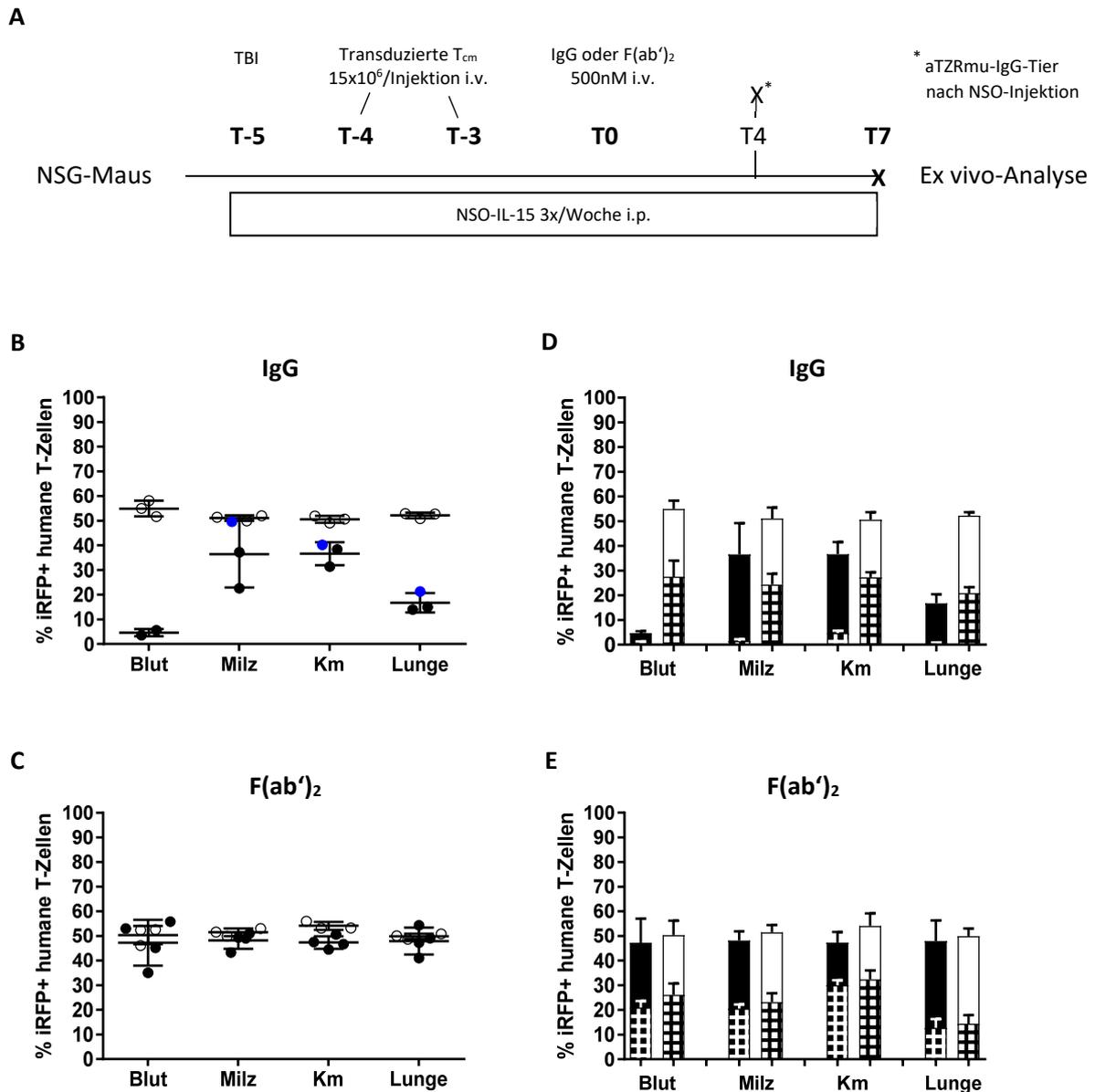


Abbildung 19: Analyse TZR 2.5D6-iRFP-transduzierter $CD8^+$ T_{cm} unter Einfluss von aTZRmu-IgG oder aTZRmu- $F(ab')_2$ P6 ex vivo.

(A) Überblick über den Versuchsablauf.

(B-C) Anteil iRFP+ Zellen humaner T Zellen ($7AAD^-$, $hCD45^+$, $hCD3^+$, $hCD5^+$) in Blut, Milz, Km und Lunge der Mäuse an T7 (T4 für ein aTZRmu-IgG-Tier = blaue Punkte) nach Behandlung mit den Vollantikörpern aTZRmu-IgG (schwarze und blaue Punkte) oder Isotyp-IgG (weiße Punkte) (B) bzw. mit den $F(ab')_2$ -Fragmenten aTZRmu- $F(ab')_2$ P6 (schwarze Punkte) oder Isotyp- $F(ab')_2$ (weiße Punkte) (C).

(D-E) Anteile der durch PE-aTZRmu-IgG markierbaren (kariert) Anteil und nicht markierbaren (Anteil ohne Musterung) iRFP+ humanen T Zellen ($7AAD^-$, $hCD45^+$, $hCD3^+$, $hCD5^+$, iRFP+) in Blut, Milz, Km und Lunge der Mäuse an T7 (T4 für ein aTZRmu-IgG Tier) nach Behandlung mit den Vollantikörpern aTZRmu-IgG (schwarze Balken) oder Isotyp IgG (weiße Balken) (D) bzw. mit den $F(ab')_2$ -Fragmenten aTZRmu- $F(ab')_2$ P6 (schwarze Balken) oder Isotyp- $F(ab')_2$ (weiße Balken) (E).

6 Diskussion

6.1 Antikörper-Bindung transgener T Zellen im adoptiven Zell-Transfer

Der adoptive Zell-Transfer genetisch modifizierter T Zellen in der Immuntherapie von Tumoren hat durch die spezifische Programmierung des körpereigenen Immunsystems gegen tumorassoziierte Antigene ein vielversprechendes, möglicherweise kuratives Potential, allerdings kombiniert mit dem Risiko lebensbedrohlicher Komplikationen durch „off-tumor“-Reaktionen (Morgan, Chinnasamy et al. 2013; Linette, Stadtmauer et al. 2013). Die nicht-invasive in vivo-Darstellung der Funktionsträger im präklinischen ebenso wie im klinischen Kontext könnte wertvolle Informationen über die Biodistribution und Anti-Tumor-Reaktion transgener T Zellen in vivo liefern und durch frühzeitige Erkennung und Therapie von Nebenwirkungen zu einem verbesserten Sicherheitsprofil beitragen. Während sogenannte Reporter-Gene einer zusätzlichen genetischen Zellmodifikation bedürfen (McCracken, Vatakis et al. 2015; Krebs, Ahad et al. 2018), könnte eine Bildgebungsmethode basierend auf der Antikörper-Bindung des transgenen, tumorreaktiven TZR eine im Rahmen der Anti-Tumor-Reaktivität vorhandene Zielstruktur nutzen (Griessinger, Maurer et al. 2015), die in vivo gebunden werden kann und Potential für eine klinische Translation hat (Mall, Yusufi et al. 2016):

Die konstante Kette transgener TZR, unabhängig von deren Spezifität, als Antikörper-Zielstruktur eines Immuno-PET/CT Bildgebungsmodells wurde in unserer Arbeitsgruppe ausgewählt, um humane T Zellen in vivo darzustellen. Zugrunde liegt das Konzept der Murinisierung der konstanten Ketten humaner tumorreaktiver TZR, das zu einer optimierten TZR-Funktionalität führen soll. Der murinisierte Anteil der konstanten Ketten des transgenen TZR verbessert dessen korrekte Oberflächenexpression auf humanen T Zellen (Cohen, Zhao et al. 2006; Cohen, Li et al. 2007; Kuball, Dossett et al. 2007) und stellt dabei eine besonders spezifische Bindungsstelle der transgenen humanen T Zellen im menschlichen Immunsystem dar, die unabhängig von der TZR-Spezifität genutzt werden kann. Dieser Optimierungsschritt selektiert die exprimierenden humanen T Zellen für die Bindung eines Antikörpers spezifisch für die konstante Region der TZR β -Kette der Maus (H57-597 = aTZRmu-IgG) und dessen F(ab')₂-Fragments (aTZRmu- F(ab')₂) (Kubo, Born et al. 1989). Jedoch bergen Manipulationen des TZR ein hohes Risiko der Einflussnahme sowohl durch intrinsische Signalkaskaden als auch sterisch im Hinblick auf Antigen-Bindung und Reaktivität. Positive wie negative Einflüsse auf Aktivierung, Proliferation, Apoptose und Funktionalität können Nebenwirkungsprofil und Wirksamkeit des Transfers transgener T Zellen beeinflussen. Eine detaillierte Analyse des Einflusses der Bindung an humane tumorreaktive T Zellen über den transgenen TZR in vitro und in vivo wurde daher als Bedingung für aussagekräftige, bildgebende Informationen in präklinischen Modellen und insbesondere eine klinische Translation vorausgesetzt. Weiterhin wurden supprimierende Effekte einer Antikörper-Bindung evaluiert, um möglicherweise Nebenwirkungen, die durch Autoreaktivität bedingt sind, mittels spezifischer Apoptose TZR-transgener Zellen zu kontrollieren, ohne die Notwendigkeit einer kompletten T Zell-Depletion, ähnlich der Verwendung eines spezifischen Suizid-Gens (Di Stasi, Tey et al. 2011).

6.2 aTZRmu-IgG-Bindung humaner transgener T Zellen in vitro

Für murine T Zellen wurde als Folge einer Bindung des monoklonalen Hamster-Antikörpers aTZRmu-IgG bereits eine Depletion und eine langfristig verringerte antigenspezifische Reaktivität in vivo beschrieben (Henrickson, Reid et al. 1995; Drobyski, Majewski 1996; Kishimoto, Furukawa et al. 2000; Deng, Khattar et al. 2014) und eine mögliche kurzfristige Aktivierung diskutiert (Kubo, Born et al. 1989; Murakami, Kong et al. 1995; Henrickson, Reid et al. 1995). In weiteren murinen Modellen sind durch Antikörper-Bindung eines TZR Einflüsse auf das Verhalten reifer T Zellen beschrieben, die vergleichbar mit der Bindung MHC-präsentierter Antigene sind. Dazu gehört die Stimulation der Proliferation zuvor naiver reifer T Zellen ebenso wie die Apoptose und Proliferationshemmung aktivierter reifer T Zellen durch oberflächengebundene anti-TZR-Antikörper (anti-TZR muriner Antikörper 1B2). (Russell, White et al. 1991) Die Induktion einer Apoptose von T Zellen im Zusammenhang mit ihrer Aktivierung durch

Antigen-Stimulation wurde als ein Mechanismus der Autoregulation der Immunantwort postuliert. Neben der Antigen-Konzentration wurden dabei auch aktivierende Zytokine, insbesondere IL-2 und ebenfalls IL-7, als zentrale Faktoren einer TZR-vermittelten, mit Aktivierung assoziierten Apoptose identifiziert. (Critchfield, Zúñiga-Pflücker et al. 1995; Zheng, Trageser et al. 1998) Daher untersuchten wir für die humanen transgenen Zellen primär, ob eine Bindung des murinisierten Anteils des TZR eine Apoptose humaner T Zellen auslösen kann und ob diese in Korrelation mit dem Proliferationsverhalten steht, neben einer möglicherweise assoziierten Aktivierung und der Funktionalität der T Zellen.

Für den adoptiven Zell-Transfer im Fremdtransplantat-Modell wurden humane CD8+ T_{cm} ausgewählt. T_{cm} wurden als Differenzierungsstadien nach Antigen-Kontakt beschrieben (Sallusto, Lenig et al. 1999; Busch, Fräßle et al. 2016), die neben naiven T Zellen (T_n) als TZR-transgene Zellen im adoptiven Zell-Transfer im Mausmodell eine überlegene Anti-Tumor-Reaktion zeigten (Klebanoff, Gattinoni et al. 2005 und 2011), insbesondere im Vergleich zu Effektor-Gedächtnis-T Zellen (T_{em}) (Klebanoff, Finkelstein et al. 2004). Außerdem konnte ein Persistieren infundierter T_{cm} in vivo im Vergleich zu infundierten T_{em} in Affen deutlich länger nachgewiesen werden (Berger, Jensen et al. 2008). Daneben zeigten inzwischen mit den Stammzell-Gedächtnis-T Zellen, denen neben der Fähigkeit der Selbsterneuerung auch ein höheres Diversifizierungspotential im Vergleich zu T_{cm} zugeschrieben wird, und den isolierten, naiven T Zellen weitere T Zell-Subtypen vielversprechendes Potential im Hinblick auf die Anti-Tumor-Reaktivität in vivo (Gattinoni, Lugli et al. 2011; Klebanoff, Gattinoni et al. 2011; Klebanoff, Scott et al. 2016). In Analysen der Rolle des Differenzierungsstadiums von T Zellen, transduziert mit tumorreaktiven CAR, zeigten CD8+ T_{cm} eine überlegene Anti-Tumor-Reaktion im Mausmodell im Vergleich zu T_{em} und T_n. Darüber hinaus wurde eine synergistisch verbesserte Anti-Tumor-Reaktion in vivo durch transgene CD8+ T_{cm} kombiniert mit CD4+ T_n oder T_{cm} im Verhältnis 1:1 im Vergleich zu den isolierten Subtypen aufgezeigt, potentiell assoziiert mit der höheren Produktion wachstumsfördernder Zytokine durch CD4+ T_n und T_{cm} (T_n>T_{cm}) und einer gesteigerten Proliferation zytotoxischer T Zellen. (Sommermeyer, Hudecek et al. 2016) Um Einflüsse der TZR-Korezeptoren CD8 und CD4 zu berücksichtigen wurden neben CD8+ T_{cm} auch unselektierte PBMC, unter T Zell-fördernden Kulturbedingungen mit hIL-7 und hIL-15 stets zusammengesetzt aus relevanten Populationen CD4+ und CD8+ T Zellen, untersucht.

Sowohl humane CD8+ T_{cm} als auch humane PBMC wurden retroviral mit dem TZR 2.5D6, als beispielhafter murinisierte humaner TZR, transduziert, der spezifisch ein Peptid der Myeloperoxidase in Kombination mit HLA-B7 erkennt und in einem myeloiden Sarkom-Modell getestet wurde. Nach seiner Isolation wurde dieser humane TZR durch die Murinisierung der konstanten Ketten, die Ergänzung einer zusätzlichen Disulfid-Brücke sowie Codon-Optimierung weiterentwickelt. (Klar, Schober et al. 2014) Eine spezifische Bindung des aTZRmu-IgG an TZR 2.5D6-transduzierte humane T_{cm}, bestätigt durch Multimer-Bindung, wurde durch Sabine Mall gezeigt (Mall 2016).

Nach Inkubation humaner TZR-transgener CD8+ T_{cm} mit aTZRmu-IgG für 12h zeigte sich eine konzentrationsabhängige Apoptose transduzierter T Zellen sowie eine spezifische Aktivierung in Form einer erhöhten IFN γ -Sekretion in vitro (Mall, Yusufi et al. 2016), passend zu dem beschriebenen Phänomen der Aktivierungs-induzierten Apoptose (Russell, White et al. 1991; Critchfield, Zúñiga-Pflücker et al. 1995; Zheng, Trageser et al. 1998). Die Stabilisierung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch die fortführend ergänzte Supplementierung der stimulierenden Zytokine hIL-7 und hIL-15 im Zellmedium der Inkubationsansätze mit aTZRmu-IgG, aTZRmu-F(ab')₂ und ihren Kontrollen stützt die These einer abhängig von der Zellaktivierung auftretenden Apoptose. Der Anteil apoptotischer Zellen nach Inkubation mit aTZRmu-IgG variierte versuchsabhängig je nach Transduktionseffizienz der verwendeten Zellen. Neben der TZR-Dichte an der Zelloberfläche variierte vor allem der Anteil der Zellen, die nach retroviraler Transduktion keine Expression des transgenen TZR zeigten und somit unbeeinflusst durch aTZRmu-IgG eine geringere prozentuale Apoptose bedingten. Ein Vergleich CD8+ T_{cm} mit CD8+ und CD4+ PBMC zeigte nur geringfügige Abweichungen sowohl der

induzierten Apoptose als auch der IFN γ -Sekretion, am ehesten bedingt durch die Unterschiede in der Transduktionseffizienz, ohne Nachweis einer Korezeptor-abhängigen selektiven Wirkung von aTZRmu-IgG. Ein Zeitfenster von 5min zeigte sich ausreichend, um eine suffiziente Antikörper-Bindung für eine nachweisbare Induktion von Aktivierung und Apoptose nach 12h zu gewährleisten, jedoch ist insbesondere bei geringerer aTZRmu-IgG-Konzentration eine zeitverzögerte Wirkung möglich, durch die eine spezifische Apoptose erst nach 72h detektierbar wurde. Daneben ist vor dem Hintergrund deutlich abweichender Beobachtungszeiträume einer depletierenden Wirkung von aTZRmu-IgG auf murine T Zellen eine dosisabhängige Wirkdauer plausibel (Henrickson, Reid et al. 1995; Murakami, Kong et al. 1995; Drobyski, Majewski et al. 1996; Miyahara, Khattar et al. 2012).

Nach Inkubation mit unserer Maximalkonzentration von 500nM aTZRmu-IgG waren zeitverzögerte Effekte nach 72h im Vergleich zu 500nM Isotyp-IgG nicht nachweisbar. Dies könnte am ehesten damit zusammenhängen, dass in einer Zellkultur aus ca. 52% TZR 2.5D6-transduzierten T Zellen der von einer aTZRmu-IgG-Bindung betroffene Anteil bereits nach 12h überwiegend depletiert war und daher bei der Maximalkonzentration an aTZRmu-IgG im Verlauf stagnierte.

Nach Elimination toxischer Einflüsse der Antikörper-Pufferlösung ließ sich nach einer Wirkdauer von 12h spezifisch durch aTZRmu-IgG eine IFN γ -Sekretion und Apoptose humaner TZR-transgener T Zellen *in vitro* nachweisen (Mall, Yusufi et al. 2016), ähnlich beobachteten aktivierenden und supprimierenden Einflüssen auf murine T Zellen (Kubo, Born et al. 1989; Henrickson, Reid et al. 1995; Murakami, Kong et al. 1995; Drobyski, Majewski et al. 1996; Deng, Khattar et al. 2014). Bei den murinen T Zellen wurde weiterhin eine inkomplette Depletion durch aTZRmu-IgG mit zumindest teilweise erhaltener Abwehrfunktion persistierender T Zellen gezeigt (Eto, Yoshikai et al. 1994; Drobyski, Majewski et al. 1996; Miyahara, Khattar et al. 2012; Deng, Khattar et al. 2014). Eine Antikörper-Bindung an den antigenspezifischen TZR könnte durch unmittelbare sterische Effekte die Erkennung und Eliminierung von Zielzellen behindern. Daneben sind metabolische Effekte durch aTZRmu-induzierte Signalkaskaden, wie u.a. Apoptose-Signale, zu berücksichtigen, die zeitnah zur Antikörper-Bindung und verzögert die Zytotoxizität der T Zellen beeinflussen könnten.

Wir untersuchten die spezifische Anti-Tumor-Reaktivität des TZR 2.5D6 gegen die Zelllinie ML2-B7, eine AML-Zelllinie die endogen MPO exprimiert und nach Transduktion mit GFP-gekoppeltem HLA-B7 durch den TZR 2.5D6 erkannt wird (Klar, Schober et al. 2014), im Zusammenhang mit der aTZRmu-IgG-Bindung. Nach zeitgleicher Inkubation TZR-transgener T Zellen mit aTZRmu-IgG und ML2-B7 für 12h bzw. 20h zeigte sich eine reduzierte T Zell-Funktionalität vereinbar mit der beobachteten Apoptose, jedoch mit zunehmender Depletion der Tumorzellen im Verlauf. Nach vorausgegangener 12-stündiger Inkubation mit aTZRmu-IgG zeigte sich eine deutlichere Funktionsreduktion, passend zu der spezifisch durch aTZRmu-IgG nach 12h induzierten Apoptose der Effektorzellen, jedoch verblieben offensichtlich weiterhin ausreichend funktionelle TZR-transgene T Zellen für eine protrahierte Tumorzelldepletion im Verlauf.

6.3 aTZRmu-F(ab')₂-Bindung humaner transgener T Zellen *in vitro*

Im Vergleich mit der Wirkung von aTZRmu-IgG auf murine T Zellen zeigten Henrickson et al. für aTZRmu-F(ab')₂ eine deutlich geringere funktionelle Beeinflussung muriner T Zellen (Henrickson, Reid et al. 1995). In unseren Analysen ergaben sich nach Inkubation humaner TZR-transgener T Zellen mit den durch Fragmentation des Vollantikörpers hergestellten aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen schwankende Ergebnisse. Mittels Durchflusszytometrie konnten deutliche Unterschiede des Gehalts residualen Vollantikörpers in den insgesamt 6 verwendeten aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen gezeigt werden. Eine spezifische IFN γ -Sekretion sowie Apoptose humaner TZR-transgener T Zellen *in vitro* zeigte sich nur nach 12h Inkubation mit aTZRmu-F(ab')₂ P3, P5 und P6, die den höchsten Anteil an residualem Vollantikörper aufwiesen (P3>P5>P6), mit im Vergleich absteigender Menge der IFN γ -Sekretion (1391-2453pg/ml > 980pg/ml > 543pg/ml = P3>P5>P6). Weiterhin kann ein geringer Anteil an residualem Vollantikörper für alle aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen nicht ausgeschlossen werden. Unter Berücksichtigung der Reinheit der aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen konnte nach einer Wirkdauer von 12h spezifisch durch aTZRmu-F(ab')₂ weder IFN γ -Sekretion noch Apoptose reproduzierbar

nachgewiesen werden, für humane TZR-transgene CD8+ T_{cm} ebensowenig wie für PBMC (Mall, Yusufi et al. 2016). Allerdings können aTZRmu-F(ab')₂-spezifische Effekte überlagert durch den Nachweis residualen Vollantikörpers nicht ausgeschlossen werden. Nach Inkubation humaner TZR-transgener T Zellen mit aTZRmu-F(ab')₂ für 3 Tage zeigte sich eine uneingeschränkte Proliferation ohne Hinweis auf spezifische proliferative Stimuli als Einflussfaktor auf die beobachtete Zellzahl. Ebenso zeigte sich nach 12h Inkubation mit aTZRmu-F(ab')₂ kein Einfluss auf die Funktionalität humaner TZR-transgener T Zellen im Zeitverlauf mit unveränderter Tumorzell-Depletion im Vergleich zu den Kontrollen. Jedoch zeigten sich in den Analysen von Henrickson et al. immunsuppressive Effekte durch aTZRmu-F(ab')₂ auf murine T Zellen in vivo, geringer ausgeprägt als durch aTZRmu-IgG und ohne Nachweis einer kurzzeitigen Aktivierung in Form einer erhöhten IL2-Rezeptor-Expression wie beim Vollantikörper (Henrickson, Reid et al. 1995). Allerdings applizierten Henrickson et al. mehr als doppelt so viel aTZRmu-F(ab')₂ als in unserer Versuchsreihe. Neben der Dosierung von aTZRmu-F(ab')₂ ist die Transduktionseffizienz, auch in Gestalt der exprimierten TZR-Dichte, zu berücksichtigen, die eine Wirkung durch aTZRmu-F(ab')₂-Bindung beeinflussen könnte. Daher bedarf dieser Aspekt erhöhter Aufmerksamkeit und Kontrollen in zukünftigen Studien.

6.4 aTZRmu-IgG- und aTZRmu-(Fab')₂-Bindung humaner transgener T Zellen in vivo

Nachfolgend wurde die Übertragbarkeit der gesammelten in vitro-Ergebnisse in vivo geprüft. Als Fremdtransplantat-Modell erhielten NSG-Mäuse, deren reduziertes körpereigenes Immunsystem ein Anwachsen fremder T Zellen ermöglicht, humane retroviral transduzierte CD8+ T_{cm} nach niedrig-dosierter Ganzkörperbestrahlung und kombiniert mit hIL-15-Substitution für ein optimiertes T Zell-Anwachsen (Wang, Berger et al. 2011; Klug, Prakash et al. 2013; Mall, Yusufi et al. 2016). Der Transduktionsvektor trug dabei den TZR 2.5D6 gekoppelt an ein Phytochrom-basiertes nahe-infrarot-Fluoreszenz Protein (iRFP). Dadurch wurden TZR-transgene Zellen unabhängig von TZR und Antikörper-Färbung in der Durchflusszytometrie detektierbar. Nach Administration von aTZRmu-IgG oder aTZRmu-F(ab')₂ in vivo zeigte die finale ex vivo-Analyse der Biodistribution humaner T Zellen in verschiedenen Organen in der Durchflusszytometrie den Anteil persistierender iRFP+ T Zellen als möglichen, indirekten Nachweis einer Antikörperkonstrukt-vermittelten spezifischen Apoptose in vivo. Es bestand eine stabile Korrelation zwischen dem Anteil TZR 2.5D6-exprimierender Zellen und iRFP-exprimierender Zellen in den Messungen der Transduktionsrate mit einer Diskrepanz von 5-10%. Möglicherweise liegt diesem stabilen Anteil iRFP+ T Zellen ohne Nachweis von TZR 2.5D6 eine geringere Sensitivität der auf der Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper basierenden Messung im Gegensatz zum Nachweis eines intrazellulär synthetisierten Fluoreszenz-Proteins in der Durchflusszytometrie zugrunde. Ein geringer Anteil transduzierter T Zellen ohne erfolgreiche Oberflächenexpression der transduzierten Proteine ist ebenfalls nicht auszuschließen. Abgesehen davon ermöglichte die gute Ko-Expression des TZR 2.5D6 und iRFP die ex vivo-Analyse spezifischer Effekte durch aTZRmu-Bindung in vivo. Am Folgetag der Injektion von aTZRmu-IgG zeigten hohe Plasmakonzentrationen von humanem IFN γ , assoziiert mit einem reduzierten Allgemeinzustand der aTZRmu-IgG-Tiere in Abhängigkeit von der Menge TZR-transgener Zielzellen, eine erfolgte aTZRmu-Bindung in vivo an. Entsprechend ließ sich am Folgetag der aTZRmu-IgG-Administration in vivo in der Durchflusszytometrie gebundener aTZRmu-IgG an der Oberfläche humaner T Zellen nachweisen. Unter Berücksichtigung klinischer Zeichen humaner Endpunkte (ARAC 2022) erfolgte die ex vivo-Analyse der Biodistribution 1 Tag und 4 Tage nach aTZRmu-IgG-Injektion sowie an Tag 6 bzw. Tag 7. Am Folgetag und 4 Tage nach aTZRmu-IgG-Injektion war der Anteil iRFP+ humaner T Zellen am deutlichsten im Blut reduziert mit zunehmender Reduktion im zeitlichen Verlauf an Tag 6 und Tag 7 mit einem Maximum im Vergleich zu Isotyp-IgG-Injektionen, vereinbar mit einer spezifischen Apoptose zirkulierender iRFP+ T Zellen durch intravenös applizierten aTZRmu-IgG. Zu den späteren Analysezeitpunkten (Tag 6 und Tag 7) war auch der Anteil iRFP+ Zellen in der Milz deutlich reduziert, während zwar eine erkennbare Reduktion iRFP+ Zellen im Knochenmark vorlag, jedoch in deutlich geringerer Ausprägung. (Mall, Yusufi et al. 2016) Hier ist möglicherweise ein Verteilungseffekt aufgrund der Eliminierung degenerierter

Blutzellen in der Milz zu berücksichtigen. Eine geringere Wirkung des aTZRmu-IgG auf TZR-transgene T Zellen des Knochenmarks sowie teilweise der Lunge könnte auch mit protektiven Milieu-Effekten und möglicherweise geringeren Wirkkonzentrationen in diesen Organen zusammenhängen. So wiesen iRFP+ humane T Zellen im Blut an Tag 1 und 4 nach aTZRmu-IgG-Injektion weniger freie aTZRmu-Bindungsstellen in der Durchflusszytometrie auf als in Milz und Knochenmark (Blut<Milz<Knochenmark). Eine vermehrte Antikörper-Bindung an Fc-Rezeptoren in der Milz in immundefizienten NSG-Mäusen nahezu ohne endogene IgG und eine folglich präferentielle Biodistribution in der Milz in der Immuno-PET/CT Bildgebung unabhängig von der Antikörper-Spezifität wurde insbesondere für humanisierte Antikörper, spezieübergreifend postuliert (Sharma, Chow et al. 2018). Eine Bindung des Hamster-aTZRmu-IgG an humane Fc-Rezeptoren der AML-Zelllinie ML2 führte ebenfalls zu unspezifischen Signalen im Immuno-PET/CT (Mall 2016). Kombiniert mit der spezifischen Bindung humaner TZR-transgener T Zellen wären derartige Fc-Rezeptor-assoziierte Organ-abhängige Unterschiede der Wirkkonzentration von aTZRmu-IgG denkbar. An Tag 6 und 7 nach aTZRmu-IgG-Injektion waren jedoch auf den iRFP+ humanen T Zellen aller analysierten Organe kaum freie aTZRmu-Bindungsstellen mehr in der Durchflusszytometrie detektierbar, entsprechend einer aTZRmu-Blockade aller Bindungsstellen oder einer konsekutiven TZR-Internalisierung. Somit ist auch eine konzentrationsabhängig zeitverzögerte Depletion iRFP+ Zellen im Knochenmark außerhalb des Beobachtungszeitraums nicht auszuschließen. Allerdings machen überlebende funktionelle TZR-transgene T Zellen in allen in vitro-Versuchen auch eine inkomplette Depletion in vivo wahrscheinlich.

Ohne den Fc-Anteil zeigten sich 6 bzw. 7 Tage nach aTZRmu-F(ab')₂-Injektion weniger freie aTZRmu-Bindungsstellen iRFP+ humaner T Zellen als nach Isotyp-F(ab')₂-Injektion in allen untersuchten Organen. Jedoch lagen, im Vergleich zur aTZRmu-IgG-Injektion, nach aTZRmu-F(ab')₂-Gabe noch deutlich mehr freie aTZRmu-Bindungsstellen vor, was zu einer Freigabe vieler TZR im Zuge einer geringeren Plasma-Halbwertszeit des F(ab')₂-Fragments bei geringerer Größe (110kDa) im Vergleich zu aTZRmu-IgG (150kDa) passen würde. Der Anteil iRFP+ humaner T Zellen war an Tag 6 bzw. 7 nach aTZRmu-F(ab')₂-Administration in allen untersuchten Organen nahezu unverändert zum Zeitpunkt der Zell-Injektion ebenso wie nach Isotyp-F(ab')₂-Administration. In vivo ließ sich keine spezifische Apoptose TZR-transgener T Zellen durch aTZRmu-F(ab')₂ nachweisen. (Mall, Yusufi et al. 2016) Insbesondere im dritten in vivo-Versuch, nach Steigerung der Transduktionseffizienz transgener T_{cm} in Form einer vermehrten Oberflächenexpression transgener TZR pro Zelle, ließen jedoch isoliert reduzierte Anteile iRFP+ Zellen in einem einzelnen Organ jeden Tieres in Kombination mit einem tendenziell reduzierten Anteil iRFP+ Zellen im Knochenmark im Vergleich zu den Isotyp-F(ab')₂-Tieren eine geringe depletierende Wirkung des aTZRmu-F(ab')₂ nicht vollständig ausschließen. Die Transduktionseffizienz und Oberflächenexpression des transgenen TZR als Zielstruktur, ebenso wie die Reinheit und die Dosis des aTZRmu-F(ab')₂ sind daher wichtige Variablen in dessen Anwendung für eine nicht-invasive in vivo-Bildgebungsmethode.

6.5 Anwendungsmöglichkeit des aTZRmu-F(ab')₂ in der Immuno-PET/CT Bildgebung

In einem murinen myeloiden Sarkom-Modell mit NSG-Mäusen, die subkutan ML2-B7-Tumore in den Flanken erhielten, konnten Mall et al. intravenös applizierte TZR 2.5D6-transduzierte T_{cm} mithilfe einer aTZRmu-F(ab')₂-basierten Bildgebungsmethode in vivo darstellen. Dabei wurde aTZRmu-F(ab')₂ mit ⁸⁹Zr radioaktiv markiert und intravenös in vivo appliziert. Weiterhin sollte vor der T_{cm}-Gabe eine niedrig dosierte Ganzkörperbestrahlung die T Zell-Infiltration der Tumore verbessern bei optimiertem T Zell-Engraftment (Klug, Prakash et al. 2013; Wang, Berger et al. 2011). Nach 48h gelang im PET/CT eine hochsensitive Darstellung der Biodistribution TZR 2.5D6-transgener Zellen in vivo, die sogar detailliertere Informationen über die Anti-Tumor-Reaktion im Sinne der Verteilung der Effektor-Zellen innerhalb des Tumors erlaubte. Dieses entwickelte Immuno-PET/CT-Verfahren eröffnet die Möglichkeit der spezifischen Darstellung TZR-transgener humaner T Zellen in vivo durch intravenös appliziertes ⁸⁹Zr-aTZRmu-F(ab')₂ zu verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen des langfristigen Therapiemonitorings des adoptiven T Zell-Transfers. (Mall, Yusufi et al. 2016) Diese potentiell

longitudinale Anwendung bietet einen klaren Vorteil im Vergleich zu alternativen Darstellungskonzepten basierend auf der direkten radioaktiven Markierung CAR- oder TZR-transgener T Zellen ex vivo (Bhatnagar, Li et al. 2013; Griessinger, Kehlbach et al. 2014) unter Vermeidung einer zusätzlichen genetischen Zellmodifikation, wie im Falle der sogenannten Reporter-Gene (Keu, Witney et al. 2017; McCracken, Vatakis et al. 2015; Krebs, Ahad et al. 2018). Die Verwendung eines zusätzlichen Transgens als Reporter-Gen ist unabhängig von der Spezifität eines TZR oder CAR möglich, jedoch sind im Falle von HSV1-TK sowie hdCK3mut, die mit der Verleihung einer spezifischen enzymatischen Aktivität im Nukleosid-Stoffwechsel die Darstellung durch PET ermöglichen, Einflüsse des Zellmetabolismus auf die Expression des Reporter-Gens zu berücksichtigen (Shu, Guo et al. 2005). Während im Falle der HSV1-TK außerdem die nachweisliche Immunogenität in vivo die klinische Anwendung limitiert (Berger, Flowers et al. 2006; Traversari, Markt et al. 2007), können im Falle von hdCK3mut zudem Hintergrundsignale des Substrats, einem Nukleosid-Analogon, in teilungsaktiven Organen auftreten (Jadvar, Yap et al. 2012).

Eine Bildgebungsmethode basierend auf der Antikörper-Bindung des transgenen, tumorreaktiven TZR kann eine im Rahmen der Anti-Tumor-Reaktivität vorhandene Zielstruktur nutzen (Griessinger, Maurer et al. 2015; Mall, Yusufi et al. 2016). Griessinger et al. untersuchten einen ^{64}Cu -gekoppelten Antikörper gerichtet gegen die definierte variable Domäne eines monoklonalen, murinen TZR für die PET/CT Bildgebung der exprimierenden, monospezifischen murinen T Zellen (Griessinger, Maurer et al. 2015). Während die Bindung der murinisierten konstanten Kette humaner TZR durch aTZRmu-IgG und seine Derivate eine gleichermaßen spezifische Markierung transgener tumorreaktiver humaner T Zellen, unabhängig von der TZR-Spezifität übertragbar, ermöglicht (Mall, Yusufi et al. 2016). Die kritische Herausforderung für alle nicht-invasiven Bildgebungsmethoden ist die Minimierung von Einflüssen auf Funktion und Überleben der beobachteten, transgenen Zellen. Neben Einflüssen durch Antikörper-Bindung und enzymatische Aktivität in Immuno-PET/CT- bzw. Reporter-Gen-Verfahren zeigte sich, insbesondere in Versuchen mit direkter radioaktiver Zell-Markierung, auch das Radionuklid als entscheidender Faktor für eine dosisabhängig reduzierte Zell-Funktionalität (Botti, Negri et al. 1997; Griessinger, Kehlbach et al. 2014; Weist, Starr et al. 2018). Eine dosisabhängige Zunahme an DNA-Doppelstrangbrüchen bei reduziertem Überleben markierter T Zellen wurde für das Radionuklid ^{64}Cu im PET-Imaging beschrieben (Griessinger, Kehlbach et al. 2014). Ebenso zeigten sich nach direkter Markierung humaner CAR-T Zellen mit ^{89}Zr -Oxin dosisabhängig reduziertes Überleben und reduzierte Funktionalität der T Zellen (Weist, Starr et al. 2018). Nach Bindung der in der Bildgebung verwendeten Dosen ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ (0,7-1,5MBq entsprechend 10-20µg) konnte Sabine Mall keine Einschränkung der T Zell-Funktion in vitro und in vivo nachweisen (Mall, Yusufi et al. 2016). In detaillierteren Analysen zeigten Yusufi et al. eine dosisabhängige Zunahme an DNA-Doppelstrangbrüchen mit reduziertem Überleben ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ markierter T Zellen bei einer Radioaktivität von 18,5MBq in vitro, während in vivo im o.g. murinen myeloiden Sarkom-Modell des adoptiven T Zell-Transfers mit ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ (2,2 ± 0,1MBq entsprechend 10-20µg) PET/CT Bildgebung immunhistochemisch keine Doppelstrangbrüche in tumorinfiltrierenden T Zellen nachweisbar waren (Yusufi, Mall et al. 2017). Im Hinblick auf mögliche Strahlenschäden durch ^{89}Zr ist weiterhin die Lokalisation des Radionuklids im Bezug auf das Zellgerüst der Zielzelle von Interesse. In Mausversuchen wurde eine Liganden-induzierte TZR-Internalisierung und reduzierte Expression abhängig von der TZR-Affinität und -Avidität als möglicher Mechanismus einer kontrollierten Immunantwort identifiziert (Gallegos, Xiong et al. 2016). In humanen T Zellen zeigten van der Donk et al. eine reduzierte Oberflächen-expression des TZR, am ehesten im Sinne einer Internalisierung, in Folge der Bindung von anti-CD3-Antikörpern bereits nach 15min Inkubationszeit (van der Donk, Ates et al. 2020). Die Rolle einer durch aTZRmu-Bindung möglicherweise induzierten TZR-Internalisierung ebenso wie die Dynamik des TZR-Turnovers wurden in weiteren Untersuchungen der Wirkung von ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ durch Yusufi et al. evaluiert, wobei sich bereits 5min nach Bindung von ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ eine TZR-Internalisierung zeigte, die im Verlauf der folgenden 4h stetig zunahm (Yusufi, Mall et al. 2017). Griessinger et al. zeigten 3h nach Bindung eines ^{64}Cu -gekoppelten monospezifischen anti-TZR-Antikörpers eine TZR-Internalisierung sowie eine anschließende Re-Expression der TZR nach 24h als optionalen Transportweg für eine intrazelluläre Markierung und Darstellung muriner T Zellen im PET/CT, wobei

die Lokalisation des radioaktiv markierten Antikörpers auch im Hinblick auf eine potentielle Immunogenität in der klinischen Translation relevant sein könnte (Griessinger, Maurer et al. 2015).

6.6 Aspekte einer potentiellen klinischen Translation der ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂-basierten Bildgebungsmethode

Im Hinblick auf eine klinische Translation ist primär der Erkenntnisgewinn insbesondere gekoppelt an die Bildqualität der beschriebenen ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂-basierten nicht-invasiven Bildgebungsmethode interessant. Mall et al. zeigten ein Aktivitätssignal markierter T Zellen in Tumor und Milz vergleichbar mit alternativen präklinischen Techniken der PET-basierten T Zell-Bildgebung (Mall 2016; Tavaré, McCracken et al. 2015; McCracken, Vatakis et al. 2015; Tavaré, Escuin-Ordinas et al. 2016; Beckford Vera, Smith et al. 2018; Mayer, Mall et al. 2018). Die Quantifizierung TZR 2.5D6-iRFP-transgener T_{cm} am Zieltumor als tumorinfiltrierende T_{cm} zeigte eine technische Nachweisgrenze von ungefähr $1\text{-}2 \times 10^4$ Zellen durch ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂ PET/CT Bildgebung (Yusufi, Mall et al. 2017). Weiterhin zeigten sich versuchsabhängig bei gleicher Anzahl transferierter Effektor-Zellen deutliche Unterschiede in deren Anwachsen und Tumorinfiltration, wobei die Zahl tumorinfiltrierender TZR 2.5D6-iRFP-transgener T_{cm} gut mit dem PET-Signal korrelierte (Yusufi, Mall et al. 2017). Eine weitere Beurteilung der Sensitivität der auf ^{89}Zr -aTZRmu-F(ab')₂-basierten Bildgebungsmethode für humane T Zellen im klinischen Kontext ist aufgrund bisher sehr begrenzter Ergebnisse klinischer Studien des Immuno-PET/CT von T Zellen eingeschränkt. Eine auf ^{89}Zr -IAB22M2C (anti-CD8-minibody)-basierte nicht-invasive PET/CT Bildgebungsmethode CD8+ T Zellen in Patienten mit soliden Tumoren zeigte eine gute Verträglichkeit ohne Nachweis von Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Infusion von ^{89}Zr -IAB22M2C (Pandit-Taskar, Postow et al. 2020). Die ebenfalls Desferrioxamin B-basierte Konjugation des Radionuklids ^{89}Zr erfolgte in diesem Fall an IAB22M2C, das als Minibody (Antikörper-Derivat aus jeweils 2 Domänen V_L, V_H, C_{H3} als bivalentes Homodimer) mit 80kDa eine geringere Masse aufweist als das aTZRmu-F(ab')₂-Fragment (110kDa), was im Hinblick auf die Verträglichkeit zu beachten ist. Das für aTZRmu-F(ab')₂ beobachtete starke Signal in Leber und Nieren von NSG-Mäusen könnte durch derartige alternative Antikörper-Derivate des aTZRmu mit optimierter Pharmakokinetik im Rahmen einer klinischen Translation adressiert werden (Mall, Yusufi et al. 2016). ^{89}Zr -gekoppelte Einzel-Domänen Antikörper-Fragmente (ca. 14kDa) wurden beispielsweise von Rashidian et al. in der Darstellung CD8+ T Zellen durch nicht-invasive Immuno-PET/CT Bildgebung im Mausmodell verwendet (Rashidian, LaFleur et al. 2019; Teunissen, Abousaway et al. 2021). Neben Modifikationen der Masse und Pharmakokinetik des Antikörper-Fragments ist weiterhin dessen Humanisierung zur Reduktion potentiell immunogener Komponenten zu erwägen. Während die Immunogenität von Antikörpern des Armenischen Hamsters wie aTZRmu-IgG bisher unzureichend untersucht wurde, wurde für Antikörper muriner Herkunft, deren Derivate als Bestandteil von CAR eingesetzt wurden, humane anti-Maus Antikörper (HAMA) nachgewiesen und sogar unter der Vermutung einer IgE-vermittelten Anaphylaxie eines Patienten im Rahmen der dritten CAR-T Zell-Infusion mit diesem schwerwiegenden unerwünschten Ereignis in Verbindung gebracht (Maus, Haas et al. 2013; Johnson, Scholler et al. 2015). Auch die partielle Murinisierung des TZR als Zielstruktur birgt das Risiko der Immunogenität. So wurden in der Therapie von Tumorpatienten mit genetisch modifizierten, humanen T Zellen, die murine TZR exprimierten, bereits Antikörper gegen die variable Region des murinen TZR nachgewiesen (Davis, Theoret et al. 2010). Dies schließt die Immunogenität einer murinisierten konstanten TZR-Region nicht aus, weshalb Lokalisation und Erhalt des erforderlichen Epitops für die aTZRmu-Bindung sowie für eine optimierte Oberflächenexpression unter Reduktion muriner Anteile wünschenswert wären. Sowohl im Hinblick auf eine potentielle Immunogenität als auch im Hinblick auf Einflüsse durch aTZRmu-Bindung ist die Rolle der Transduktionseffizienz insbesondere die Dichte der TZR-Oberflächenexpression zu berücksichtigen.

Durch die Bindung von aTZRmu-IgG ließ sich eine spezifische Aktivierung und Apoptose humaner TZR-transgener T Zellen in vitro und in vivo nachweisen (Mall, Yusufi et al. 2016). Aufgrund beobachteter spezifischer Effekte durch aTZRmu-IgG bei bereits geringen Konzentrationen von 5-10nM ist in der Herstellung und Anwendung von aTZRmu-F(ab')₂ insbesondere dessen Reinheit von Bedeutung.

Unsere Untersuchungen zeigten eine deutlich geringere Wirkung von aTZRmu-F(ab')₂ auf humane TZR-transgene T Zellen in vitro, die zumindest teilweise noch auf residualen Vollantikörper zurückzuführen war. In vivo ließ sich keine spezifische Apoptose TZR-transgener T Zellen durch aTZRmu-F(ab')₂ nachweisen, im Sinne einer Anwendung in der nicht-invasiven Immuno-PET/CT Bildgebung transgener T Zellen. (Mall, Yusufi et al. 2016) Neben der Dosierung von aTZRmu-F(ab')₂ ist dabei die Rolle der Transduktionseffizienz in Gestalt der exprimierten TZR-Dichte der Zielzellen zu beachten.

7 Zusammenfassung

In der Immuntherapie von Tumoren konnten gerichtete Anti-Tumor-Reaktionen unter anderem durch den adoptiven Zell-Transfer von T Zellen, genetisch modifiziert mit antigenspezifischen TZR, erreicht werden, wobei eine Verbesserung der klinischen Wirksamkeit unter Reduktion von Nebenwirkungen angestrebt wird. Durch murine konstante Ketten humaner antigenspezifischer TZR (TZRmu) konnte die korrekte Oberflächenexpression dieser transgenen TZR gesteigert und eine spezifische Bindung und Markierung erfolgreich genetisch modifizierter, gerichteter T Zellen durch aTZRmu-IgG ermöglicht werden. Einflüsse einer aTZRmu-Bindung auf humane T Zellen, retroviral transduziert mit dem murinisierten humanen TZR 2.5D6(-iRFP), wurden in dieser Arbeit untersucht. Hierfür erfolgte eine Inkubation mit aTZRmu-IgG im Vergleich zu leer-transduzierten T Zellen und Isotyp-Kontrollen sowie eine Inkubation mit dem Antikörper-Derivat aTZRmu-F(ab')₂ in vitro und in vivo. Humane transgene T Zellen zeigten nach 12-stündiger Inkubation mit aTZRmu-IgG eine konzentrationsabhängige, spezifische Apoptose und Aktivierung im Sinne einer IFN γ -Sekretion in vitro. Eine Umpufferung der Antikörper in reines PBS reduzierte unspezifische Begleiteffekte der NaN₃-haltigen Pufferlösung, die vermutlich auch die Proliferationsanalyse beeinflusste. Ein Zeitfenster von 5min Inkubation mit den angegebenen Antikörper-Konzentrationen zeigte sich ausreichend für eine aTZRmu-IgG-Bindung mit spezifischer Apoptose und Aktivierung nach 12h. Weiterhin war die spezifische Anti-Tumor-Reaktivität humaner transgener T Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit aTZRmu-IgG sowie bei Koinkubation vermindert. In vivo zeigten humane TZR 2.5D6-iRFP-transgene CD8+ T_{cm}, die NSG-Mäusen nach niedrig-dosierter Ganzkörperbestrahlung unter Substitution von hIL-15 injiziert wurden, einen Tag nach Injektion von aTZRmu-IgG eine IFN γ -Sekretion assoziiert mit einem reduzierten Allgemeinzustand der aTZRmu-IgG-Tiere in Abhängigkeit von der Menge transgener Zellen. Eine aTZRmu-IgG-Bindung und spezifische Depletion TZR 2.5D6-iRFP-transgener humaner T Zellen in vivo zeigte sich in Blut und Milz der Tiere bereits einen Tag nach aTZRmu-IgG-Injektion mit weiterer Reduktion und einem Maximum der Depletion im Blut der Tiere 6 bzw. 7 Tage nach aTZRmu-IgG-Injektion.

Nach 12-stündiger Inkubation mit aTZRmu-F(ab')₂ in vitro zeigten humane transgene T Zellen deutlich geringere Änderungen der Apoptose, IFN γ -Sekretion, Proliferation und Funktionalität. Vor dem Hintergrund variierender Anteile an residualem aTZRmu-Vollantikörper in den verwendeten insgesamt 6 aTZRmu-F(ab')₂-Präparationen konnten nach einer Wirkdauer von 12h spezifisch durch aTZRmu-F(ab')₂ keine Effekte reproduzierbar nachgewiesen werden. Allerdings können aTZRmu-F(ab')₂-spezifische Effekte überlagert durch den Nachweis residualen Vollantikörpers nicht ausgeschlossen werden. In vivo zeigten humane TZR 2.5D6-iRFP-transgene CD8+ T_{cm} im beschriebenen Mausmodell 6 bzw. 7 Tage nach aTZRmu-F(ab')₂-Injektion weniger freie aTZRmu-Bindungsstellen verglichen mit Isotyp-F(ab')₂-Injektion. Jedoch lagen verglichen mit aTZRmu-IgG-Injektionen nach aTZRmu-F(ab')₂-Gabe noch deutlich mehr freie aTZRmu-Bindungsstellen vor, was zu einer Freigabe vieler TZR im Zuge einer geringeren Plasma-Halbwertszeit des F(ab')₂-Fragments bei geringerer Größe im Vergleich zu aTZRmu-IgG passen würde. Eine spezifische Apoptose TZR 2.5D6-iRFP-transgener humaner T Zellen durch aTZRmu-F(ab')₂ ließ sich auch in vivo nicht nachweisen.

Neben der Reinheit und Dosierung des aTZRmu-F(ab')₂ ist jedoch die Transduktionseffizienz, auch in Gestalt der exprimierten TZR-Dichte, zu berücksichtigen, die eine Wirkung durch aTZRmu-F(ab')₂-Bindung beeinflussen könnte. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Anwendung des aTZRmu-F(ab')₂ für eine nicht-invasive Darstellung humaner transgener T Zellen in vivo mittels Immuno-PET/CT.

8 Literaturverzeichnis

Advani, R., I. Flinn et al. (2018). „CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma.“ *New England Journal of Medicine* 379(18): 1711-1721.

Ahmadzadeh, M., L. A. Johnson et al. (2009). „Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired.“ *Blood* 114(8): 1537-1544.

Ali, N., B. Flutter et al. (2012). „Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype.“ *PLOS ONE* 7(8): e44219.

Animal Research Advisory Committee (ARAC) (2022, April 27). „Guidelines for endpoints in animal study proposals.“ Office of animal care and use, Office of intramural research, NIH.
<https://oacu.oir.nih.gov/animal-research-advisory-committee-arac-guidelines>

Barrett, A. J., D. Mavroudis et al. (1998). „T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell add-back to control acute GVHD and conserve a graft-versus-leukemia effect.“ *Bone Marrow Transplantation* 21(6): 543-551.

Beckford Vera, D. R., C. C. Smith et al. (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.

Bendle, G. M., C. Linnemann et al. (2010). „Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy.“ *Nature Medicine* 16(5): 565-570.

Berger, C., M. C. Jensen et al. (2008). „Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates.“ *Journal of Clinical Investigation* 118(1): 294-305.

Berger, C., M. E. Flowers et al. (2006). „Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation.“ *Blood* 107(6): 2294-2302.

Berraondo, P., M. F. Sanmamed et al. (2019). „Cytokines in clinical cancer immunotherapy.“ *British Journal of Cancer* 120(1): 6-15.

Bhatnagar, P., Z. Li et al. (2013). „Imaging of genetically engineered T cells by PET using gold nanoparticles complexed to Copper-64.“ *Integrative Biology* 5(1): 231-238.

Blass, E. und P. A. Ott (2021). „Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines.“ *Nature Reviews Clinical Oncology* 18(4): 215-229.

Böcker, W., H. Denk et al. (2012). „Pathologie.“ Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag: 5. Auflage.

Boissel, L., M. Betancur et al. (2012). „Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens.“ *Leukemia and Lymphoma* 53(5): 958-965.

Borghaei, H., L. Paz-Ares et al. (2015). „Nivolumab versus Docetaxel in advanced non-squamous non-small cell lung cancer.“ *New England Journal of Medicine* 373(17): 1627-1639.

- Botti, C., D. R. M. Negri et al. (1997). „Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes.“ *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 24(5): 497-504.
- Brahmer, J., K. L. Reckamp et al. (2015). „Nivolumab versus Docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer.“ *New England Journal of Medicine* 373(2): 123-135.
- Burkholder, T., C. Foltz et al. (2012). „Health evaluation of experimental laboratory mice.“ *Current Protocols in Mouse Biology* 2: 145-165.
- Burnet, F.M. (1970). „The concept of immunological surveillance.“ *Progress in experimental Tumor Research* 13: 1-27.
- Burns, L. J., D. J. Weisdorf et al. (2003). „IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial.“ *Bone Marrow Transplantation* 32(2): 177-186.
- Busch D., S. P. Fräßle et al. (2016). „Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy.“ *Seminars in Immunology* 28(1): 28-34.
- Cabrera, T., M. Angustias Fernandez et al. (1996). „High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas.“ *Human Immunology* 50(2): 127-134.
- Carpenter, P. A., S. Pavlovic et al. (2000). „Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells.“ *Journal of Immunology* 165(11): 6205-6213.
- Carreno, B. M., V. Magrini et al. (2015). „A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells.“ *Science* 348(6236): 803-808.
- Chihara, N., A. Madi et al. (2018). „Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells.“ *Nature* 558(7710): 454-459.
- Chodon, T., B. Comin-Anduix et al. (2014). „Adoptive transfer of MART-1 T cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma.“ *Clinical Cancer Research* 20(9): 2457-2465.
- Chomez, P., O. De Backer et al. (2001). „An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family.“ *Cancer Research* 61(14): 5544-5551.
- Cohen, C. J., Y. F. Li et al. (2007). „Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-Cell Receptors with a second disulfide bond.“ *Cancer Research* 67(8): 3898-3903.
- Cohen, C. J., Y. Zhao et al. (2006). „Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-Cell Receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability.“ *Cancer Research* 66(17): 8878-8886.
- Collins, R. H., O. Shpilberg et al. (1997). „Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation.“ *Journal of Clinical Oncology* 15(2): 433-444.
- Critchfield, J. M., J. C. Zúñiga-Pflücker et al. (1995). „Parameters controlling the programmed death of mature mouse T lymphocytes in high-dose suppression.“ *Cellular Immunology* 160(1): 71-78.

Curti, A., L. Ruggeri et al. (2016). „Larger size of Donor Alloreactive NK Cell Repertoire correlates with better response to NK Cell Immunotherapy in elderly Acute Myeloid Leukemia patients.“ *Clinical Cancer Research* 22(8): 1914-1921.

Curti, B. D., M. Kovacovics-Bankowski et al. (2013). „OX40 is a potent immune stimulating target in late stage cancer patients.“ *Cancer Research* 73(24): 7189-7198.

D'Angelo, S. P., L. Melchiori et al. (2018). „Antitumor activity associated with prolonged persistence of adoptively transferred NY-ESO-1^{c259} T cells in synovial sarcoma.“ *Cancer Discovery* 8(8): 944-957.

Davila, M. L., I. Riviere et al. (2014). „Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia.“ *Science Translational Medicine* 6(224): [23S.].

Davis, J. L., M. R. Theoret et al. (2010). „Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and non-responding patients enrolled in TCR gene therapy trials.“ *Clinical Cancer Research* 16(32): 5852-5861.

Deng, R., M. Khattar et al. (2014). „Anti-TCR mAb induces peripheral tolerance to alloantigens and delays islet allograft rejection in autoimmune diabetic NOD mice.“ *Transplantation* 97(12): 1216-1224.

Di Stasi, A., S.-K. Tey et al. (2011). „Inducible apoptosis as a safety switch for Adoptive Cell Therapy.“ *New England Journal of Medicine* 365(18): 1673-1683.

Dobrenkov, K., M. Olszewska et al. (2008). „Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging.“ *Journal of Nuclear Medicine* 49(7): 1162-1170.

Drobyski, W. R., D. Majewski (1996). „Treatment of donor mice with an $\alpha\beta$ T-cell receptor monoclonal antibody induces prolonged T-cell nonresponsiveness and effectively prevents lethal graft-versus-host disease in murine recipients of Major Histocompatibility Complex (MHC)-matched and MHC-mismatched donor marrow grafts.“ *Blood* 87(12): 5355-5369.

Dudley, M. E., C. A. Gross et al. (2010). „CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma.“ *Clinical Cancer Research* 16(24): 6122-6131.

Dudley, M. E., J. C. Yang et al. (2008). „Adoptive Cell Therapy for patients with metastatic melanoma: Evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens.“ *Journal of Clinical Oncology* 26(32): 5233-5239.

Dunn, G.P., A. T. Bruce et al. (2002). „Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.“ *Nature immunology* 3(11): 991-998.

Duong, M. T., M. R. Collinson-Pautz et al. (2018) „Two-dimensional regulation of CAR-T cell therapy with orthogonal switches.“ *Molecular Therapy Oncolytics* 12: 124-137.

Eto, M., Y. Yoshikai et al. (1994). „Inhibition of allograft rejection by anti-T-cell receptor- $\alpha\beta$ monoclonal antibodies preserving resistance to bacterial infection.“ *Immunology* 81(2): 198-204.

European Medicines Agency (2023). „Abecma (idecabtagene vicleucel): EPAR – Product Information [First published: 25/08/2021. Last updated: 21/12/2022].“

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/abecma>

European Medicines Agency (2023). „Breyanzi (lisocabtagene maraleucl): EPAR – Product Information [First published: 08/04/2022. Last updated: 25/05/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/breyanzi>

European Medicines Agency (2023). „Carvykti (ciltacabtagene autoleucl): EPAR – Product Information [First published: 17/01/2023. Last updated: 14/04/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/carvykti>

European Medicines Agency (2023). „Ebvallo (tabeclleucl): EPAR – Product Information [First published: 11/01/2023. Last updated: 10/03/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ebvallo>

European Medicines Agency (2023). „Kymriah (tisagenlecleucl): EPAR – Product Information [First published: 19/09/2018. Last updated: 10/05/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>

European Medicines Agency (2023). „Tecartus (brexucabtagene autoleucl): EPAR – Product Information [First published: 25/01/2021. Last updated: 30/01/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/Tecartus>

European Medicines Agency (2023). „Yescarta (axicabtagene ciloleucl): EPAR – Product Information [First published: 10/09/2018. Last updated: 30/01/2023].“
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>

Filonov, G.S., K. D. Piatkevich et al. (2011). „Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging.“ *Nature Biotechnology* 29(8): 757-761.

Finney, H. M., A.D. Lawson et al. (1998). „Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product.“ *Journal of Immunology* 161(6): 2791-2797.

Fry, T. J., N.N. Shah et al. (2018). „CD22-CAR T cells induce remissions in CD19-CAR naïve and resistant B-ALL.“ *Nature Medicine* 24(1): 20-28.

Gallegos, A. M., H. Xiong et al. (2016). „Control of T cell antigen reactivity via programmed TCR downregulation.“ *Nature Immunology* 17(4): 379-368.

Gattinoni, L., E. Lugli et al. (2011). „A human memory T-cell subset with stem cell-like properties.“ *Nature Medicine* 17(10): 1290-1297.

Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021). „Krebs in Deutschland für 2017/2018.“ Robert Koch-Institut: 13. Ausgabe.

Giavridis, T., S. J. C. van der Stegen et al. (2018). „CAR T cell–induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade.“ *Nature Medicine* 24(6): 731-738.

Griffioen, M., E. H. M. van Egmond et al. (2009). „Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy.“ *Haematologica* 94(9): 1316-1320.

Griessinger, C. M., A. Maurer et al. (2015). „⁶⁴Cu antibody-targeting of the T-cell receptor and subsequent internalization enables in vivo tracking of lymphocytes by PET.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(4): 1161-1166.

Griessinger, C. M., R. Kehlbach et al. (2014). „In vivo tracking of Th1 cells by PET reveals quantitative and temporal distribution and specific homing in lymphatic tissue.” *Journal of Nuclear Medicine* 55(2): 301-307.

Groettrup, M., A. Baron et al. (1992). „T cell receptor (TCR) β chain homodimers on the surface of immature but not mature α , γ , δ chain deficient T cell lines.” *EMBO Journal* 11(7): 2735-2746.

Grupp, S. A., M. Kalos et al. (2013). „Chimeric Antigen Receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia.” *New England Journal of Medicine* 368(16): 1509-1518.

Gust, J., K. A. Hay et al. (2017). „Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells.” *Cancer Discovery* 7(12): 1404-1419.

Hay, K. A., L. Hanafi et al. (2017). „Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor–modified T-cell therapy.” *Blood* 130(21): 2295-2306.

Henrickson, M., J. Reid et al. (1995). „Comparison of in vivo efficacy and mechanism of action of antimurine monoclonal antibodies directed against TCR $\alpha\beta$ (H57-597) and CD3 (145-2C11).” *Transplantation* 60(8): 828-835.

Hernandez-Chacon, J. A., Y. Li et al. (2011). „Co-stimulation through the CD137/4-1BB pathway protects human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death and enhances anti-tumor effector function.” *Journal of Immunotherapy* 34(3): 236-250.

Heslop, H. E., C. Y. Ng et al. (1996). „Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes.” *Nature Medicine* 2(5): 551-555.

Hodi, F. S., S. J. O’Day et al. (2010). „Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma.” *New England Journal of Medicine* 363(8): 711-723.

Hofmann, S., M. Schmitt et al. (2019). „Donor lymphocyte infusion leads to diversity of specific T cell responses and reduces regulatory T cell frequency in clinical responders.” *International Journal of Cancer* 144(5): 1135-1146.

Horowitz, M. M., R. P. Gale et al. (1990). „Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.” *Blood* 75(3): 555-562.

Hu, Z., D. E. Leet et al. (2021). „Personal Neoantigen Vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma.” *Nature Medicine* 27(3): 515-525.

Hu, Z., P. A. Ott et al. (2018). „Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer.” *Nature Reviews Immunology* 18(3): 168-182.

Imai, C., K. Mihara et al. (2004). „Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia.” *Leukemia* 18(4): 676-684.

Introna, M., A. M. Barbu et al. (2000). „Genetic modification of human T cells with CD20: A strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies.“ *Human Gene Therapy* 11(4): 611-620.

Jadvar, H., L.-P. Yap et al. (2012). „¹⁸F]-2'-fluoro-5-methyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil (¹⁸F-FMAU) in prostate cancer: Initial preclinical observations.“ *Molecular Imaging* 11(5): 426–432.

Johnson, L. A., J. Scholler et al. (2015). „Rational development and characterization of humanized anti- EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma.“ *Science Translational Medicine* 7(275): [30S].

Johnson, L. A., R. A. Morgan et al. (2009). „Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen.“ *Blood* 114(3): 535-546.

Kageyama, S., H. Ikeda et al. (2015). „Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer.“ *Clinical Cancer Research* 21(10): 2268-2277.

Kalos, M., B. L. Levine et al. (2011). „T cells with Chimeric Antigen Receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia.“ *Science Translational Medicine* 3(95): [21S].

Kanwar, B., D. W. Gao et al. (2008). „In vivo imaging of mucosal CD4⁺ T cells using single photon emission computed tomography in a murine model of colitis.“ *Journal of Immunological Methods* 329(1-2): 21-30.

Kaufman, H. L., J. Russell et al. (2016). „Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial.“ *The Lancet Oncology* 17(10): 1374-1385.

Kay, M. A. (2011). „State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead.“ *Nature Reviews Genetics* 12(5): 316-328.

Keu, K. V., T. H. Witney et al. (2017). „Reporter gene imaging of targeted T-cell immunotherapy in recurrent glioma.“ *Science Translational Medicine* 9(373): eaag2196.

Kishimoto, K., K. Furukawa et al. (2000). „Profile of cytokine production during the inhibition of acute xenograft rejection.“ *Surgery Today* 30(2): 159-162.

Klar, R., S. Schober et al. (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.

Klebanoff, C. A., C. D. Scott et al. (2016). „Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy.“ *Journal of Clinical Investigation* 126(1): 318-334.

Klebanoff, C. A., L. Gattinoni et al. (2005). „Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(27): 9571-9576.

Klebanoff, C. A., L. Gattinoni et al. (2011). „Determinants of successful CD8⁺ T cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice.“ *Clinical Cancer Research* 17(16): 5343-5352.

- Klebanoff, C. A., S. E. Finkelstein et al. (2004). „IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(7): 1969-1974.
- Klug, F., H. Prakash et al. (2013). „Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy.“ *Cancer Cell* 24(5): 589-602.
- Kolb, H. J., J. Mittermüller et al. (1990). „Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients.“ *Blood* 76(12): 2462-2465.
- Korkolopoulou, P., L. Kaklamanis et al. (1996). „Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer.“ *British Journal of Cancer* 73(2): 148-153.
- Koya, R. C., S. Mok et al. (2010). „Kinetic phases of distribution and tumor targeting by T cell receptor engineered lymphocytes inducing robust antitumor responses.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(32): 14286-14291.
- Krebs, S., A. Ahad et al. (2018). „Antibody with infinite affinity for in vivo tracking of genetically engineered lymphocytes.“ *Journal of Nuclear Medicine* 59(12): 1894-1900.
- Kuball, J., M. L. Dossett et al. (2007). „Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells.“ *Blood* 109(6): 2331-2338.
- Kubo, R.T., W. Born et al. (1989). „Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine $\alpha\beta$ T cell receptors.“ *Journal of Immunology* 142(8): 2736-2742.
- Lasfar, A., H. Gogas et al. (2016). „IFN- λ cancer immunotherapy: new kid on the block.“ *Immunotherapy* 8(8): 877-888.
- Lee, D. W., B. D. Santomaso et al. (2019) „ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells.“ *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 25(4): 625-638.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler et al. (1998). „Genetic instabilities in human cancers.“ *Nature* 396(6712): 643-649.
- Li, B., H. Wang et al. (2005). „Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions.“ *Immunology* 116(4): 487-498.
- Linette, G. P., E. A. Stadtmauer et al. (2013). „Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma.“ *Blood* 122(6): 863-871.
- Liu, E., D. Marin et al. (2020) „Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors.“ *New England Journal of Medicine* 382(6): 545-553.
- Locke, F. L., A. Ghobadi et al. (2019). „Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial.“ *Lancet Oncology* 20(1): 31-42.
- Mahe, E., T. Pugh et al. (2018). „T cell clonality assessment: past, present and future.“ *Journal of Clinical Pathology* 71(3): 195-200.

Majzner, R. G., S. Ramakrishna et al. (2022). „GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas.“ *Nature* 603(7903): 934-941.

Mall, S. (2016). „In vivo monitoring of cancer specific TCR-engineered human T cells by Immuno-PET to analyze pharmacokinetics of T-cell based immunotherapies.“ Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Technische Universität München, Fakultät für Medizin.

Mall, S., N. Yusufi et al. (2016). „Immuno-PET Imaging of engineered human T cells in tumors.“ *Cancer Research* 76(14): 4113-4123. (Vorveröffentlichung von Teilergebnissen der Dissertation)

Matosevic, S. (2018). „Viral and nonviral engineering of natural killer cells as emerging adoptive cancer immunotherapies.“ *Journal of Immunology Research* 2018(ID 4054815): 1-20. [<https://doi.org/10.1155/2018/45054815>]

Maude, S. L., N. Frey et al. (2014). „Chimeric Antigen Receptor T cells for sustained remissions in leukemia.“ *New England Journal of Medicine* 371(16): 1507-1517.

Maude, S. L., T. W. Laetsch et al. (2018). „Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia.“ *New England Journal of Medicine* 378(5): 439-448.

Maus, M. V., A. R. Haas et al. (2013). „T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans.“ *Cancer Immunology Research* 1(1): 26-31.

Mayer, K. E., S. Mall et al. (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 et al. (2015). „Noninvasive detection of tumor-infiltrating T cells by PET reporter imaging.“ *Journal of Clinical Investigation* 125(5): 1815-1826.

Migden, M. R., D. Rischin et al. (2018). „PD-1 Blockade with Cemiplimab in advanced cutaneous squamous-cell carcinoma.“ *New England Journal of Medicine* 379(4): 341-351.

Miyahara, Y., M. Khattar et al. (2012). „Anti-TCR β mAb induces long-term allograft survival by reducing antigen-reactive T-cells and sparing regulatory T-cells.“ *American Journal of Transplantation* 12(6): 1409-1418.

Moolten, F. L. (1986). „Tumor chemosensitivity conferred by inserted Herpes Thymidine Kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy.“ *Cancer Research* 46(10): 5276-5281.

Morgan, R. A. (2012) „Live and let die: a new suicide gene therapy moves to the clinic.“ *Molecular Therapy* 20(1): 11-13.

Morgan, R. A., M. E. Dudley et al. (2006). „Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.“ *Science* 314(5796): 126-129.

Morgan, R. A., N. Chinnasamy et al. (2013). „Cancer regression and neurologic toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy.“ *Journal of Immunotherapy* 36(2): 133-151.

- Murakami, Y., Y.-Y. Kong et al. (1995). „Prevention of anti-T-cell receptor $\alpha\beta$ monoclonal antibody-induced side-effects by treatment with cyclosporin A without interference of monoclonal antibody-induced immunosuppression in mice.“ *Immunology* 86(2): 238-243.
- Muul, L. M., P. J. Spiess et al. (1987). „Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma.“ *Journal of Immunology* 138(3): 989-995.
- Necchi, A., R. W. Joseph et al. (2017). „Atezolizumab in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: post-progression outcomes from the phase II IMvigor210 study.“ *Annals of Oncology* 28(12): 3044-3050.
- Neelapu, S. S., F. L. Locke et al. (2017). „Axicabtagene Ciloleucele CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma.“ *New England Journal of Medicine* 377(26): 2531-2544.
- Norelli, M., B. Camisa et al. (2018). „Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells.“ *Nature Medicine* 24(6): 739-748.
- Ott, P. A., Z. Hu et al. (2017). „An immunogenic personal Neoantigen Vaccine for melanoma patients.“ *Nature* 547(7662): 217-221.
- Pandha, H., A. Riggs et al. (2007). „Loss of expression of antigen-presenting molecules in human pancreatic cancer and pancreatic cancer cell lines.“ *Clinical and Experimental Immunology* 148(1): 127-135.
- Pandit-Taskar, N., J. A. O'Donoghue et al. (2016). „First-in-human imaging with ^{89}Zr -Df-IAB2M anti-PSMA minibody in patients with metastatic prostate cancer: Pharmacokinetics, biodistribution, dosimetry and lesion uptake.“ *Journal of Nuclear Medicine* 57(12): 1858-1864.
- Pandit-Taskar, N., M. A. Postow et al. (2020). „First-in-humans imaging with ^{89}Zr -Df-IAB22M2C anti-CD8 minibody in patients with solid malignancies: Preliminary pharmacokinetics, biodistribution, and lesion targeting.“ *Journal of Nuclear Medicine* 61(4): 512-519.
- Parkhurst, M. R., J. C. Yang et al. (2011). „T cells targeting Carcinoembryonic Antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis.“ *Molecular Therapy* 19(3): 620-626.
- Parkhurst, M. R., J. P. Riley et al. (2011). „Adoptive transfer of autologous Natural Killer cells leads to high levels of circulating Natural Killer cells but does not mediate tumor regression.“ *Clinical Cancer Research* 17(19): 6287-6297.
- Pegg, D. E. (2015). „Principles of Cryopreservation.“ *Methods in Molecular Biology* 1257: 3-19.
- Philip, B., E. Kokalaki et al. (2014). „A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy.“ *Blood* 124(8): 1277-1287.
- Postow, M. A., M. K. Callahan et al. (2015). „Immune checkpoint blockade in cancer therapy.“ *Journal of Clinical Oncology* 33(17): 1974-1982.
- Powles, T., P. H. O'Donnell et al. (2017). „Efficacy and safety of Durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma.“ *JAMA Oncology* 3(9): e172411.

Przepiorka, D., G. L. Phillips et al. (1998). „A Phase II Study of BTI-322, a monoclonal anti-CD2 antibody, for treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease.“ *Blood* 92(11): 4066-4071.

Pule, M. A., B. Savoldo et al. (2008). „Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma.“ *Nature Medicine* 14(11): 1264-1270.

Ramachandran, I., D. E. Lowther et al. (2019). „Systemic and local immunity following adoptive transfer of NY-ESO-1 SPEAR T cells in synovial sarcoma.“ *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7(1): 276-290.

Ramos, C. A., B. Ballard et al. (2017). „Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor–redirected lymphocytes.“ *Journal of Clinical Investigation* 127(9): 3462-3471.

Ramos, C. A., B. Savoldo et al. (2016). „Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains.“ *Journal of Clinical Investigation* 126(7): 2588-2596.

Ramos, C. A., N. S. Grover et al. (2020). „Anti-CD30 CAR-T cell therapy in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma.“ *Journal of Clinical Oncology* 38(32): 3794-3804.

Rapoport, A. P., E. A. Stadtmauer et al. (2015). „NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma.“ *Nature Medicine* 21(8): 914-921.

Rashidian, M., M. W. LaFleur et al. (2019). „Immuno-PET identifies the myeloid compartment as a key contributor to the outcome of the antitumor response under PD-1 blockade.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(34): 16971-16980.

Restifo, N. P., F. M. Marincola et al. (1996). „Loss of functional beta₂-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy.“ *Journal of the National Cancer Institute* 88(2): 100–108.

Ribas, A., I. Puzanov et al. (2015). „Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial.“ *The Lancet Oncology* 16(8): 908-918.

Ribas, A., M. R. Benz et al. (2010). „Imaging of CTLA4 blockade-induced cell replication with 18F-FLT PET in patients with advanced melanoma treated with Tremelimumab.“ *Journal of Nuclear Medicine* 51(3): 340-346.

Robbins, P. F., S. H. Kassim et al. (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.“ *Clinical Cancer Research* 21(5): 1019-1027.

Robert, C., A. Ribas et al. (2014). „Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial.“ *The Lancet* 384(9948): 1109-1117.

Robert, C., L. Thomas et al. (2011). „Ipilimumab plus Dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma.“ *New England Journal of Medicine* 364(26): 2517-2526.

- Rosenberg, S. A. (2011). „Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know.“ *Nature Reviews Clinical Oncology* 8(10): 577-585.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard et al. (1988). „Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.“ *New England Journal of Medicine* 319(25): 1676-1680.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang et al. (2011). „Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.“ *Clinical Cancer Research* 17(13): 4550-4557.
- Rueff, J., M. Medinger et al. (2014). „Lymphocyte subset recovery and outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation for plasma cell myeloma“ *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 20(6): 896-899.
- Russell, J. H., C. L. White et al. (1991). „Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(6): 2151-2155.
- Sahin, U., E. Derhovanessian et al. (2017). „Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer.“ *Nature* 547(7662): 222-226.
- Sakamoto, N., T. Ishikawa et al. (2015). „Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer.“ *Journal of Translational Medicine* 13(277): 1-13.
- Sallusto, F., D. Lenig et al. (1999). „Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.“ *Nature* 401(6754): 708-712.
- Santomasso, B. D., J.H. Park et al. (2018). „Clinical and biologic correlates of neurotoxicity associated with CAR T cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL).“ *Cancer Discovery* 8(8): 958-971.
- Schachter, J., A. Ribas et al. (2017). „Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006).“ *The Lancet* 390(10105): 1853-1862.
- Schneider, H., J. Downey et al. (2006). „Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4.“ *Science* 313(5795): 1972-1975.
- Schuster, S. J., J. Svoboda et al. (2017). „Chimeric Antigen Receptor T cells in refractory B-cell lymphomas.“ *New England Journal of Medicine* 377(26): 2545-2554.
- Schuster, S. J., M. R. Bishop et al. (2019). „Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma.“ *New England Journal of Medicine* 380(1): 45-56.
- Serafini, M., M. Manganini et al. (2004). „Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease.“ *Human Gene Therapy* 15(1): 63-76.
- Sfanos, K. S., T. C. Bruno et al. (2009). „Human prostate-infiltrating CD8⁺ T Lymphocytes are oligoclonal and PD-1⁺.“ *Prostate* 69(15): 1694-1703.

- Sharma, S. K., A. Chow et al. (2018). „Fc-mediated anomalous biodistribution of therapeutic antibodies in immunodeficient mouse models.“ *Cancer Research* 78(7): 1820-1832.
- Shiheido, H., C. Chen et al. (2014). „Modulation of the human T cell response by a novel non-mitogenic anti-CD3 antibody.“ *PLOS ONE* 9(4): e94324.
- Shu, C. J., S. Guo et al. (2005). „Visualization of a primary anti-tumor immune response by positron emission tomography.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(48): 17412-17417.
- Shultz, L. D., F. Ishikawa et al. (2007). „Humanized mice in translational biomedical research.“ *Nature Reviews Immunology* 7(2): 118–130.
- Sommermeier, D., M. Hudecek et al. (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.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2022). „Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen.“ GENESIS V4.3.3 – 2021: Ergebnis 23211-0001.
- Stavrou, M., B. Philip et al. (2018). „A Rapamycin-Activated Caspase 9-Based Suicide Gene.“ *Molecular Therapy* 26(5): 1266-1276.
- Sun, S., H. Hao et al. (2018). „Immunotherapy with CAR-modified T cells: Toxicities and overcoming strategies.“ *Journal of Immunology Research* 2018(ID 2386187): 1-10.
[<https://doi.org/10.1155/2018/2386187>]
- Tang, X., L. Yang et al. (2018). „First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia.“ *American Journal of Cancer Research* 8(6): 1083-1089.
- Tavaré, R., H. Escuin-Ordinas et al. (2016). „An effective immuno-PET imaging method to monitor CD8-dependent responses to immunotherapy.“ *Cancer Research* 76(1): 73-82.
- Tavaré, R., M. N. McCracken et al. (2015). „ImmunoPET of murine T cell reconstitution post-adoptive stem cell transplant using anti-CD4 and anti-CD8 cys-diabodies.“ *Journal of Nuclear Medicine* 56(8): 1258-1264.
- Tawara, I., S. Kageyama et al. (2017). „Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS.“ *Blood* 130(18): 1985-1994.
- Teunissen, A. J. P., O. B. Abousaway et al. (2021). „Employing nanobodies for immune landscape profiling by PET imaging in mice.“ *STAR Protocols* 2(2): 100434.
- Thompson, R. H., S. M. Kuntz et al. (2006). „Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up.“ *Cancer Research* 66(7): 3381-3385.
- Topalian, S. L., F. S. Hodi et al. (2012). „Safety, activity, and immune correlates of Anti-PD-1 Antibody in cancer.“ *New England Journal of Medicine* 366(26): 2443-2454.
- Traversari, C., S. Marktel et al. (2007). „The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies.“ *Blood* 109(11): 4708-1715.

- Turaj, A.H., K. L. Cox et al. (2018). „Augmentation of CD134 (OX40)-dependent NK anti-tumour activity is dependent on antibody cross-linking.“ *Scientific reports* 8(2278): 1-11.
- Vaddepally, R. K., P. Kharel et al. (2020). „Review of indications of FDA-approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence.“ *Cancers* 12(3): 738 -756.
- Van der Bruggen, P., C. Traversari et al. (1991). „A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.“ *Science* 254(5038): 1643-1647.
- Van der Donk, L. E. H., L. S. Ates et al. (2021). „Separate signaling events control TCR downregulation and T cell activation in primary human T cells.“ *Immunity, Inflammation and Disease* 9(1): 223-238.
- Van Loenen, M. M., R. de Boer et al. (2010). „Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(24): 10972-10977.
- Voss, R.-H., J. Kuball et al. (2006). „Redirection of T cells by delivering a transgenic mouse-derived MDM2 tumor antigen-specific TCR and its humanized derivative is governed by the CD8 coreceptor and affects natural human TCR expression.“ *Immunologic Research* 34(1): 67-87.
- Wang, J., M. Jensen et al. (2007). „Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains.“ *Human Gene Therapy* 18(8): 712-725.
- Wang, V., M. Gauthier et al. (2023). „Systematic review on CAR-T cell clinical trials up to 2022: Academic center input.“ *Cancers (Basel)* 15(4): 1003-1020.
- Wang, X., C. Berger et al. (2011). „Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice.“ *Blood* 117(6): 1888-1898.
- Wang, X., W.-C. Chang et al. (2011). „A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells.“ *Blood* 118(5): 1255-1263.
- Weigand, L. U., X. Liang et al. (2012). „Isolation of human MHC class II-restricted T cell receptors from the autologous T-cell repertoire with potent anti-leukaemic reactivity.“ *Immunology* 137(3): 226-238.
- Weist, M. R., R. Starr et al. (2018). „PET of adoptively transferred Chimeric Antigen Receptor T cells with ⁸⁹Zr-Oxine.“ *Journal of Nuclear Medicine* 59(10): 1531-1537.
- Yusufi, N., S. Mall et al. (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.
- Zhang, W., Y. Wang et al. (2016). „Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report.“ *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1(16002): 1-9.
- Zheng, L., C. L. Trageser et al. (1998). „T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death.“ *Journal of Immunology* 160(2): 763-769.
- Zhou, X., G. Dotti et al. (2015). „Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation.“ *Blood* 125(26): 4103-4113.

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Angela Krackhardt für die Bereitstellung des Themas zur Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe, die ausgezeichnete Betreuung und ausdauernde Unterstützung in allen Aspekten dieser Arbeit. Ich bin sehr dankbar, dass sie sich immer Zeit für mich und mein Projekt genommen hat. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Christian Peschel und Prof. Dr. Markus Schwaiger für die Unterstützung und Bereitstellung ihrer Labore und Ausstattung danken. Dr. Calogero d'Alessandria und Dr. Nahid Yusufi möchte ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere die Herstellung der F(ab')₂-Fragmente danken. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dirk Busch als Zweitbetreuer und Prof. Dr. Jürgen Ruland als Mentor für die zuverlässige und interessierte Begleitung meines Projektes bedanken im Rahmen des Promotionsprogrammes Translationale Medizin, das mir viele Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten geboten hat.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Krackhardt für die schöne gemeinsame Zeit und die große Unterstützung. Insbesondere bei Dr. Sabine Mall möchte ich mich bedanken, die mich geduldig eingelernt, die Erkenntnisse ihrer Arbeit mit mir geteilt und mein Projekt immer mit großem Interesse unterstützt hat. Dr. Richard Klar hat den TZR, der in dieser Arbeit verwendet wurde, charakterisiert und Henrique Bianchi hat eine zusätzliche Nachweismöglichkeit in der Durchflusszytometrie durch Kopplung des TZR an ein Fluoreszenz-Protein ermöglicht. Allen dreien möchte ich ebenso wie Eva Bräunlein, Stephan Audehm, Stephanie Rämisch und Irina Fuchs für die gute Zusammenarbeit in der Zellkultur und ihre Unterstützung bei den in vivo-Versuchen danken, vor allem weil sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Darüber hinaus möchte ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und Motivation über den gesamten Zeitraum danken.

Vorveröffentlichung von Teilergebnissen der Dissertation

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 Research* 76(14): 4113-4123.