

**T-Zellen mit komplementierenden
chimären Antigen-Rezeptoren haben eine
erniedrigte Aktivierungsschwelle bei der
Erkennung von Antigen-Mustern**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Astrid Holzinger

aus

Berlin

Bonn, 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hinrich Abken
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2015
Erscheinungsjahr: 2015

Zusammenfassung

Die adoptive Immuntherapie mit chimären Antigen-Rezeptor (CAR) modifizierten T-Zellen erzielte kürzlich spektakuläre Erfolge in der Therapie leukämischer Erkrankungen, jedoch zeigten sich bei der Behandlung solider Tumore erhebliche Nebenwirkungen. Dies führte zum Abbruch klinischer Studien. Die Toxizität resultierte daher, dass das respektive Antigen auch auf gesundem Gewebe exprimiert wurde. Deshalb wurden Strategien entwickelt, um die Selektivität für Tumorzellen zu erhöhen.

Ein Ansatz macht sich die Tatsache zunutze, dass Tumorzellen andere Antigen-Muster als gesunde Zellen aufweisen. Bei der Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung werden T-Zellen mit zwei CARs ausgestattet, die diese Muster erkennen. Ein CAR liefert das Primärsignal, der zweite CAR die Kostimulation; die Komplementation beider Signale bei Bindung beider Antigene führt zur anhaltenden T-Zell Aktivierung. Die Strategie beruht bisher auf einer empirischen Kombination verschiedener CARs, wobei eine mechanistische Erklärung fehlt.

Eine Voraussetzung nach unseren Beobachtungen ist, dass die koexprimierten CARs keine stabilen Heterodimere ausbilden. Unsere Daten belegen, dass das Trennen der Signale zu einer Veränderung der Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen führt. Bei der Koexpression eines CAR mit γ Primärsignal und eines CAR mit CD28 Kostimulation wird die Aktivierungsschwelle gegenüber Zielzellen mit Expression beider Antigene erniedrigt, während die Aktivierungsschwelle gegenüber Zielzellen mit nur einem Antigen erhöht wird. Des Weiteren spielt die Anzahl der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche bei der Modulation der Aktivierungsschwelle eine entscheidende Rolle. Durch die koexprimierten CARs mit den Signalen in trans wird eine Feinregulation der T-Zell Aktivierung und hierarchische Zytokin-Freisetzung ermöglicht, wie sie auch bei der physiologischen T-Zell Aktivierung erfolgt. Dieses ist eine Verbesserung gegenüber den derzeit in Studien eingesetzten CARs, die durch die Verknüpfung der Signaldomänen in einem Rezeptormolekül keine Feinregulation in der T-Zell Antwort aufweisen.

In dieser Arbeit wurden Parameter definiert, die die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle beeinflussen. Durch die Identifikation dieser Parameter wird es ermöglicht, komplementierende CARs für die selektive Erkennung der Zielzellen einzusetzen. Dadurch erweitert sich der Anwendungsbereich der adoptiven T-Zell Therapie mit chimären Antigen-Rezeptoren für eine Vielzahl von Tumoren.

Abstract

Complementary signaling by two CARs tunes the activation threshold for combinatorial antigen recognition

Adoptive immune therapy with chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells recently produced spectacular success in the therapy of leukemia; however, CAR T cells showed fatal side effects when targeting solid tumors resulting in trial abandonment. Toxicity was due to targeting low amounts of the respective antigen on healthy tissues. Strategies were designed in order to increase selectivity to tumor cells.

One approach is based on the fact that tumor cells express particular antigen patterns different to those of healthy cells. The concept of combinatorial antigen recognition uses T cells engineered with two CARs redirected against these antigens. One CAR provides the primary signal, the second one CD28 costimulation; complementation in signaling upon binding of both antigens results in prolonged T cell activation. The current strategy empirically combines different CARs; an idea for a mechanistic rationale is still missing.

We suggest the prerequisite that the co-expressed CARs do not form stable heterodimers. Our data showed that splitting the two signals results in an altered activation threshold. Co-expression of a CAR with a primary γ signal and a CD28 costimulatory CAR lowers the activation threshold against target cells with both antigens while the threshold is increased towards cells with one antigen only. The number of CAR molecules per T cell surface is crucial for tuning the activation threshold. Co-expressed CARs with signals in trans allow fine-tuning of T cell activation and hierarchic cytokine release similar to the physiologic T cell activation. This is a significant improvement of those CARs currently used in trials which, by linking the signaling domains in one receptor molecule, do not provide a fine-tuning in the T cell response.

The Thesis defines parameters which impact the activation threshold of the CAR T cell. Identification of these determining factors revealed a roadmap for a CAR design to recognize target cells in a selective fashion. Thereby the application of adoptive cell therapy with chimeric antigen receptors is expanded to a variety of tumors.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	iii
	Abstract	iv
	Inhaltsverzeichnis	v
	Abkürzungsverzeichnis	x
1	Einleitung	1
1.1	Adoptive Immuntherapie	1
1.2	Der CAR weist eine geringere Komplexität auf als der TCR	3
1.3	Immunologische Synapse	5
1.4	Die CAR T-Zell Therapie ist effektiv gegen Tumore, induziert aber Autoreaktivität	6
1.5	Strategien zur Reduktion der Autoreaktivität	8
1.6	Zielsetzung	12
2	Material	15
2.1	Chemikalien, Stammlösungen und Puffer	15
2.2	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	15
2.3	Medien und Medienzusätze	16
2.3.1	Bakterienkultur	16
2.3.2	Zellkultur	16
2.4	Bakterienstämme	18
2.5	Primäre Zellen und Zelllinien	18
2.5.1	Primäre Zellen	18
2.5.2	Humane Zelllinien	18
2.5.3	Maus Zelllinien	19
2.6	Restriktions-Endonukleasen und Puffer	20
2.7	Oligonukleotide	21
2.7.1	Klonierungsprimer	21
2.7.2	Sequenzierungsprimer	22
2.8	Vektoren	23
2.8.1	Retrovirale CAR Expressionsvektoren	23
2.8.2	pCR2.1/pCRII Klonierungsvektoren	27
2.8.3	Sonstige Expressionsvektoren	27

2.9	Antikörper und Proteine	28
2.9.1	Antikörper	28
2.9.2	Proteine und Fusionsproteine	30
3	Methoden.....	32
3.1	Bakterienkultur.....	32
3.1.1	Kultivierung und Lagerung von E.coli DH5 α Bakterien.....	32
3.1.2	Herstellung chemokompetenter E.coli DH5 α Bakterien.....	32
3.1.3	Transformation kompetenter E.coli DH5 α	33
3.2	Isolation von Plasmid-DNS aus E.coli DH5 α	33
3.2.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNS nach der Koch-(boiling)-Methode.....	33
3.2.2	Plasmidpräparation durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule	34
3.3	Isolation von RNS aus Zellen	34
3.4	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.5	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose	35
3.6	Restriktion von DNS-Doppelsträngen.....	35
3.7	Ligation von DNS-Doppelsträngen.....	36
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.9	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	38
3.10	Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	39
3.11	Zellkultur	40
3.11.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	40
3.11.2	Passage adhärenter Zellen	40
3.11.3	Nachweis und Eliminierung von Mykoplasmen	41
3.11.4	Zellzählung und Viabilitätsbestimmung	41
3.11.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	42
3.11.6	Gewinnung humaner T-Lymphozyten	43
3.11.7	Transfektion von 293T HEK Zellen	43
3.11.8	Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen	44
3.11.9	Herstellung von Zell-Lysaten.....	44
3.12	„Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS)	45
3.13	Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analyse	45
3.14	Produktion und Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	46
3.15	Kultivierung auf beschichteten Oberflächen	47
3.16	Kokultivierung der T-Zellen mit Tumorzellen	47
3.17	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	48
3.17.1	ELISA mit Zellkulturüberständen.....	48

3.17.2	ELISA mit Zell-Lysaten	49
3.18	Multiplex-Immunoassay	50
3.19	XTT-basierter Viabilitätstest.....	50
3.20	Tumorinduktion in der Maus.....	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Generierung der rekombinanten chimären Antigen-Rezeptoren (CARs)	53
4.1.1	Klonierung des Plasmids pQCXIN-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR, E-Fc-CD28)	55
4.1.2	Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246 CARs, C- γ -P2A-E-Fc-CD28).....	57
4.1.3	Klonierung des Plasmids pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8 hinge-CD8 TM- γ (#1331 CAR, C-CD8- γ).....	59
4.1.4	Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344 CARs, C-CD8- γ -P2A-E-Fc-CD28).....	62
4.2	Die CARs werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert.....	64
4.3	Die Effizienz der CAR-vermittelten Aktivierung ist abhängig von der Voraktivierung der T-Zelle.....	65
4.4	Der CAR vermittelt eine Ligand-abhängige Aktivierung der T-Zelle.....	67
4.5	Die CD8 Brückendomäne erhöht die Anzahl der γ CAR Moleküle bei Erhalt der Funktionalität	70
4.6	Der γ CAR und der CD28 CAR bilden nicht-kovalente Heterodimere.....	72
4.7	Nach primärer CD3/CD28 TCR Stimulation lassen sich T-Zellen mit ζ oder kombiniertem CD28- ζ Signal bevorzugt nach Inkubation mit niedriger IL-2 Konzentration restimulieren.....	74
4.8	Die verminderte IL-2 Stimulation erhöht die selektive Reaktivierung der T-Zelle durch den CAR	76
4.9	Die Aktivierung des CD28 CAR wirkt der verminderten T-Zell Aktivierung durch den γ CAR entgegen.....	79
4.10	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen zeigen eine selektive Reaktivierung durch den CAR	81
4.11	Die Bindung beider Antigene durch den CD8- γ CAR und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.....	84
4.12	Die Bindung beider Antigene durch den γ CAR ohne CD8 Brückendomäne und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.....	86

4.13	Die Affinität des CAR Liganden hat keinen Einfluss auf die Verschiebung der Aktivierungsschwelle	88
4.14	Die T-Zell Aktivierung durch den γ CAR und den CD28 CAR ist abhängig von der Antigen-Dosis	90
4.15	T-Zellen mit zwei CARs exprimieren den jeweiligen CAR in geringerer Anzahl als T-Zellen mit dem einzelnen CAR	94
4.16	Die Stimulation der T-Zelle durch den γ CAR und den CD28 CAR induziert IL-2 Sekretion	96
4.17	Das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.....	98
4.18	Die primäre Tumorzelleliminierung wird durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR erhöht	100
4.19	Die Qualität der T-Zell Antwort verändert sich bei Aktivierung durch ein simultanes γ und CD28 Signal	102
4.20	Die IFN- γ Freisetzung und lytische Degranulation haben die gleiche Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle	104
4.21	Zwei CARs mit getrenntem γ und CD28 Signal haben eine erniedrigte Aktivierungsschwelle bei der Erkennung von Antigen-Mustern im Vergleich zum kombinierten CD28- γ CAR.....	106
4.22	Die erhöhte Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen mit fusioniertem Primärsignal und CD28 Kostimulation bleibt auch bei einem ζ Primärsignal erhalten	109
4.23	Die Koexpression des γ und CD28 CAR vermittelt eine selektive T-Zell Aktivierung durch Zielzellen mit beiden CAR Liganden	112
5	Diskussion	116
6	Anhang	132
6.1	Expressionkassetten neu generierter CARs.....	132
6.1.1	pQCXIN-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR, E-Fc-CD28).....	132
6.1.2	pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246 CARs, C- γ -P2A-E-Fc-CD28)	135
6.1.3	pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8 hinge-CD8 TM- γ (#1331 CAR, C-CD8- γ)	140
6.1.4	pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344 CARs, C-CD8- γ -P2A-E-Fc-CD28)	142

6.2	Retrovirale Expressionsvektoren.....	148
6.2.1	pBullet.....	148
6.2.2	pQCXIH/N.....	149
6.2.3	pMP71-wPRE	150
7	Literaturverzeichnis.....	151
	Danksagung	160
	Eigene Publikationen.....	162

Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen sowie SI-Basiseinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
AICD	activation-induced cell death
Amp^R	Ampicillin-Resistenzgen
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
BB	blocking buffer
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNS	komplementäre DNS
CEA	carcinoembryonales Antigen
CH2-CH3	konstante Domänen der schweren Kette (human IgG ₁)
CMV	Cytomegalie Virus
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(e)GFP	(enhanced) green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ErbB2/Her2/neu	epidermal growth factor receptor B2
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas Ligand (CD95L)
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallisable
FcεRI	Fc ε Rezeptor I
FLNa	Aktin-bindendes Filamin A

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fv	variables Fragment
g	Gravitationskonstante
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GvHD	graft versus host disease
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
HSA	humanes Serum Albumin
Hyg^R	Hygromycin B-Resistenzgen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	internal ribosome entry side
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
kb	Kilo-Basenpaar
K_D	Dissoziationskonstante
LAT	linker for activation of T cells
LB	Luria broth
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Lκ	κ Leader
LTR	long terminal repeat
MACS	magnetic activated cell sorting
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
M-MuLV	murines Moloney Leukämie Virus
mRNA/mRNS	messenger ribonucleic acid/Boten-Ribonukleinsäure
MSV	Maus Sarkoma Virus
Neo^R	Neomycin-Resistenzgen
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten
NF-κB	nukleärer Factor κ B
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
ori	origin of replication

P2A	2A-Peptid des Picornavirus
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKCΘ	Proteinkinase C- Θ
PMS	Phenazinmethosulfat
PP14	Plazentaprotein 14
POD	Peroxidase
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase and polymerase chain reaction
scFv	single chain fragment of variable region
SEM	standard error of the mean
SMAC	supra-molecular activation complex
TAE	Tris-HCl/Acetat/EDTA Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
V_{H/L}	variable region of heavy/light chain
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
#	interne Plasmidnummer

1 Einleitung

Neoplasien sind neben Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems eine der häufigsten Todesursachen weltweit mit steigender Inzidenz. Die maligne Transformation normaler Zellen zeichnet sich durch eine unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen und ein hohes Potential zur Gewebeeinfiltration und Metastasierung aus. Entsprechend der vielfältigen Mechanismen, die zur Transformation führen, wurden verschiedene Strategien zur Tumortherapie entwickelt. Zur konventionellen Krebstherapie zählen die lokalen Behandlungen wie Operation und Bestrahlung, sowie die systemischen Chemo- und Hormontherapien. Eine weitere Behandlungsmodalität ist die Interferenz mit Signalwegen durch z. B. Tyrosin-Kinase-Inhibitoren oder Angiogenese-Inhibitoren. Immunologische Ansätze umfassen monoklonale Antikörper und zelluläre Immuntherapeutika. Die Strategie der adoptiven Immuntherapie zielt darauf ab, Immunzellen so zu aktivieren oder zu modifizieren, dass sie Krebszellen spezifisch erkennen und eliminieren können. Eine besondere Realisierung dieser Therapieform, bei der Patienten T-Zellen mit Hilfe chimärer Antigen-Rezeptoren modifiziert werden, ist kürzlich mit dem Paul Ehrlich- und Ludwig Darmstaedter-Preis an Carl June (Universität Pennsylvania) ausgezeichnet worden.

1.1 Adoptive Immuntherapie

Das Ziel der adoptiven Immuntherapie ist es, eine spezifische zelluläre Immunantwort gegen Tumore zu induzieren. Die spezifische T-Zell Aktivierung geht einher mit der Freisetzung zytolytischer Granula, Chemokine und proinflammatorischer Zytokine (z. B. IFN- γ , IL-2) sowie einer T-Zell Amplifikation. Dies führt zu einer Antigen-spezifischen Zytolyse der Tumorzellen, die über den TRAIL/FasL Signalweg und die Aufnahme von Perforin und Granzyme B eingeleitet wird (Trapani und Smyth, 2002). Die Chemokine locken weitere Immunzellen, auch die des angeborenen Immunsystems, an. Des Weiteren unterstützen die sezernierten proinflammatorischen Zytokine die T-Zell Antwort. Hierbei ist die Freisetzung von IFN- γ neben der Aktivierung der T-Zelle zur Eliminierung des Tumorstromas notwendig (Textor et al., 2014).

Die adoptive Immuntherapie mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) verwendet ex vivo expandierte Immunzellen aus Tumorkläsionen. Die Therapie metastasierender Melanome mit TILs zeigte in Kombination mit einer nicht-myeloablativen Lymphodepletion bei bis zu 50 % der Patienten Remissionen (Dudley et al., 2008).

Diese Therapieform ist jedoch in ihrer Anwendbarkeit beschränkt, da die Anzahl der Tumore, aus denen T-Lymphozyten erfolgreich isoliert und amplifiziert werden können, begrenzt ist.

Die Mehrzahl der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten weist Spezifität für Tumore auf. Deshalb verfolgte man das Ziel, Lymphozyten aus dem peripheren Blut durch genetische Modifikation mit Spezifität gegen ein definiertes Antigen auszustatten. Ein Ansatz ist die Modifikation von T-Zellen mit T-Zell Rezeptoren (TCR). Der rekombinante TCR besteht aus einer α - und β -Kette und erkennt das Tumor-assoziierte Peptid, das im jeweiligen MHC-Komplex präsentiert wird. Der Vorteil hierbei ist, dass der physiologische Weg der T-Zell Erkennung und Aktivierung beibehalten wird und neben Oberflächenantigenen auch prozessierte intrazelluläre Antigene als Zielstruktur erkannt werden können. Ein Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass Tumorzellen ihre MHC-Moleküle reduzieren (Garrido et al., 1993) oder die Antigene nicht mehr korrekt präsentieren (Khong und Restifo, 2002). Des Weiteren kann die Paarung einer Untereinheit des transgenen TCR mit einer des endogenen TCR zu Heterodimeren führen, die der T-Zelle eine neue, unerwünschte Spezifität mit hohem Autoreaktivitätspotential verleihen (Schumacher, 2002).

In dieser Situation wurde nach einer Verbesserung gesucht, um T-Zellen mit einer Tumorspezifität auszustatten. Dies wurde durch chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) erreicht. Der Prototyp eines solchen Rezeptors besteht extrazellulär aus einer Antigen-bindenden Domäne sowie fakultativ einer Brückendomäne, einer Transmembrandomäne und intrazellulär aus einer Signalkette (Abb. 1). Die Bindedomäne besteht aus den variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Antikörpers, die zu einem Einzelkettenfragment (scFv) fusioniert sind. Die Antikörper-basierte Bindedomäne ermöglicht eine MHC-unabhängige Erkennung des Zielantigens und kann auch gegen nicht-klassische T-Zell Antigene wie Carbohydrate gerichtet werden. Als Signaldomäne wird die aus dem TCR-Komplex entnommene $CD3\zeta$ Kette oder die aus Mastzellen stammende $Fc\epsilon R1\gamma$ Kette verwendet. Erstere enthält drei Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs), letztere ein ITAM und führt zu einer schwächeren Aktivierung der T-Zelle. Das Einfügen einer Brückendomäne zwischen scFv und Transmembrandomäne kann dem Rezeptor zusätzliche Stabilität durch die Ausbildung von Disulfidbrücken verleihen und seine Expression auf der T-Zell Oberfläche erhöhen. Außerdem erfordern einige Epitope eine Membran-distale Antigen-Bindestelle des CAR, die durch eine größere Brückendomäne erreicht werden kann (Guest et al.,

2005). Trotz Prototyp muss der modulare Aufbau für jeden CAR optimiert werden, da verschiedene Antigene unterschiedliche Anforderungen an die Bindung und Aktivierung stellen.

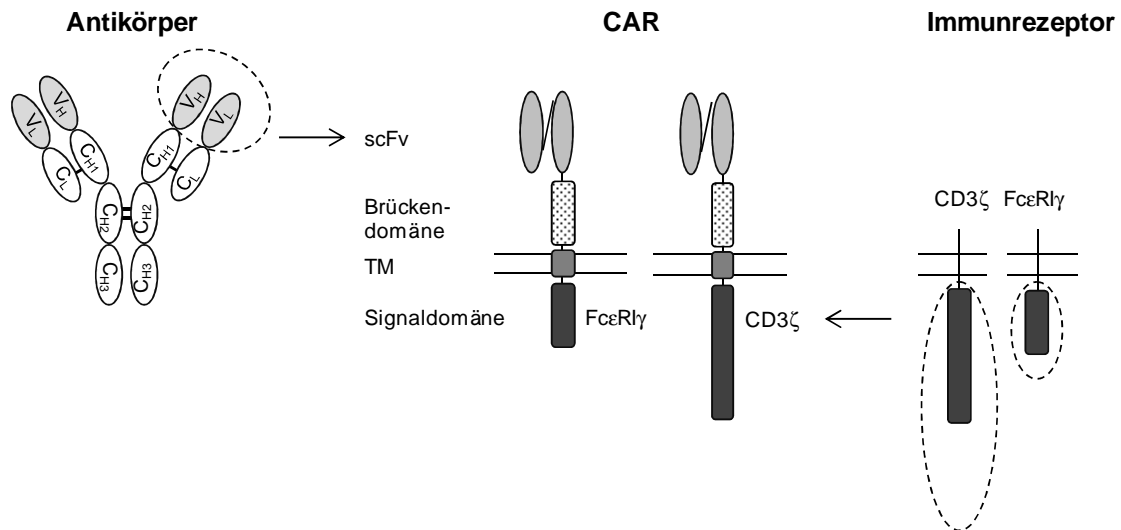


Abbildung 1: Prototyp CAR.

Der modulare Aufbau eines Prototyp CAR besteht aus einer extrazellulären Bindedomäne, fakultativ einer Brückendomäne, einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Signaldomäne. Die Einzelkettenbindedomäne (scFv) ist von einem monoklonalen Antikörper abgeleitet und besteht aus der variablen Region der schweren und der leichten Ig Kette. Die Signaldomäne stammt aus dem TCR-Komplex der T-Zellen (CD3 ζ Kette, kurz ζ) oder aus dem Fc-Epsilon-Rezeptor der Mastzellen (Fc ϵ R1 γ Kette, kurz γ).

Das Konzept der adoptiven Immuntherapie mit CAR-modifizierten T-Zellen beruht darauf, dass dem Tumorpatienten periphere Blutlymphozyten entnommen und mit einer definierten Spezifität gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen ausgestattet werden. Diese nun zielgerichteten Zellen werden amplifiziert und dem Patienten infundiert.

1.2 Der CAR weist eine geringere Komplexität auf als der TCR

Die Antigen-Erkennung erfolgt beim TCR über das im MHC-Kontext präsentierte Peptid, beim CAR MHC-unabhängig über die von einem Antikörper abgeleitete Bindedomäne. Der Hauptunterschied zwischen dem physiologischen TCR und einem CAR besteht darin, dass der TCR einen Multi-Protein Komplex darstellt, während der

CAR eine Polypeptid-Einzelkettenstruktur aufweist (Abb. 2). Dadurch sind beim CAR die Antigen-Bindung und Signalweiterleitung in einem Molekül gekoppelt, während beim TCR erst nach MHC-Peptid Bindung ein Signalkomplex aufgebaut wird. In diesem Komplex sind Primärsignal und kostimulatorisches Signal auf zwei Ketten aufgeteilt (Signale in trans). Beide Signale zusammen liefern die vollständige Aktivierung der T-Zelle. Das CD3 ζ Primärsignal resultiert in der Aktivierung der T-Zelle, angezeigt u. a. durch die Sekretion von IFN- γ und anderer proinflammatorischer Zytokine. Das kostimulatorische zweite Signal ist für die Proliferation und das Überleben der T-Zelle wichtig. Die Kostimulation wird durch den CD28 Rezeptor vermittelt, der an die B7 Moleküle der Antigen-präsentierenden Zellen bindet. Dieses zweite Signal ist Antigen-unabhängig und wird nach Antigen-Bindung in den TCR rekrutiert.

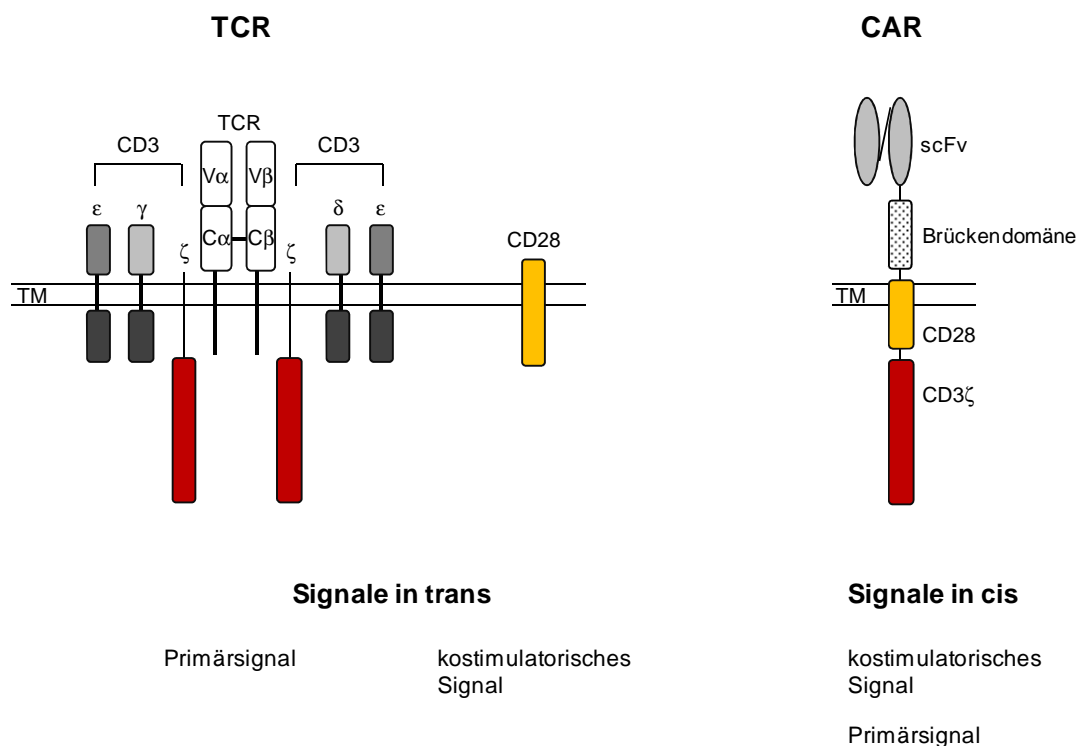


Abbildung 2: TCR versus CAR.

Der T-Zell Rezeptor (TCR) ist ein Multi-Protein Komplex. Der mit dem Peptid beladene MHC-Komplex wird von der extrazellulären Bindedomäne der α - und β -Kette des TCR gebunden. Der CD3 Signalkomplex und der kostimulatorische CD28 Rezeptor weisen eine räumliche Kompartimentierung auf. Für die vollständige T-Zell Aktivierung komplementieren die CD3 ζ und CD28 Signale in trans. CARs weisen eine Einzelkettenstruktur auf. Das Primärsignal CD3 ζ und die kostimulatorische CD28 Signaldomäne sind in einer Kette fusioniert (Signale in cis).

CARs der ersten Generation weisen nur das Primärsignal auf. T-Zellen mit diesen CARs zeigten wegen fehlender Kostimulation eine geringe Persistenz oder wurden anerg (Brocker und Karjalainen, 1995). Diese unvollständige Aktivierung führte dazu, dass T-Zellen mit diesen CARs kaum klinischen Erfolg zeigten, beispielsweise bei der Therapie von Lymphom (Till et al., 2008), Neuroblastom (Pule et al., 2008) oder Ovarialkarzinom (Kershaw et al., 2006). Die Weiterentwicklung führte zu den CARs der zweiten Generation (Finney et al., 1998; Dotti et al., 2014). Bei diesem CAR Aufbau ist zusätzlich zu dem Primärsignal eine kostimulatorische Domäne in dieselbe Signalkette integriert (Signale in cis). Diese zusätzliche Signaldomäne führt zu einer verbesserten Expansion, Überleben und Aktivität der CAR T-Zelle und schützt die CAR T-Zelle vor dem „activation-induced cell death“ (AICD) (Hombach und Abken, 2007). Neben der CD28 Domäne werden auch OX40 (Pulè et al., 2005), 4-1BB (Imai et al., 2004) oder CD27 (Song et al., 2012) als Kostimulatoren eingesetzt. Eine weitere Steigerung der T-Zell Aktivierung wird mit CARs der dritten Generation erreicht, die zwei kostimulatorische Domänen zusätzlich zu dem Primärsignal in einer Kette vereinen (Sadelain et al., 2013; Chmielewski et al., 2013). Bei dem physiologischen TCR Aufbau sind alle Kostimuli auf separaten Signalketten lokalisiert (Signale in trans).

Durch die zusätzlichen Kostimulatoren wird die CAR-vermittelte T-Zell Antwort moduliert. Hierbei führen alle Kostimuli zu einer Erhöhung der IFN- γ Sekretion, jedoch nur die CD28 Kostimulation zu einer IL-2 Sekretion und somit zu einer veränderten Qualität der Immunantwort (Hombach und Abken, 2007).

1.3 Immunologische Synapse

Der Mechanismus, der der CAR-vermittelten T-Zell Aktivierung zugrunde liegt, ist noch nicht im Detail bekannt. Es wird angenommen, dass dieser dem des TCR ähnelt. In diesem Zusammenhang ist die Ausbildung einer immunologischen Synapse auf der Oberfläche der T-Zelle ein wesentlicher Schritt. Das Wort „Synapse“ beschreibt hierbei die Kontaktstelle zwischen zwei Zellen. Beim TCR stellt sie die Kontaktstelle zwischen T-Zelle und MHC der Antigen-präsentierenden Zelle oder anderer Zielzellen dar. Bei CAR-modifizierten T-Zellen beschreibt die Synapse die Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen auf der Zielzelle.

Die Synapse organisiert sich nach TCR Aktivierung räumlich in drei Bereiche, den zentralen, peripheren und distalen „supra-molecular activation complex“ (SMAC)

(Monks et al., 1998; Dustin und Shaw, 1999). Ein favorisiertes Modell schlägt die Einteilung des zentralen Bereiches „central SMAC“ (cSMAC), der reich an TCR und CD28 Molekülen ist, in zwei Bereiche vor (Yokosuka und Saito, 2009). Im inneren Bereich des cSMAC ist CD3, der Primärsignalgeber des TCR, lokalisiert. In diesem Bereich befinden sich keine Signaltransduktionsmoleküle mehr und es wird vermutet, dass dort die Internalisierung und Degradation der TCR Ketten stattfindet. Im äußeren Bereich des cSMAC ist CD3 in geringer Dichte vorhanden, allerdings sind dort viele CD28 Moleküle lokalisiert. Diese rekrutieren die Proteinkinase C- θ (PKC θ) und tragen zur Persistenz der T-Zell Aktivierung bei. Dieses „TCR-CD28 microcluster“ Modell postuliert, dass der cSMAC Bereich einer Dynamik unterliegt und dadurch die T-Zell Antwort regulieren kann. Je schwächer die TCR Stimulation, desto größer wird der kostimulatorische CD28 Bereich, der das TCR Signal durch Erhöhung der IL-2 Produktion verstärkt, so dass die Schwelle zur T-Zell Aktivierung überschritten wird.

Der cSMAC ist umgeben von dem „peripheral SMAC“, der den mittleren Ring bildet und durch Integrine geformt wird. In dem äußersten Ring „distal SMAC“ sind große Proteine wie die Phosphatase CD45 lokalisiert (Huppa und Davis, 2003). Die TCR Aktivierung und Ausbildung der Signal-Synapse führen zur Exklusion der Phosphatase CD45. Dieses geht einher mit der Kontraktion der Synapse aufgrund der TCR-MHC-Peptid Bindung, weshalb große Moleküle aus dem zentralen, kontrahierten Teil der Synapse verdrängt werden. Das Verdrängen der Phosphatasen stellt einen zentralen Schritt der Signalinitiierung dar, da dadurch die Kinaseaktivität gefördert und die Phosphorylierung der ITAMs gewährleistet wird (Shaw und Dustin, 1997). In diesem Modell ist ein effizientes Verdrängen von CD45 aus dem Zentralbereich eine wichtige Voraussetzung für die T-Zell Aktivierung. Die Exklusion ist umso effizienter, je stabiler die Synapsenformation ist. Diese Kontaktstelle könnte bei der Verwendung von CAR T-Zellen durch die Expression eines zweiten CAR verbessert werden, so dass große inhibitorische Moleküle wie die CD45 Phosphatase effizient verdrängt werden.

1.4 Die CAR T-Zell Therapie ist effektiv gegen Tumore, induziert aber Autoreaktivität

Die CAR T-Zell Therapie wurde bisher erfolgreich bei der Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen eingesetzt. Ein Vorteil besteht hierbei in der Verwendung autologer CAR T-Zellen, so dass die „graft versus host disease“ (GvHD), die bei der allogenen Stammzelltransplantation häufig auftritt, vermieden wird. Der

Einsatz von T-Zellen mit anti-CD19 CAR zeigte in der Therapie leukämischer Erkrankungen vielversprechende Erfolge (Kochenderfer und Rosenberg, 2013; Ramos et al., 2014). Dies wurde vor allem bei der Behandlung chronisch lymphatischer Leukämien (CLL) deutlich (Brentjens et al., 2011; Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011; Kochenderfer et al., 2012; Kochenderfer et al., 2015). Hier führte die CAR T-Zell Therapie bei 12 von 23 Patienten zu Remissionen, wobei 6 Patienten bis heute andauernde Remissionen zeigen. Ebenso führte die Therapie mit anti-CD19 CAR T-Zellen bei rezidierten kindlichen und adulten akuten lymphatischen Leukämien (ALL) bei 27 von 30 Patienten zu Remissionen (Brentjens et al., 2013; Grupp et al., 2013; Davila et al., 2014; Maude et al., 2014; Lee et al., 2015). Von diesen Patienten hatten 6 einen Rückfall, 19 Patienten sind bis zum heutigen Zeitpunkt in Remission.

Allerdings musste eine „on-target, off-tumor“ Toxizität in Form einer B-Zellaplasie in Kauf genommen werden, die allerdings eine klinisch beherrschbare und zu erwartende Nebenwirkung darstellte. Die Therapie solider Tumore mit CAR T-Zellen stellt dagegen eine größere Herausforderung dar, da die meisten Zielantigene auch auf lebenswichtigen gesunden Zellen exprimiert werden und damit das Risiko einer „on-target, off-tumor“ Toxizität besteht. CAR T-Zellen mit Spezifität gegen die Carboanhydrase IX (CAIX) zur Therapie des Nierenzellkarzinoms führten zu einer Lebertoxizität, da CAIX auch auf dem gesunden Gallengangsepithel exprimiert wird (Lamers et al., 2006). Diese Toxizität konnte durch hohe Cortisolgaben beherrscht werden. Die Therapie mit T-Zellen, die mit einem anti-ErbB2-CD28-4-1BB-CD3 ζ CAR ausgestattet waren, führte zum Tod eines Patienten mit metastasierendem Kolonkarzinom (Morgan et al., 2010). Es wird vermutet, dass die CAR T-Zellen ihr respektives Antigen ErbB2 auf den Epithelzellen der Lunge erkannt haben, auch wenn dieses dort in geringer Menge exprimiert wird. Die systemische Toxizität wurde vermutlich zusätzlich dadurch verstärkt, dass ein CAR der dritten Generation mit hoher kostimulatorischer Signalstärke und eine hohe CAR T-Zell Dosis eingesetzt wurden.

Derzeit sind einige Studien mit CAR T-Zellen initiiert, die beispielsweise die Tumor-assoziierten Antigene ErbB2 (NCT00902044) beim Sarkom, EGFR-III (NCT01454596) beim Gliom, CEA (NCT01723306) beim Adenokarzinom oder GD2 (NCT01822652) beim Neuroblastom als Zielstruktur verwenden. Bei diesen Studien ist ebenfalls mit erheblichen Nebenwirkungen gegen gesundes Gewebe mit physiologischer Expression des Antigens zu rechnen.

Auch wenn die Therapie mit CAR T-Zellen sehr Erfolg versprechend ist, so zeigte sich in allen Studien trotz Spezifität der Antigen-Erkennung eine mangelnde Selektivität für

Tumorzellen. Diese Situation erfordert die Entwicklung von Strategien, die bei Auftreten von Autoreaktivität die applizierten CAR T-Zellen eliminieren oder die Selektivität für Tumorzellen erhöhen.

1.5 Strategien zur Reduktion der Autoreaktivität

Ein Strategieansatz zur Eliminierung autoreaktiver CAR T-Zellen ist die Koexpression von „suicide genes“, wie beispielsweise der induzierbaren Caspase 9 (iCasp9), die die Apoptose induzieren (Di Stasi et al., 2011). Die Aktivierung dieser Caspase wird durch Gabe eines Dimerizers erreicht und führt zum Absterben von mehr als 90 % der iCasp9-tragenden Zellen. Der Einsatz dieses „safety switch“ wird derzeit in Phase I Studien mit anti-GD2 CAR T-Zellen beim Neuroblastom (NCT01822652) oder Sarkom (NCT01953900) getestet. Eine weitere Strategie stellt die Elimination der Zellen durch depletierende Antikörper dar. Ein Beispiel hierfür ist das Fusionsprotein CD34-CD20 (RQR8), das auf der Oberfläche modifizierter CAR T-Zellen koexprimiert wird (Philip et al., 2014). RQR8 ermöglicht bei auftretender Toxizität die Depletion RQR8-exprimierender Zellen durch den anti-CD20 Antikörper Rituximab. Dasselbe Molekül kann über CD34 zur Anreicherung der modifizierten T-Zellen genutzt werden.

Des Weiteren kann durch eine transiente CAR Expression das Nebenwirkungspotential erheblich reduziert werden (Zhao et al., 2010). Die transiente CAR Expression wird dadurch erzielt, dass anstelle des retroviralen Gentransfers die Elektroporation der T-Zelle mit mRNA verwendet wird. Allerdings ist die Expression des CAR auf der T-Zell Oberfläche begrenzt, u. a. durch die Halbwertszeit der mRNA, die Ausdünnung der mRNA bei der Zellteilung und durch die Internalisierung des CAR nach Aktivierung. Deshalb erfordert diese Therapie repetitive Infusionen der CAR T-Zellen. Außerdem werden aufgrund der transienten CAR Expression keine CAR T-Gedächtniszellen ausgebildet, die für die Rezidivprophylaxe nötig sind. In klinischer Anwendung ermöglicht dieser mRNA Transfer bei erster Gabe das Erstellen eines Sicherheitsprofils der neuen Bindedomäne oder des neuen CAR Formates.

Ein alternativer Ansatz ist es, die Selektivität für Tumorzellen zu erhöhen, um die Autoreaktivität zu reduzieren oder sogar zu verhindern. Eine favorisierte Strategie hierbei ist die kombinatorische Antigen-Erkennung durch zwei koexprimierte CARs. Hierzu werden das Primärsignal und das kostimulatorische Signal, die zur vollständigen T-Zell Aktivierung notwendig sind, auf zwei CARs unterschiedlicher Spezifitäten aufgeteilt (Abb. 3). Die CAR T-Zellen richten sich gegen Tumorzellen mit

Expression beider Antigene, während gesunde Zellen, die ein Antigen in geringer Dichte exprimieren, weniger geschädigt werden. Der CAR mit Primärsignal wird durch die Expression des respektiven Antigens auf Normalgewebe aktiviert, jedoch mit geringerer Effizienz, da das kostimulatorische Signal fehlt. Gesunde Zellen, gegen deren Antigen sich der kostimulatorische, zweite CAR richtet, bleiben dagegen verschont, da die Kostimulation allein zu keiner T-Zell Aktivierung führt. Bei T-Zellen mit beiden CARs komplementieren diese in der Signalgebung bei Bindung beider Antigene auf Tumorzellen, induzieren eine vollständige T-Zell Aktivierung und bewirken eine IFN- γ und IL-2 Sekretion. Dies führt zu einer gesteigerten Proliferation der T-Zelle im Vergleich zu der Bindung nur eines der Antigene. Dadurch wird es ermöglicht, dass CAR T-Zellen bevorzugt in der Tumorumgebung proliferieren, überleben und ihre Effektorfunktionen ausüben. Doch zeigen sich auch hier Einschränkungen. Es bleibt das Risiko bestehen, dass die CAR T-Zellen bei alleiniger Stimulation des Primärsignalgebers durch die Expression des respektiven Antigens auf gesundem Gewebe aktiviert werden und so eine Autoreaktivität verursachen.

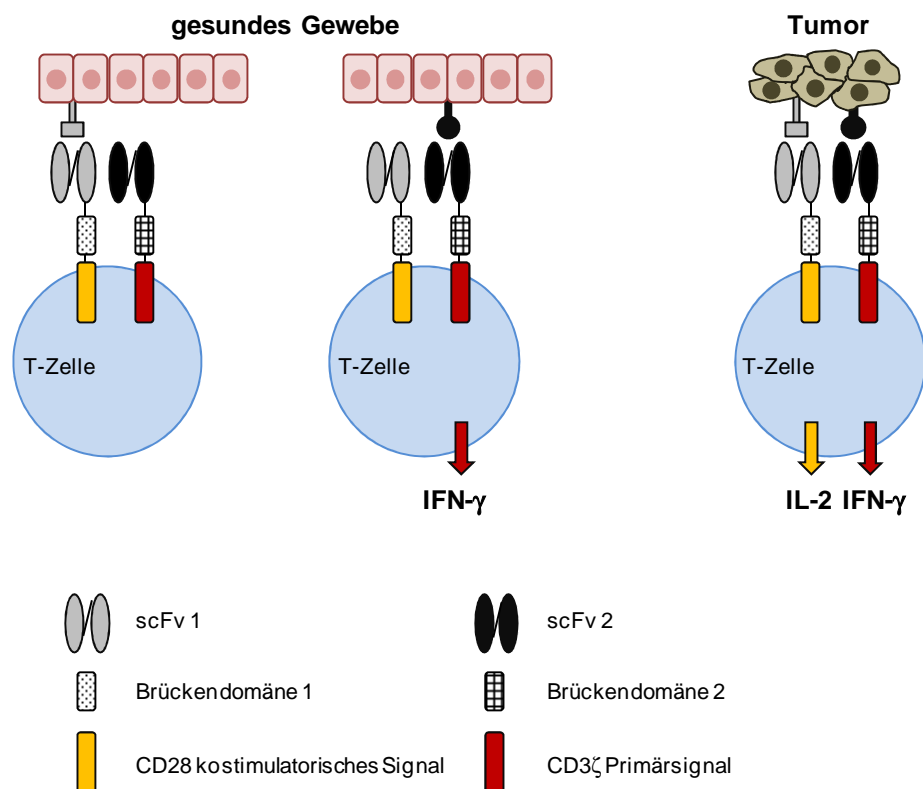


Abbildung 3: Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung.

Bei der Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung sind das Primärsignal und das kostimulatorische Signal auf zwei koexprimierte CARs unterschiedlicher Spezifitäten aufgeteilt.

Bei Bindung des respektiven Antigens durch den CD28 kostimulatorischen Rezeptor erfolgt keine T-Zell Aktivierung. Die Erkennung des Antigens durch den Rezeptor mit CD3 ζ Primärsignal resultiert in der T-Zell Aktivierung und induziert die IFN- γ Sekretion. Die Bindung beider respektiver Antigene durch die zwei CARs führt zur vollständigen T-Zell Aktivierung und zur Sekretion von IFN- γ und IL-2. Die Strategie kann zur selektiven Eliminierung von Tumorzellen mit zwei Antigenen im Vergleich zu gesunden Zellen mit nur einem Antigen genutzt werden.

Die Umsetzbarkeit dieses Konzepts wurde in verschiedenen präklinischen Modellen untersucht. Eine wichtige Voraussetzung war, dass der CAR mit CD28 Domäne eine stabile Expression aufweist und nach Antigen-Kontakt das kostimulatorische Signal liefert. Frühere Untersuchungen bestätigten, dass die Koexpression eines CD28 CAR und CD3 ζ CAR in Jurkat Zellen technisch möglich ist und die Komplementation der Signale nach Antigen-Kontakt eine IL-2 Sekretion induziert (Alvarez-Vallina und Hawkins, 1996).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die kombinatorische Antigen-Erkennung durch das Trennen des CD3 ζ und CD28 Signals in vitro eine ähnliche Aktivierung bei Bindung beider respektiver Antigene bewirkte wie der CAR mit kombiniertem CD28-CD3 ζ Signal (Lanitis et al., 2013). Das zusätzliche CD28 Signal schützte sowohl in trans (getrennte Signale) als auch in cis (kombinierte Signale) vor dem „activation-induced cell death“ (AICD). T-Zellen mit zwei CARs und getrennten Signalen akkumulierten in vivo bevorzugt an Tumoren mit der Expression beider Antigene im Vergleich zu Tumoren mit der Expression nur eines der Antigene. Diese Selektivität wiesen CAR T-Zellen mit einer Antigen-Spezifität und kombiniertem CD28-CD3 ζ Signal nicht auf. Die anti-Tumor Aktivierung erfolgte sowohl bei CAR T-Zellen mit getrennten Signalen als auch mit kombinierter Signalkette. Hierbei zeigten CAR T-Zellen mit Signalen in trans gegenüber Tumoren mit nur einem Antigen eine geringere in vivo Aktivität als CAR T-Zellen mit den jeweiligen Signalen in cis, wohingegen die Aktivität gegen Tumore mit beiden Antigenen gleich war. Allerdings bleibt eine „on-target, off-tumor“ Toxizität durch CAR T-Zellen bestehen, da bei Stimulation des Primärsignalgebers durch Bindung an das respektive Antigen eine hinreichende T-Zell Aktivierung induziert wird. Diese ist durch die fehlende Kostimulation geringer als bei Erkennung beider Antigene und komplementierendem CD28 Signal. Die Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung durch zwei CARs mit komplementierenden Signalketten ist im Hinblick auf die Selektivität für Zielzellen dem konventionellen CAR mit kombiniertem CD28-CD3 ζ Signal überlegen.

Ein alternativer Ansatz war, die kombinatorische Antigen-Erkennung durch eine veränderte Affinität der Bindung zu verbessern, um die Selektivität für Tumorzellen zu erhöhen. Diese Situation wurde mit CARs gegen die Prostata-assoziierten Tumorantigene „prostate-specific membrane antigen“ (PSMA) und „prostate stem cell antigen“ (PSCA) untersucht (Kloss et al., 2013). Es wurde eine Bindedomäne mit so geringer Affinität verwendet, dass das Primärsignal dieses CAR keine hinreichende T-Zell Aktivierung vermittelt. Die T-Zell Aktivierung wurde nur bei zusätzlicher Stimulation des weiteren CAR mit kostimulatorischer Domäne durch Erkennung des zweiten Antigens erreicht. Hierdurch wurde in dem Mausmodell eine Selektivität für Tumorzellen mit Expression beider Antigene erreicht, während Zellen mit einem Antigen verschont blieben. Dies stellt insofern eine Verbesserung des Konzepts dar, als dadurch die Toxizität gegenüber Zellen mit der Expression eines der Tumor-assoziierten Antigene erheblich vermindert wird. Allerdings wurde das Konzept bisher ausschließlich anhand modifizierter Tumorzellen getestet und keine Zellen aus Normalgewebe verwendet. Die Aussagekraft dieser Untersuchungen ist daher für eine klinische Anwendung begrenzt.

Die Regulation durch die Affinität der Bindedomäne ist limitiert, da nicht für jedes Antigen verschieden affine Bindedomänen zur Verfügung stehen und die Affinität nicht unbegrenzt herabgesetzt werden kann, ohne Spezifität zu verlieren. Eine weitere Einschränkung dieses Ansatzes besteht in der erheblichen Variabilität der Antigen-Dichte in dem jeweiligen Tumor, bei den individuellen Patienten und bei verschiedenen Tumorentitäten. In Kombination dieser Parameter besteht daher die Schwierigkeit, einen Prototyp CAR bereitzustellen, der für die meisten Patienten einsetzbar ist und der eine suboptimale Aktivierung bei dem gegebenen Tumor erzielt (Hanada und Restifo, 2013).

Das Konzept der kombinatorischen Antigen-Erkennung könnte dadurch verbessert werden, dass Stellgrößen ausfindig gemacht werden, die die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung beeinflussen.

1.6 Zielsetzung

Anhand eines empirischen Beispiels wurde die selektive Erkennung der Tumorzellen durch eine komplementierende T-Zell Aktivierung durch zwei CARs gezeigt (Kloss et al., 2013). Die funktionalen Anforderungen, um die Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung für die breite Anwendung in der Tumorthherapie zugänglich zu machen, sind bisher nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es daher zu definieren, wie die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung durch Trennung des Primärsignals und des kostimulatorischen CD28 Signals auf zwei CAR Ketten beeinflusst wird (Abb. 4).

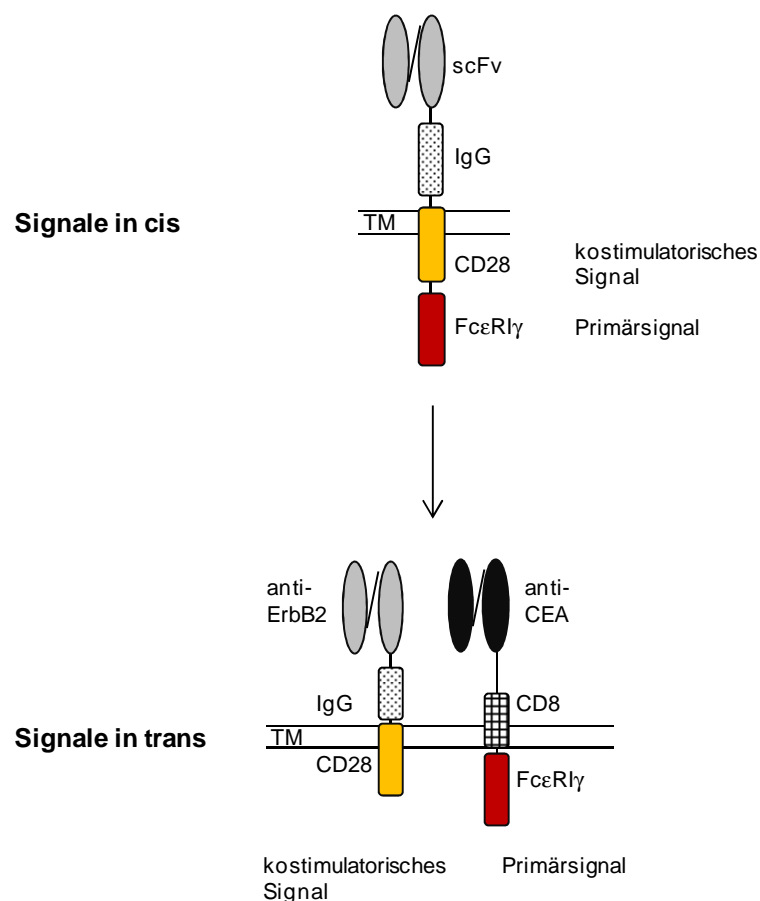


Abbildung 4: Konzept.

CARs der zweiten Generation weisen beide Signaldomänen fusioniert in einer Kette auf. Im Gegensatz dazu sind in dem hier verwendeten Modell das FcεR1γ Primärsignal und das kostimulatorische CD28 Signal auf zwei koexprimierte CARs aufgeteilt. Durch die räumliche Kompartimentierung der Signale nähert man sich der Anordnung im physiologischen TCR an. Die koexprimierten CARs weisen verschiedene Bindedomänen auf. Der kostimulatorische CAR ist gegen ErbB2 gerichtet, enthält die IgG₁-Fc Brückendomäne und die CD28 Signaldomäne.

Der FcεR1γ Primärsignalgeber erkennt CEA und enthält die CD8 Brückendomäne und γ Signaldomäne. In einer besonderen Ausführungsform wurde dieser CAR ohne CD8 Brückendomäne verwendet.

Die Organisation der TCR Signalgebung ist komplexer als die der CAR Signalgebung. Insbesondere erfolgt durch die räumlich getrennte Kostimulation eine Feinregulation des TCR Signals. Die Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung wurde in dieser Arbeit dahingehend angewendet, dass man sich durch die Kompartimentierung des Primärsignals und der Kostimulation auf zwei CARs unterschiedlicher Spezifitäten dem physiologischen Aufbau des TCR annähert.

Es wurde untersucht, welche Antigen-abhängigen Aktivierungsschwellen T-Zellen mit zwei CARs aufweisen und wie sich diese verändern lassen. Wir legten die Vermutung zugrunde, dass durch die Annäherung an den physiologischen TCR Aufbau, bei dem das Primärsignal und das kostimulatorische Signal ebenfalls getrennt vorliegen, Einfluss auf die Aktivierungsschwelle genommen werden kann. Es ist unbeantwortet, ob bei T-Zellen mit zwei CARs durch eine Kostimulation in trans die Aktivierungsschwelle verändert wird, wie es beim TCR erfolgt (Viola und Lanzavecchia, 1996). Dadurch könnte die Selektivität in der Erkennung von Tumorzellen mit Expression zweier Antigene gesteigert werden.

Die Effektorfunktionen nach Stimulation des physiologischen TCR Komplexes weisen eine hierarchische Anordnung auf (Itoh und Germain, 1997). Dieses wird dadurch deutlich, dass die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle zur IL-2 Sekretion beim TCR eine höhere Antigen-Dichte erfordert als die Aktivierungsschwelle zur IFN-γ Sekretion. Es ist unklar, ob bei der Strategie der zwei CARs diese hierarchische Anordnung der Effektorfunktionen erhalten bleibt. Dieses ist von besonderem Interesse, da dadurch die Qualität der Immunantwort verändert wird.

Außerdem sind die Effektorfunktionen von der Anzahl der TCR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche abhängig (Viola und Lanzavecchia, 1996). Der modulare Aufbau des CAR beeinflusst die Anzahl der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche. Daher sollte untersucht werden, ob bei CARs verschiedenen modularen Aufbaus und dadurch unterschiedlicher Anzahl der CAR Moleküle eine Modulation des Primärsignals und infolgedessen eine Verschiebung der Aktivierungsschwelle erfolgt.

In dem von uns verwendeten Modell wurden als Zielantigene CEA und ErbB2 gewählt. Beide Antigene werden bei zahlreichen Adenokarzinomen, wie z. B. dem Kolonkarzinom, koexprimiert. Es wurde die T-Zell Aktivierung durch zwei komplementierende CARs mit CEA Spezifität und Primärsignal sowie ErbB2 Spezifität und CD28 Kostimulation untersucht. Die T-Zell Aktivierung durch zwei CARs mit Primärsignal und CD28 Kostimulation in trans wurde mit der T-Zell Aktivierung durch einen CAR mit Primärsignal allein oder mit Signalen in cis verglichen.

Diese Untersuchungen sollen einen optimierten Bauplan für koexprimierte CARs zur selektiven Eliminierung von Tumorzellen schaffen. Dieser Bauplan soll es ermöglichen, die Strategie der kombinatorischen Antigen-Erkennung für eine Vielzahl von Tumoren in der adoptiven T-Zell Therapie anzuwenden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, wenn nicht an entsprechender Stelle anders angegeben. Die Warenzeichen ® und TM sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

BB („blocking buffer“)

1x PBS, 1 % (w/v) BSA

BB/T

BB, 0,05 % (v/v) „Tween 20“

10x PBS

1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 1 M Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, eingestellt mit HCl auf pH 7,2 bis 7,4; vor Gebrauch wurde das 10x PBS 1:10 mit ddH₂O verdünnt und autoklaviert (im Folgenden als PBS bezeichnet)

PBS/T

1x PBS, 0,1 % (v/v) „Tween 20“

50x TAE-Puffer

2 M Tris, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA pH 8,0, eingestellt mit HCl auf pH 7,6 bis 7,8

2.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Ethidiumbromid

„Ethidium Bromide Solution“, 10 mg/ml (Bio-Rad Laboratories, München)

Gel-Beladungspuffer

„6x DNA loading dye“ #R0611 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

DNS-Größenstandards, „ready to use“

„GeneRuler 100bp DNA Ladder“, #SM0243 bzw. „GeneRuler 1kb DNA Ladder“, #SM0313 (beide Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

2.3 Medien und Medienzusätze

2.3.1 Bakterienkultur

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Das thermolabile Antibiotikum Ampicillin wurde sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium zugesetzt, sobald dieses auf ≤ 50 °C abgekühlt war.

LB-Medium

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl

LB-Agar

1 l LB-Medium, 15 g Bacto-Agar

Ampicillin

Stammlösung 100 mg/ml Ampicillin in ddH₂O, 100–200 µg/ml in LB-Medium oder LB-Agar zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme eingesetzt

IPTG

Stammlösung 0,1 M IPTG (Bio-Rad Laboratories, München) in ddH₂O, 50 µl pro 10 cm LB-Agar-Kulturplatte zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzt

X-Gal

Stammlösung 40 mg/ml X-Gal (Bio-Rad Laboratories, München) in DMF, 50 µl pro 10 cm LB-Agar-Kulturplatte zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzt

2.3.2 Zellkultur

DMEM Medium

„Dullbecco`s Modified Eagle Medium“, Produkt Code 61965-026 (Gibco/Life Technologies, Darmstadt), „High Glucose“ Formulierung ohne HEPES Puffer, mit „GlutaMAX“ und Phenolrot

RPMI 1640 Medium

„Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium“, Produkt Code 61870-010 (Gibco/Life Technologies, Darmstadt), Formulierung ohne HEPES Puffer, mit „GlutaMAX“ und Phenolrot

Ciprofloxacin

Stammlösung 2 mg/ml (Fresenius Kabi, Bad Homburg), 10 µg/ml im Kulturmedium zur Mykoplasmenprophylaxe eingesetzt

Fetal Bovine Serum (FBS)

„Sera Plus FBS“ (PAN Biotech, Aidenbach), 1:10 dem Kulturmedium zugesetzt

HEPES

1 M „Hepes Buffer Solution“ (Gibco/Life Technologies, Darmstadt), 10 mM dem Kulturmedium zugesetzt

Hygromycin

„HygroGold“ Stammlösung 100 mg/ml (InvivoGen, Toulouse, F), 50–200 µg/ml im Kulturmedium zur Selektion Hygromycin-resistenter Zellen eingesetzt

Interleukin 2 (IL-2)

Stammlösung 18×10^6 IU/ml IL-2 aus „Proleukin S“ (Novartis Pharma, Nürnberg) in ddH₂O, 20–1.000 IU/ml im Kulturmedium zur Aktivierung von PBL eingesetzt

Minocyclin

Stammlösung 10 mg/ml Minocyclin Hydrochlorid in PBS, 10 µg/ml im Kulturmedium zur Mykoplasmeneliminierung eingesetzt

Neomycin (G418)

Stammlösung 100 mg/ml G418 in ddH₂O, 0,4–2 mg/ml im Kulturmedium zur Selektion Neomycin-resistenter Zellen eingesetzt

Penicillin-Streptomycin („PenStrep“)

10.000 U/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach), 1:100 dem Kulturmedium zugesetzt

Tiamulin

Stammlösung 10 mg/ml Tiamulin Fumarat in PBS, 10 µg/ml im Kulturmedium zur Mykoplasmeneliminierung eingesetzt

Trypsin-Lösung

10 % (v/v) „Trypsin-EDTA Solution 10x“ (PAN Biotech, Aidenbach), 1:10 sterilem PBS zugesetzt

2.4 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde folgender E.coli DH5 α -Stamm (Woodcock et al., 1989) verwendet:

Genotyp: F-, end A1, hsd R17 (r κ -, m κ -), sup E44, thi-1, lambda-, rec A1, gyr A96, Φ 80 d lacZ δ M15

2.5 Primäre Zellen und Zelllinien

2.5.1 Primäre Zellen

Humane periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden mittels Dichtezentrifugation (siehe 3.11.6) aus „buffy coats“ (Leukozytenkonzentraten) isoliert. Die „buffy coats“ stammen von gesunden Spendern und wurden von der Blutbank der Uniklinik Köln (Genehmigung der Ethikkommission: 01-090) bereitgestellt. Die Leukozytenkonzentrate fallen als Nebenprodukt bei der Fraktionierung einer Blutspende zu Erythrozytenkonzentraten und Plasmaprodukten an.

2.5.2 Humane Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz/Hersteller
HEK 293T	Derivat der Nierenkarzinom-Zelllinie 293, exprimiert das SV40 large T-Antigen	(Pear et al., 1993) „CRL-11268“, ATCC
HEK 293T #1192	Derivat von HEK 293T, sezerniert das Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP	(Riët, 2010)

LS174T	kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie CEA ⁺ ErbB2 ⁺	„CL-188“, ATCC
---------------	---	----------------

ATCC, Manassas, VA, USA

2.5.3 Maus Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz/Hersteller
MC38	Methylcholanthrene induzierte kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie, Mausstamm: C57BL/6	(Lafreniere und Rosenberg, 1986)
MC38.B2.III.C1	Derivat von MC38, exprimiert humanes ErbB2	(Riët, 2010)
MC38 #841	Derivat von MC38, exprimiert humanes CD30	Heike Brand
C15A3	Derivat von MC38, exprimiert humanes CEA	(Robbins et al., 1991)
C15A3.C2R.A7	Derivat von C15A3, exprimiert humanes CEA und ErbB2	(Riët, 2010)
OKT3	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG _{2a} Antikörper OKT3 mit Spezifität für humanes CD3	(Kung et al., 1979); „CRL-8001“, ATCC
15E8	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper 15E8 mit Spezifität für humanes CD28	(Van Lier et al., 1988)

HRS3	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper HRS3 mit Spezifität für humanes CD30	(Hombach et al., 1998)
9G10	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper 9G10 mit Spezifität für die Bindedomäne des CD30 spezifischen Antikörpers HRS3	(Pohl et al., 1992)
BW431/26	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper BW431/26 mit Spezifität für CEA	(Bosslet et al., 1985)
BW2064/36	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper BW2064/36 mit Spezifität für die Bindedomäne des CEA spezifischen Antikörpers BW431/26	(Kaulen et al., 1993)
BW2064/399	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert den monoklonalen Maus IgG ₁ Antikörper BW2064/399 mit Spezifität für die Bindedomäne des CEA spezifischen Antikörpers BW431/26	(Kaulen et al., 1993)

ATCC, Manassas, VA, USA

2.6 Restriktions-Endonukleasen und Puffer

Nachfolgende Restriktionsenzyme (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden zu analytischen und präparativen Zwecken eingesetzt:

BamHI, BglII, EcoRI, NcoI, NotI, Sall, XhoI

Die folgenden Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden für die Restriktionsanalysen verwendet:

Puffer B (10x): 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol; pH 8,0

Puffer H (10x): 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl, 10 mM Dithioerythritol; pH 7,5

2.7 Oligonukleotide

(Eurofins Genomics, Ebersberg)

2.7.1 Klonierungsprimer

Die Klonierungen mit den entsprechenden Oligonukleotiden sind in 4.1 beschrieben.

Nr.*	Primer	Primersequenz (5'-3')
527	NotI-L _K -S	ACGTAGCGGCCGCCATGGATTTTCAGGTGCAGAT TT
614	EcoRI-CD28-AS	TCAGCTAGAATTCGATCAGGAGCGATAGGCTGCG AA
1202	NotI-L _K trunkiert-S	ACGTAGCGGCCGCCATGGAT
1203	CD28-EcoRI-AS	CAGTCGAATTCTCAGGAGCGATAGGCTGCGAAGT CGCGTGG
1204	P2A-L _K -S	AACTTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGG AAGAAAACCCCGGTCCCATGGATTTTCAGGTGCA GATTTTCAGCTTC
1205	gamma-P2A-AS	TTCCACGTCTCCTGCTTGTCTTAAACAGAGAGAAG TTCGTGGCGCCGCTTCCCTGTGGTGGTTTCTCAT GCTTCAGAGTCTC

1206	BamHI-CD8TM-S	ATGCCGGATCCTCTGAGCAACTCCATCATGTACT TCAGC
1207	CD8TM-AS	GTGGTTGCAGTAAAGGGTGATAACCA
1208	CD8TM-gamma-S	CTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAACCA CCGACTGAAGATCCAAGTGCGAAAG
1209	gamma-XhoI-AS	AGCCTCTCGAGCTACTGTGGTGGTTTCTCAT
1210	CD8TM-gamma-AS	GGTTATAGCTGCCTTTCGCACTTGGATCTTCAGT CGGTGGTTGCAGTAAAGGGTGATAACCA

* interne Labornummer

2.7.2 Sequenzierungsprimer

Nr.*	Primer	Primersequenz (5'-3')
51	bullet_5	TTACACAGTCCTGCTGACCA
52	bullet_3neu	CTATAGGCTTCAGCTGGTGA
76	SeqFc-AS	CGGTCCCCCAGGAGTTCAGGTGC
77	341VLSE5	GGCGGCTCTGACATCCAGCTG
78	IgGSE5	TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
127	hIgG-Seq-5	CAACTGGTACGTGGACGGCG
128	hIgG-Seq-AS	CATTGCTCTCCCACTCCACGG
135	pBullet5`seqneu	GGACCTTACACAGTCCTGCTGACC
136	pBullet3`seqneu	CGTACTATAGGCTTCAGCTGGTGATATTG
144	SeqCDR3cerbS	CTGGAGTACATGGGGCTCATCTAT
186	M13(Forward)-20	GTAAAACGACGGCCAG

282	Seq-pMP71-cs1-S	GTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCT
285	Seq-pMP71-cs2-AS	CCCATAAAATGTAAATGATTGCCCCACC
460	M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
539	SEQ-pQCXIN-S	GTGAACCGTCAGATCGCCTGG
540	SEQ-pQCXIN-AS	TGCCAAAAGACGGCAATATGGTG
617	Seq-hlgG1-AS	CACCCGGTACGTGCTGTTGT
824	Seq-gamma-S	GTTTACACGGGCCTGAGCACC

* interne Labornummer

2.8 Vektoren

2.8.1 Retrovirale CAR Expressionsvektoren

pBullet-L κ -BW431/26scFv- γ (#519, C- γ)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26 und humaner Fc ϵ R1 γ Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ (#607, C-Fc-CD28-CD3 ζ)

(Hombach et al., 2001)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3 ζ Signaldomäne

pBullet-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD28 (#637)

(Hombach et al., 2001)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD3 ζ (#700, C-Fc-CD3 ζ)

(Hombach et al., 2000)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD3 ζ Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD3 ζ (#710, E-Fc-CD3 ζ)

(Chmielewski et al., 2004)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD3 ζ Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1195)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-L κ -CD8hinge-CD8TM- γ (#1330)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8hinge-CD8TM- γ (#1331 CAR), enthält die Expressionskassette für die humane CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie die humane Fc ϵ R1 γ Signaldomäne

pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8hinge-CD8TM- γ (#1331, C-CD8- γ)

(in dieser Arbeit generiert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie humaner Fc ϵ R1 γ Signaldomäne

pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8hinge-CD8TM-CD28- γ (#1601, C-CD8-CD28- γ)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie humaner CD28 und Fc ϵ R1 γ Signaldomäne

pQCXIH-leader-ErbB2(ec)-eGFP (#1192)

(Riët, 2010)

Rekombinantes Fusionsprotein mit extrazellulärer humaner ErbB2 Domäne und „enhanced GFP“

pQCXIN-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD28-IRES-NeoR (#1156, C-Fc-CD28)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne

pQCXIN-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213, E-Fc-CD28)

(in dieser Arbeit generiert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne

pMP71-NY-ESO1-1G4-alpha-P2A-beta-TCR (#1178)

(Engels et al., 2003)

Ausgangsplasmid zur Isolation des Vektors MP71, alpha und beta Kette des rekombinanten TCR mit Spezifität für das NY-ESO1

pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246)

(in dieser Arbeit generiert)

Bicistronische Expressionskassette, die den CAR L κ -BW431/26scFv- γ (#519 CAR) und den CAR L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR) enthält, verknüpft mit dem P2A Peptid

pMP71-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD3 ζ -p2A-L κ -BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262)

(Riët, 2010)

Bicistronische Expressionskassette, die den CAR L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD3 ζ (#710 CAR) und den CAR L κ -BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1156 CAR) enthält, verknüpft mit dem P2A Peptid

pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344)

(in dieser Arbeit generiert)

Bicistronische Expressionskassette, die den CAR L κ -BW431/26scFv-CD8hinge-CD8TM- γ (#1331 CAR) und den CAR L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR) enthält, verknüpft mit dem P2A Peptid

pSTITCH-HRS3-gamma (#417, CD30- γ)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des CD30 spezifischen Antikörpers HRS3 und humaner Fc ϵ R1 γ Transmembran- und Signaldomäne

2.8.2 pCR2.1/pCRII Klonierungsvektoren

pCR2.1-L κ -BW431/26scFv- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1245)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246), enthält die DNS für den CAR L κ -BW431/26scFv- γ (#519 CAR) und den CAR L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR) verknüpft mit der DNS für das P2A Peptid

pCR2.1-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1336)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -p2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344), enthält die DNS für den CAR L κ -BW431/26scFv-CD8- γ (#1331 CAR) und den CAR L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR) verknüpft mit der DNS für das P2A Peptid

pCRII-L κ -CD8hinge-CD8TM- γ (#1328)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8hinge-CD8TM- γ (#1331), enthält die Expressionskassette für die humane CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie die humane Fc ϵ R1 γ Signaldomäne

2.8.3 Sonstige Expressionsvektoren

pCOLT-GALV (#392)

(Weijtens et al., 1998)

Retrovirales Helferplasmid zur Expression des Hüllproteins env des Gibbon Affen Leukämie Virus (GALV)

pHIT60 (#393)

(Weijtens et al., 1998)

Retrovirales Helferplasmid zur Expression der murinen Moloney Leukämie Virus (M-MuLV) Proteine gag (Gruppenspezifische Antigene) und pol (Reverse Transkriptase Polymerase)

2.9 Antikörper und Proteine

2.9.1 Antikörper

Antikörper-spezifität	Konjugat	Spezies (Isotyp)	Klon	Hersteller
human IgG	-	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
human IL-2	-	Maus (IgG ₁ , κ)	5344.111	BD Biosciences
human IFN-γ	-	Maus (IgG ₁ , κ)	NIB42	BD Biosciences
human CD3	-	Maus (IgG _{2a})	OKT3	Hybridoma-Zelllinie
human CD28	-	Maus (IgG ₁)	15E8	Hybridoma-Zelllinie
CEA	-	Maus (IgG1)	BW431/26	Hybridoma-Zelllinie
BW431/26	-	Maus (IgG ₁)	BW2064/36	Hybridoma-Zelllinie
BW431/26	-	Maus (IgG ₁)	BW2064/399	Hybridoma-Zelllinie

human CD30	-	Maus (IgG ₁)	HRS3	Hybridoma- Zelllinie
HRS3	-	Maus (IgG ₁)	9G10	Hybridoma- Zelllinie
T-2 Mycotoxin	-	Maus (IgG ₁)	15H6	Southern Biotech
CEA	-	Maus (IgG ₁)	T84.66A3.1A.1 F2	„HB-8747“, ATCC
human IgG	APC	Maus	polyklonal	Southern Biotech
human IgG, F(ab')₂	FITC	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
human IgG, F(ab')₂	PE	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
Maus IgG₁	FITC	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
Maus IgG₁	PE	Ratte	RMG1-1	BioLegend
human CD3	APC	Maus (IgG _{2a})	BW264/56	Miltenyi Biotec
human CD3	FITC	Maus (IgG _{2a})	BW264/56	Miltenyi Biotec
human CD4	PE	Maus (IgG ₁ , κ)	MT310	DAKO
human CD8	FITC	Maus (IgG _{2a})	BW135/80	Miltenyi Biotec
human CD107a	FITC	Maus (IgG ₁ , κ)	H4A3	Miltenyi Biotec
human CD340 (ErbB2/Her-2)	PE	Maus (IgG ₁ , κ)	24D2	BioLegend
CEA	CAM-5	Maus (IgG _{2a})	487609	R&D Systems

human IL-2	Biotin	Maus (IgG ₁ , κ)	B33-2	BD Biosciences
human IFN-γ	Biotin	Maus (IgG ₁ , κ)	4S.B3	BD Biosciences
GFP	Biotin	Ziege	polyklonal	Abcam

Abcam, Cambridge, UK; ATCC, Manassas, VA, USA; BD Biosciences, Heidelberg; BioLegend, London, UK; DAKO, Hamburg; Hybridoma-Zelllinien, siehe 2.5.3; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; R&D Systems, Wiesbaden; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

2.9.2 Proteine und Fusionsproteine

Protein/Fusionsprotein	Erläuterung	Hersteller
Rekombinantes humanes IFN-γ	Stammlösung 200 ng/ml „Imukin“ Interferon-γ 1b	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, CH
Interleukin-2	Stammlösung 18 x 10 ⁶ IU/ml IL-2 aus „Proleukin S“ in ddH ₂ O	Novartis Pharma, Nürnberg
CEA	gereinigtes CEA aus Lebermetastasen eines menschlichen Karzinoms	Fitzgerald Industries International, Acton, MA, USA
ErbB2-eGFP (#1192)	Fusionsprotein aus extrazellulärer humaner ErbB2 Domäne und eGFP	HEK 293T #1192 Zellen, siehe 2.5.2

ErbB2	rekombinantes Fusionsprotein aus humanem ErbB2 und der humanen IgG ₁ -Fc-Domäne, C-terminales 6 His-tag, > 90 % Reinheit	R&D Systems, Wiesbaden
Streptavidin-POD conjugate	Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i> , bindet Biotin	Roche Diagnostics, Mannheim
Albumin from bovine serum (BSA)	lyophilisiert, ≥ 96 % Reinheit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3 Methoden

Alle Arbeiten wurden je nach Anforderung in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe S1 oder S2 durchgeführt.

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von E.coli DH5 α Bakterien

Die Kultivierung von E.coli Bakterien erfolgte in LB Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurde Ampicillin (150–200 μ g/ml) verwendet. Für die Lagerung wurden 700 μ l einer Bakterienkultur mit 300 μ l 87 % (v/v) Glycerin vermischt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.2 Herstellung chemokompetenter E.coli DH5 α Bakterien

Frisches, antibiotikafreies LB-Medium (200ml) wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur des E.coli DH5 α -Stammes inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{590nm} von 0,5 in einem Schüttler kultiviert. Die Kulturen wurden auf Eis mindestens 10 min abgekühlt und die Bakterien anschließend in einer vorgekühlten Zentrifuge 10 min bei 4 °C und 1600 x g sedimentiert. Hierfür wurden die Beschleunigungs- und Bremswerte der Zentrifuge herabgesetzt, um hohe Beschleunigungsbelastungen zu vermeiden. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 10 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach der Zugabe weiterer 10 ml CaCl₂-Puffer wurden die Bakterien 7 min bei 4 °C und 1100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Resuspension wie oben beschrieben wiederholt. Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 7 min bei 4 °C und 1100 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Sediments in 4 ml CaCl₂-Puffer wurde die Bakteriensuspension zu jeweils 100 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die erzeugte Kompetenz wurde durch Transformation mit 10 pg und 100 pg des Plasmids pUC19 (Life Technologies, Darmstadt) und anschließendes

Auszählen der Kolonien bestimmt. Die Kompetenz lag zwischen 10^6 und 10^7 cfu/ μ g DNS (colony-forming units pro μ g DNS).

CaCl₂-Puffer: 60 mM CaCl₂-Dihydrat, 10 mM PIPES, 15 % (w/v) Glycerin; der Puffer wurde vor der Zugabe von Glycerin mit 3 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

3.1.3 Transformation kompetenter E.coli DH5 α

(Hanahan, 1983)

Kompetente Bakterien (100 μ l) wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 bis 10 μ l des Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt für 90 s bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zugabe von 600 μ l antibiotikafreiem LB-Medium wurde der Ansatz zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz 60 min bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert, in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert. Vor dem Ausstreichen der Bakterien wurde die LB-Agarplatte bei Bedarf mit je 50 μ l X-Gal und IPTG zur Blau-Weiß-Selektion bestrichen. Die Kultivierung der Klone erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.2 Isolation von Plasmid-DNS aus E.coli DH5 α

3.2.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNS nach der Koch-(boiling)-Methode

(Holmes und Quigley, 1981)

Diese Methode wurde ausschließlich zur Restriktionsanalyse von Klonen unter Verwendung von RNase verwendet, da die so gewonnene DNS große Mengen an RNS und bakterieller Endotoxine enthält.

Bakterienkolonien von LB-Agarplatten wurden in 5 ml Ampicillin-haltiges (150–200 μ g/ml) LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler kultiviert. Am Folgetag wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur 60 s bei 10.000 x g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 400 μ l

STET-Lösung (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 M NaCl) resuspendiert, mit 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) durchmischt, 30 s in Wasser gekocht und anschließend für 10 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Das Sediment aus Zelltrümmern wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernt, die Plasmid-DNS im Überstand durch Zugabe von 420 µl Isopropanol und 40 µl 3 M NaAc pH 5,0 präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation für mindestens 30 min bei 4 °C und 13.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 500 µl 70 % (v/v) EtOH gewaschen und 10 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNS an der Luft oder in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet und in 40 µl ddH₂O aufgenommen.

3.2.2 Plasmidpräparation durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule

Die Präparation der DNS für Klonierungen, Sequenzierungen, Transfektionen und Cotransfektionen erfolgte durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule.

Zur Isolierung von Plasmid-DNS wurde ein „Miniprep-Kit“ („peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“, Peqlab/VWR International, Erlangen) oder „Midiprep-Kit“ („NucleoBond Xtra Midi“, Quiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für „Minipreps“ wurden 5 ml, für „Midipreps“ 200 ml LB-Medium entweder mit Bakterien aus Glycerol stocks oder Bakterienkolonien von LB-Agarplatten angeimpft. Dem LB-Medium wurden 150–200 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die gewonnene DNS wurde in ddH₂O gelöst, die DNS-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl oder 1 µg/µl eingestellt. Die Plasmid-Lösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.3 Isolation von RNS aus Zellen

Die Präparation von RNS wurde mittels „peqGOLD TriFast“ (Peqlab/VWR International, Erlangen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach Resuspendieren der Zellen erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion. Die RNS wurde aus der wässrigen Phase mit Isopropanol präzipitiert und mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Das RNS Sediment wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die so gewonnene RNS wurde für RT-PCR Reaktionen (siehe 3.9)

verwendet. Zur langfristigen Lagerung bei -20 °C wurde dem RNS-Präzipitat $250\ \mu\text{l}$ $75\ \%$ (v/v) EtOH zugegeben.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNS verwendet. Dafür wurden die DNS-Proben mit 6x Beladungspuffer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) versetzt und im TAE-Puffersystem auf ein horizontales Agarosegel („UltraPure Agarose“, Life Technologies, Darmstadt) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei $8\text{--}12\ \text{V}$ pro cm Gelbreite, die Zeit und die eingesetzten Volumina wurden je nach Verwendungszweck der DNS gewählt. Zum Nachweis der DNS wurden der $1\ \%$ -igen (w/v) Agaroselösung $2\ \mu\text{l}$ Ethidiumbromid ($10\ \text{mg/ml}$, Bio-Rad Laboratories, München) pro $100\ \text{ml}$ zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht ($254\ \text{nm}$) unter Verwendung von Größenstandards (siehe 2.2).

3.5 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose

Die DNS-Fragmente wurden nach der Restriktionsspaltung (siehe 3.6) durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die gewünschte Bande unter UV-Licht ($254\ \text{nm}$) identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert. Die Gelpräparation mittels Bindung an eine Silica Membran erfolgte nach Angaben des Herstellers („QIAquick Gel Extraction Kit“, Qiagen, Hilden).

3.6 Restriktion von DNS-Doppelsträngen

Die Restriktion von Plasmiden erfolgte unter Beachtung der Herstellerangaben bezüglich der verwendeten Restriktions-Endonukleasen und Puffersysteme (siehe 2.6). Es wurden $2\ \text{Units}$ Restriktionsenzym pro μg DNS bei der Restriktionsspaltung eingesetzt. Dem Restriktionsansatz wurde $0,5\ \mu\text{g}$ RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) zugefügt, wenn die Isolation der DNS mit der „boiling-Methode“ (siehe 3.2.1) durchgeführt worden war.

3.7 Ligation von DNS-Doppelsträngen

Die aus dem Agarosegel isolierten DNS-Fragmente wurden in den entsprechenden linearisierten Vektor ligiert. Hierbei wurde die Insert-DNS in einem dreifach molaren Überschuss zu 100 ng Plasmid DNS eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von 2 Units T4-DNS-Ligase und Ligationspuffer (Roche Diagnostics, Mannheim) über Nacht bei 14 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 10–20 µl. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis et al., 1986)

Die präparative PCR wurde mit der PWO Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) oder bei Verwendung einer Assembly PCR mit dem Polymerase Mix „High Fidelity PCR Master“ (Roche Diagnostics, Mannheim) in einem programmierbaren Heizblock („T3000 Thermocycler“, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Mit Hilfe der Software „Vector NTI Advance“ (Life Technologies, Darmstadt) wurden geeignete Primersequenzen ermittelt, die einen Guanin- und Cytosin-Gehalt von 40–60 % aufweisen sollten. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung der verwendeten DNS-Oligonukleotide (siehe 2.7) wurde mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt („Mastercycler gradient“, Eppendorf, Hamburg).

PCR

Es wurden folgende alternative Standardansätze für die PCR verwendet:

Matrizen-DNS (50–100 ng)	x µl
Primer I (10 µM)	1,5 µl
Primer II (10 µM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
10x Polymerase Puffer	5 µl
PWO Polymerase (5 U/µl)	1 µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	ad 50 µl

Matrizen-DNS (50–100 ng)	x µl
Primer I (10 µM)	1,5 µl
Primer II (10 µM)	1,5 µl
DMSO (5 %)	2,5 µl
High fidelity Master Mix	25 µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	ad 50 µl

Es wurde folgendes PCR Programm verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1. Hitzedenaturierung	94	04:00
2. Hitzedenaturierung	94	00:30–01:00
3. Anlagerung der Oligonukleotide	50–65	00:30–01:00
4. Polymerisation (je nach Länge; ~1.000 bp/min) 30 Reaktionszyklen (2.–4.)	72	01:00–02:30
5. Einmalige Endpolymerisation	72	04:00–08:00
6. Kühlung	4	

Assembly PCR

Es wurde folgender Standardansatz für die Assembly PCR verwendet:

Matrizen-DNS I (10–100 ng)	x µl
Matrizen-DNS II (10–100 ng)	x µl
DNS I und II in äquimolarer Menge	
DMSO (5 %)	5 µl
High fidelity Master Mix	50 µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	ad 100 µl

Es wurden folgende PCR Programme verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1. Hitzedenaturierung	94	04:00
2. Hitzedenaturierung	94	01:00
3. Anlagerung der Oligonukleotide	60–70	01:00
4. Polymerisation (je nach Länge; ~1.000 bp/min) 10 Reaktionszyklen (2.–4.)	72	01:00–04:00
5. Einmalige Endpolymerisation	72	04:00–08:00
6. Kühlung	4	

Zugabe der Primer:

Primer I (10 μ M)	3 μ l
Primer II (10 μ M)	3 μ l

PCR Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (min:s)
1. Hitzedenaturierung	94	02:00–04:00
2. Hitzedenaturierung	94	01:00
3. Anlagerung der Oligonukleotide	52–59	01:00
4. Polymerisation (je nach Länge; ~1.000 bp/min) 30 Reaktionszyklen (2.–4.)	72	01:00–04:00
5. Einmalige Endpolymerisation	72	04:00–08:00
6. Kühlung	4	

3.9 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um eine CD8 Domäne aus humanen Lymphozyten für die Klonierung einer Genkassette zu isolieren. Dazu wurde die RNS aus den peripheren Blutlymphozyten gewonnen, durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in cDNS umgeschrieben und der benötigte cDNS Abschnitt mit Hilfe der PCR amplifiziert. Hierfür wurde das „Qiagen OneStep RT-PCR Kit“ (Quiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Reaktion wurde mit Hilfe eines programmierbaren Heizblocks („T3000 Thermocycler“, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Es wurde folgender RT-PCR Reaktionsansatz verwendet:

Matrizen-RNS (0,5–1 μ g)	x μ l
Primer I (30 μ M)	1 μ l
Primer II (30 μ M)	1 μ l
dNTPs (10 mM)	2 μ l
5x RT-PCR Puffer	10 μ l
Enzym Mix	2 μ l
steriles ddH ₂ O, RNase-frei	ad 50 μ l

Es wurde folgendes PCR Programm verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1. Reverse Transkription	50	30:00
2. Aktivierung DNS-Polymerase	95	15:00
3. Hitzedenaturierung	94	01:00
4. Anlagerung der Oligonukleotide	45–65	01:00
5. Polymerisation 30 Reaktionszyklen (3.–5.)	72	01:00
6. Einmalige Endpolymerisation	72	10:00
7. Kühlung	4	

3.10 Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(Sanger, 1975)

Die DNS-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode unter Verwendung des „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits“ (Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt). Die Reaktionen wurden mit Hilfe eines programmierbaren Heizblocks („T3000 Thermocycler“, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die Sequenzierung verwendet (optimiert von Cologne Center of Genomics, Universität zu Köln):

Matrizen-DNS (2–10 ng pro 100 bp)	x µl
Sequenzierungs-Oligonukleotid (10 µM)	0,25 µl
Terminator-Ready-Reaction-Mix	0,25 µl
5x Puffer	2,25 µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	ad 10 µl

Es wurde folgendes PCR Programm verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1. Hitzedenaturierung	96	00:10
2. Hitzedenaturierung	96	00:10
3. Anlagerung der Oligonukleotide	55	00:05
4. Polymerisation 32 Reaktionszyklen (2.–4.)	60	04:00
5. Kühlung	4	

Die Auswertung der Proben erfolgte durch das Cologne Center of Genomics (Universität zu Köln), wo die Kapillar-Elektrophorese sowie die Fluoreszenzanalysen durchgeführt wurden. Digitalisierte Sequenzierungsdateien wurden mit Hilfe des Programms „ContigExpress“ („Vector NTI Advance“, Life Technologies, Darmstadt) bearbeitet.

3.11 Zellkultur

3.11.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in S2 Laboren unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II (Kojair Tech Oy, Vilppula, FIN) durchgeführt. Medien, Zusätze und Puffer wurden gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert und anschließend steril gehandhabt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien oder Lösungen auf die geeignete Temperatur eingestellt. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4 °C.

Zur Kultivierung von HEK 293 T Zellen wurde das DMEM Medium verwendet. Für alle weiteren Tumorzelllinien, Hybridomzellen und periphere Blutlymphozyten wurde das RPMI 1640 Medium eingesetzt. Vor Gebrauch wurde den Medien 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) „PenStrep“ zugefügt. Im Folgenden ist mit der Bezeichnung „Medium“ das entsprechende Kulturmedium inklusive dieser Zusätze gemeint. Die Kultivierung erfolgte in Inkubatoren unter 5 %-iger (v/v) (RPMI 1640 Medium) oder 10 %-iger (v/v) (DMEM Medium) CO₂-Versorgung bei 37 °C und 95 bis 100 % relativer Luftfeuchtigkeit. Bei Bedarf wurden die Zellen zur Prävention von Mykoplasmen in Medium mit Ciprofloxacin (10 µg/ml) kultiviert.

3.11.2 Passage adhärenter Zellen

Zur Ablösung adhärenter Zellen von der Oberfläche eines Zellkulturgefäßes wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die gesamte Zellschicht mit 1–3 ml einer 1x Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Das Zellkulturgefäß wurde bis zur Ablösung der Zellen in den Inkubator auf 37 °C gestellt, um eine optimale Enzymaktivität zu gewährleisten. Nach vollständiger Ablösung wurden die Zellen sofort resuspendiert, wobei das im Medium enthaltene Serum die Trypsin-Aktivität irreversibel blockiert. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand

verworfen und das Zellsediment in dem entsprechenden Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für einen Versuch verwendet oder weiter kultiviert, indem ein Teil der Zellsuspension in das Zellkulturgefäß zurückgeführt und mit frischem Medium versehen wurde.

3.11.3 Nachweis und Eliminierung von Mykoplasmen

Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenbefall getestet. Dazu wurden die jeweiligen Zellen bis zu einer Konfluenz von 50–70 % auf einem Objektträger mit Kammeraufsatz („Lab-Zek Chamber Slides“, Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA) kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Der Objektträger mit den Zellen wurde bei Raumtemperatur trocknen gelassen und mit „Immunoselect Antifading Mounting Media DAPI“ (Dianova, Hamburg) eingedeckelt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI dient hierbei, neben dem Anfärben der Zellkern-DNS, zum Nachweis der Mykoplasmen-DNS. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 358 nm. Eine Kontamination zeigt sich durch blaufluoreszierende Punkte an der Zellmembran, im Zytoplasma und manchmal im Interzellulärraum.

Bei einer Kontamination wurden die Zellen verworfen oder einer Mykoplasmen-Kur unterzogen. Dazu wurden die Zellen 3 Tage in Medium mit Tiamulin (10 µg/ml) und anschließend 4 Tage in Medium mit Minocyclin (10 µg/ml) kultiviert. Dieses Vorgehen wurde 3–4 Mal durchgeführt. Abschließend wurden die gekurten Zellen erneut auf Mykoplasmenbefall getestet.

3.11.4 Zellzählung und Viabilitätsbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zählkammer angehaucht und ein Deckglas parallel zur Oberfläche mit leichtem Druck so aufgelegt, dass Newton'sche Ringe erkennbar waren. Hierbei stellt der Raum zwischen Glasplatte und Unterseite des Deckglases die eigentliche Zählkammer dar, deren Volumen durch die markierte Grundfläche und Kammerhöhe bestimmt ist. Es wurden 10 µl der zu zählenden Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Von dieser Suspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Es wurden zwei schräg

gegenüberliegende Großquadrate, von denen jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt ist, mikroskopisch ausgezählt. Dies ergab die Zellzahl $\times 10^4$ /ml. Tote Zellen wurden durch die Färbung mit Trypanblau kenntlich gemacht und nicht mitgezählt.

Alternativ wurde zur Bestimmung der Anzahl und Viabilität der Zellen der „ViCell XR Cell Viability Analyzer“ (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Hierbei wurden tote Zellen ebenfalls durch Trypanblau angefärbt und nach Aufnahme von 50 Bildern die Anzahl der viablen Zellen/ml sowie die Viabilität der Zellen in % angezeigt.

3.11.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zelllinien wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen sedimentiert und in 900 μ l des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μ l DMSO und Durchmischung der Zellsuspension wurde diese zügig in Gefrier-Ampullen überführt. Die Gefrier-Ampullen wurden mit Hilfe des auf -20°C vorgekühlten Einfrierbehälters „Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container“ (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit einer Abkühlung von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in eine -150°C Tiefgefriertruhe oder flüssigen Stickstoff überführt.

Zur längerfristigen Lagerung primärer Zellen wurden $1\text{--}2,5 \times 10^7$ PBL sedimentiert, in 500 μ l 20 % (w/v) „human serum albumin“ (Gibco/Life Technologies, Darmstadt) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l einer auf 4°C vorgekühlten „Cryopreservation Solution“ tropfenweise zugegeben und mit den Zellen, nach Überführung in eine Gefrier-Ampulle, wie oben beschrieben verfahren.

„Cryopreservation Solution“ 10 ml: 5,8 ml 20 % (w/v) HSA; 2,2 ml 45 % (w/v) Glucose; 2 ml DMSO

Kryokonservierte Zellen wurden zur Verwendung zügig aufgetaut und die Zellen sofort in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter den entsprechenden Kulturbedingungen kultiviert.

3.11.6 Gewinnung humaner T-Lymphozyten

Zur Gewinnung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden Leukozyten-Konzentrate, sog. „buffy coats“, verwendet. Die Isolation der PBMC erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation (Böyum, 1968) mit Hilfe von „Lymphoprep“ (Axis-Shield, Oslo, N). Hierfür wurde der Inhalt des „buffy coats“ 1:2 mit PBS verdünnt und jeweils 25 ml dieser Mischung vorsichtig auf 15 ml „Lymphoprep“ geschichtet. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei RT und 800 x g zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgestellt wurde, um den Gradienten nicht zu zerstören. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und verworfen. Die Lymphozyten, die sich an der Interphase zwischen Serum und „Lymphoprep“ befinden, wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Es erfolgten drei Waschschriffe mit jeweils 30 ml PBS und Zentrifugation für 10 min bei RT und 250 x g. Das Zellsediment wurde in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) „PenStrep“ resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml) und die Zellen mit 1.000 U/ml IL-2, 200 ng/ml anti-human CD3 Antikörper OKT3 und 50 ng/ml anti-human CD28 Antikörper 15E8 stimuliert. Verbliebene adhärenente Zellen setzten sich aufgrund der Plastikadhärenz über Nacht an der Oberfläche der Zellkulturflasche ab. Die nicht adhärenenten peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden ab dem Folgetag in einer neuen Zellkulturflasche weiter kultiviert. Nach dreitägiger Aktivierung der PBL wurden die Zellen in Kulturmedium mit IL-2 (200–500 U/ml) kultiviert. Hierbei werden bevorzugt T-Zellen amplifiziert, wohingegen andere mononukleäre Zellen aus dem Blut aufgrund fehlender Stimulation sterben.

3.11.7 Transfektion von 293T HEK Zellen

Die Transfektion von Tumorzellen der Linie 293T erfolgte mittels des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes „jetPRIME“ (Polyplus-transfection, Illkirch, F). HEK 293T Zellen wurden 48–72 h vor der Transfektion in 10 ml DMEM Medium auf einer 10 cm Zellkulturplatte so ausgesät, dass die Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion 60–70 % aufwies. Für die Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNS in 500 µl „jetPRIME“ Puffer 10 s mittels Vortex gemischt, mit 20 µl „jetPRIME“ Transfektionsreagenz versetzt, erneut 10 s mittels Vortex gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Medium auf der Zellkulturplatte erneuert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Medium über den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Platte verteilt. Nach 24–48 h

Inkubation unter Kulturbedingungen wurden die transfizierten Zellen für Analysen verwendet.

3.11.8 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen

Zur retroviralen Transduktion wurde zunächst die retrovirale Vektor-DNS zusammen mit der retroviralen Helferplasmid-DNS pCOLT-GALV (#392) und pHIT60 (#393) in Zellen der Linie 293T eingebracht. Dies erfolgte wie in Kapitel 3.11.7 beschrieben. Es wurden pro Kotransfektionsansatz jeweils 3 µg der Helferplasmid-DNS und 4 µg der Vektor-DNS eingesetzt. Nach 24 h wurde das DMEM Medium entfernt und pro 10 cm Zellkulturplatte wurden 5×10^6 vorstimulierte (4–8 Tage) T-Zellen mit den kotransfizierten HEK 293T Zellen in 25–30 ml RPMI 1640 Medium unter Zugabe von 1.000 U/ml IL-2 sowie 10 mM HEPES kokultiviert. Die Voraktivierung der T-Zellen ist essentiell, da die Infektion der T-Zelle und die Integration der Vektor-DNS ins Wirtsgenom bevorzugt in sich teilende Zellen erfolgt. Nach 24–48 h Kokultivierung wurden die transduzierten T-Zellen vorsichtig von den adhärenen HEK 293T Zellen abgenommen und die Transduktionsrate mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.13) bestimmt. Die transduzierten T-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium 24–48 h ohne IL-2, bei > 48 h Kultur mit 20 U/ml IL-2 inkubiert, um die Aktivierung durch den endogenen TCR zu reduzieren und die Zellen in einen Ruhezustand zu überführen. Vor dem Einsatz wurden die Zellen nochmals mit RPMI 1640 Medium gewaschen.

3.11.9 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Zell-Lysaten wurden 1×10^6 Rezeptor-tragende T-Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Zellsediment anschließend in 1 ml kaltem „Lysis Puffer“ resuspendiert. Es wurden Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen gewählt, um die kovalente Bindung von Heterodimeren zu prüfen. Die Zellsuspension wurde 30 min auf einem Überkopfschüttler im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und $6.000 \times g$ wurde der Überstand in ELISA Tests (siehe 3.17.2) eingesetzt.

„Lysis Puffer“: 50 mM Tris-HCl, 100 mM oder 1,5 M NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100 (Roth, Karlsruhe), 1 Tablette/10 ml „Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablet“ (Roche Diagnostics, Mannheim)

3.12 „Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS)

Die magnetische Zellsortierung (MACS) humaner T-Zellen zur Gewinnung von CD4⁺ Zellen oder CD8⁺ Zellen erfolgte durch Verwendung des „CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, human“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) oder des „CD8⁺ T Cell Isolation Kit, human“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers. Als Puffer wurde PBS ohne BSA und EDTA verwendet. Die Trennung wurde mit Hilfe des „autoMACS pro“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) unter Verwendung des Programms „Deplete“ für die CD4⁺ Separation oder „Depletes“ für die CD8⁺ Separation durchgeführt. Hierbei werden alle Zellen außer CD4⁺ Zellen oder CD8⁺ Zellen mit einem Cocktail biotinylierter Antikörper gebunden. Die anschließende Inkubation mit anti-Biotin Antikörper gekoppelten magnetischen „MicroBeads“ führt dazu, dass die markierten Zellen auf der Säule im Magnetfeld zurückgehalten werden. Die unmarkierten CD4⁺ Zellen bzw. CD8⁺ Zellen passieren „unberührt“ die Säule und wurden anschließend sofort mit PBS gewaschen und in RPMI 1640 Medium aufgenommen (1 x 10⁶ Zellen/ml). Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch Zusatz von 1.000 U/ml IL-2, 200 ng/ml anti-human CD3 Antikörper OKT3 und 50 ng/ml anti-human CD28 Antikörper 15E8. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Die MACS Anreicherung der anti-CEA CAR #519 T-Zellen erfolgte durch Bindung an die BW431/26 scFv Domäne. Die modifizierten T-Zellen wurden mit dem Antikörper BW2064/399 und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG₁-PE inkubiert. Die positive Selektion der #519 CAR T-Zellen erfolgte nach der Inkubation mit anti-PE Antikörper gekoppelten magnetischen „MicroBeads“ unter Verwendung des Programms „Possel_S“ mit Hilfe des „autoMACS pro“.

3.13 Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analyse

In einem 5 ml Polystyrol Röhrchen wurden 2–5 x 10⁵ Zellen zunächst zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei allen Waschschrritten für 3 min bei RT und 400 x g. Die Fluorochrom-gekoppelten Detektionsantikörper oder primäre, ungekoppelte Antikörper wurden in das verbleibende Restvolumen von ca. 100 µl gegeben und die Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden ab diesem Schritt vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, da die Fluorochrome lichtempfindlich sind. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS

gewaschen und in 400 μ l PBS aufgenommen. Alternativ wurden weitere Inkubationen mit Detektionsantikörpern oder sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern durchgeführt und die Zellen anschließend in 400 μ l PBS resuspendiert. Die Analyse der Fluoreszenzen erfolgte mit Hilfe des „FACSCanto“ oder „FACSCanto II“ Durchflusszytometers unter Verwendung der „FACSDiva“ Software (Becton Dickinson, Heidelberg).

3.14 Produktion und Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die Produktion der monoklonalen Maus IgG₁ Antikörper BW2064/36, BW2064/399, 15E8, 9G10 und des monoklonalen Maus IgG_{2a} Antikörpers OKT3 erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie unter Verwendung von Ziege anti-Maus IgG₁ Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Ziege anti-Maus IgG_{2a} Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gekoppelter Agarose. Zur Expression des gewünschten monoklonalen Antikörpers wurden die jeweiligen Hybridomzellen kultiviert, der antikörperhaltige Kulturüberstand gesammelt und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen von ca. einem Liter Kulturüberstand wurde dieser zentrifugiert und filtriert (Ausschlussgröße 0,45 μ m). Anschließend wurde der Kulturüberstand mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min über eine Antikörper-beladene „C 10/10 Agarosesäule“ (Amersham/GE Healthcare Europe, Freiburg) gegeben. Nicht gebundener Antikörper wurde danach mit PBS ausgewaschen. Die Elution einzelner Fraktionen des gebundenen Antikörpers erfolgte mit 0,1 M Glycin Puffer pH 3,0 unter Verwendung des Flüssigchromatographiesystems „ÄKTAprime“ (Amersham/GE Healthcare Europe, Freiburg) gemäß Herstellerangaben. Hierbei wird die Absorption der einzelnen Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch gemessen. Nach abgeschlossener Elution wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereint und in einem Dialyseschlauch („Spectra/Por“, Roth, Karlsruhe) der Ausschlussgröße 12.000–14.000 Molecular Weight Cut Off (MWCO) über Nacht bei 4 °C in zwei Liter PBS unter Rühren umgepuffert. Abschließend wurde die Antikörper-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

3.15 Kultivierung auf beschichteten Oberflächen

Zur Beschichtung wurden die entsprechenden Antikörper oder Proteine in PBS verdünnt und pro Vertiefung 50 μ l auf eine „F96 Polysorp Nunc-Immuno“ Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgetragen. Als Isotyp Kontroll-Antikörper wurde beispielsweise der IgG1 Antikörper 15H6 mit Spezifität für T-2 Mycotoxin verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder alternativ für 3–4 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Antikörper-Lösungen in den Platten verworfen und die Platte mit 200 μ l PBS pro Vertiefung gewaschen. Die zu untersuchenden T-Zellen wurden nach IL-2 Deprivation (siehe 3.11.8) in 200 μ l Kulturmedium pro Vertiefung kultiviert. Hierfür wurde die Rezeptor-Expression der jeweiligen transduzierten T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.13) und die Anzahl der eingesetzten T-Zellen auf die Transduktionsrate normiert. Je nach Versuchsaufbau wurden 0,25–3 $\times 10^4$ CAR T-Zellen pro Vertiefung ausplattiert und 48–72 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Bei dem Ansatz mit nicht-transduzierten T-Zellen, die als Kontrolle dienten, wurde die gleiche Zellzahl eingesetzt wie bei dem Ansatz der CAR T-Zellen mit geringster Transduktionsrate. Zur Analyse wurden maximal 150 μ l Zellkulturüberstand pro Vertiefung vorsichtig abgenommen und für Zytokin-ELISA (siehe 3.17.1) verwendet. Die kurzfristige Lagerung der Kulturüberstände erfolgte bei 4 °C. Bei längerfristiger Lagerung wurden die Zellkulturüberstände bei -20 °C aufbewahrt.

3.16 Kokultivierung der T-Zellen mit Tumorzellen

Die Rezeptor-Expression der zu untersuchenden T-Zellen wurden nach IL-2 Deprivation (siehe 3.11.8) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.13) und die Anzahl der eingesetzten T-Zellen auf die Transduktionsrate normiert. Zur Berechnung der Anzahl nicht-transduzierter T-Zellen, die als Kontrolle dienten, wurde die niedrigste Transduktionsrate herangezogen. Des Weiteren wurde die Zellzahl der Tumorzellen bestimmt. Anschließend wurden die CAR T-Zellen (Effektorzellen) in 100 μ l RPMI 1640 Medium pro Vertiefung in Verdünnungsreihen auf die Rundbodenplatten („Zellkulturtestplatte 96U“, TPP, Trasadingen, CH) aufgetragen. Danach wurden die Tumorzellen in 100 μ l RPMI 1640 Medium pro Vertiefung in konstanter Anzahl zugegeben. Die eingesetzte Anzahl Effektorzellen bzw. Tumorzellen ist im jeweiligen Experiment angegeben. Nach 48 h Kokultur wurden pro Vertiefung 150 μ l

Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen und für Zytokin-ELISA eingesetzt oder bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zytotoxizität der Effektorzellen wurde mit Hilfe eines XTT-basierten Viabilitätstests (siehe 3.19) der verbleibenden Zellen ermittelt.

3.17 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

3.17.1 ELISA mit Zellkulturüberständen

Diese Methode wurde verwendet, um die Zytokine IFN- γ und IL-2 nach Inkubation von T-Zellen mit immobilisierten Antikörpern (siehe 3.15) oder Kokultivierung mit Tumorzellen (siehe 3.16) in Zellkulturüberständen zu bestimmen.

„F96 Maxisorp Nunc-Immuno“ Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) wurden mit dem Fangantikörper in $50\ \mu\text{l}$ Beschichtungspuffer pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Flüssigkeit in den Platten wurde ausgeschlagen und freie Bindungsstellen durch 1% (w/v) BSA in PBS (BB) abgesättigt. Hierfür wurden $200\ \mu\text{l}$ der BB-Lösung pro Vertiefung aufgetragen und für mindestens 2 h bei RT inkubiert. Nach Ausschlagen der Platten wurden diese dreimal mit $200\ \mu\text{l}$ PBS/T pro Vertiefung gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen einer Standardreihe, wobei eine bekannte Menge des zu untersuchenden Zytokins in BB/T titriert wurde. Danach wurden die zu untersuchenden Zellkulturüberstände (je $50\ \mu\text{l}$ /Vertiefung) auf die Mikrotiterplatten gegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend viermal mit $200\ \mu\text{l}$ PBS/T pro Vertiefung gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Biotin-gekoppelten Detektionsantikörpern in jeweils $50\ \mu\text{l}$ BB/T pro Vertiefung für 1 h bei RT. Danach wurde nicht gebundener Antikörper durch viermaliges Waschen mit $200\ \mu\text{l}$ PBS/T pro Vertiefung entfernt. Pro Vertiefung wurden $50\ \mu\text{l}$ einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase in BB/T aufgetragen und für 30 min bei RT inkubiert. Die Platten wurden fünfmal mit $200\ \mu\text{l}$ PBS/T pro Vertiefung gewaschen und anschließend $100\ \mu\text{l}$ ABTS-Substratlösung pro Vertiefung zugegeben. Der Test wurde bei RT entwickelt und die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen. Die Berechnung der Zytokin-Konzentrationen erfolgte anhand der linearen Progression der gemessenen Standard-Konzentrationen des jeweiligen rekombinanten Proteins.

Beschichtungslösung IFN- γ ELISA: 0,1 M Na₂HPO₄ pH 9,0; 1 μ g/ml Maus anti-human IFN- γ Antikörper

Beschichtungslösung IL-2 ELISA: 0,1 M Na₂HPO₄ pH 9,0; 1 μ g/ml Maus anti-human IL-2 Antikörper

PBS/T: 1 x PBS; 0,1 % (v/v) „Tween 20“

BB/T: 1 % (w/v) BSA in PBS; 0,05 % (v/v) „Tween 20“

Proteinstandard rekombinantes IFN- γ : BB/T, 1:10.000 „Imukin“ entspricht 20 ng/ml IFN- γ

Proteinstandard rekombinantes IL-2: BB/T, 1:900 der Stammlösung aus „Proleukin S“ entspricht 2 U/ml IL-2

Detektionslösung: BB/T, 1 μ g/ml biotinylierter Maus anti-human IFN- γ bzw. 1 μ g/ml biotinylierter Maus anti-human IL-2 Antikörper

Streptavidin-POD-Lösung: BB/T, 1:10.000 Streptavidin-gekoppelte Peroxidase

ABTS-Substratlösung: 1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)

3.17.2 ELISA mit Zell-Lysaten

Mit Hilfe des ELISA wurden CAR-Heterodimere in Zell-Lysaten (siehe 3.11.9) nachgewiesen.

Die Durchführung mit 50 μ l Zell-Lysat in PBS pro Vertiefung erfolgte wie in Kapitel 3.17.1 beschrieben. Allerdings wurden folgende Fang- bzw. Detektionsantikörper verwendet:

Beschichtungslösung: PBS, 5 μ g/ml BW2064/36 Antikörper

Detektionslösung 1: ErbB2-GFP Fusionsprotein in RPMI 1640 Medium, 200 μ l pro Vertiefung, Inkubation 1 h bei RT

Detektionslösung 2: BB/T, 1:32.000 der stock solution (1 μ g/ml) des biotinylierten Ziege anti-GFP Antikörpers

3.18 Multiplex-Immunoassay

Der Bead basierte Multiplex-Immunoassay „Human FlowCytomix Th17 Panel“ (eBioscience, Frankfurt) wurde verwendet, um die Konzentrationen mehrerer humaner Zytokine in einem Zellkulturüberstand simultan zu bestimmen. Bei dieser Durchführung wurden die Zytokine mit folgender Sensitivität gemessen:

IFN- γ : 1,6 pg/ml; IL-1 β : 4,2 pg/ml; IL-2: 16,4 pg/ml; IL-4: 20,8 pg/ml; IL-5: 1,6 pg/ml; IL-6: 1,2 pg/ml; IL-9: 1,5 pg/ml; IL-10: 1,9 pg/ml; IL-12 p70: 1,5 pg/ml; IL-13: 4,5 pg/ml; IL-17A: 2,5 pg/ml; IL-22: 43,3 pg/ml; TNF- α : 3,2 pg/ml

Die Zellkulturüberstände (30 μ l/Vertiefung) wurden mit einer Mischung Beads auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Hierbei gab es zwei Bead-Größen. Die Beads waren mit Zytokin-spezifischen Antikörpern konjugiert. Nach Inkubation mit den Biotin-konjugierten, Zytokin-spezifischen Detektionsantikörpern erfolgte die Zugabe eines Streptavidin-PE Konjugats. Anschließend wurden die verschiedenen Populationen aufgrund ihrer Größe und Fluoreszenzintensität mittels der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Kalibrierkurven wurden unter Verwendung der im Kit enthaltenen Standardlösungen erstellt. Die Berechnung der Zytokin-Konzentrationen in der jeweiligen Probe erfolgte mit Hilfe der „FlowCytomix Pro 3.0“ Software (eBioscience, Frankfurt) anhand der Kalibrierkurven.

3.19 XTT-basierter Viabilitätstest

(Jost et al., 1992)

Nach Kokultivierung von Effektorzellen und Tumorzellen (siehe 3.16) wurde nach Abnahme der Zellkulturüberstände die spezifische Zytolyse bestimmt. Hierzu wurden pro Vertiefung 100 μ l XTT-Reagenz Lösung zu den verbleibenden 50 μ l Ansätzen gegeben und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Das Tetrazolium-Salz XTT wird durch mitochondriale Dehydrogenasen der lebenden Zellen zu einem wasserlöslichen roten Formazan-Salz umgesetzt. Dabei ist die Zahl lebender Zellen proportional zur XTT Umsetzung. Die Farbmessung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

Die optische Dichte (OD) in den Vertiefungen der kultivierten Effektor- und Tumorzellen wurde spektrophotometrisch bestimmt. Von diesem Wert wurde die von den

Effektorzellen erzeugte OD abgezogen und in das Verhältnis zu den Tumorzellen allein abzüglich des Medium Hintergrunds gesetzt.

Die Berechnung der Viabilität erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{OD}_{\text{Effektorzellen und Tumorzellen}} - \text{OD}_{\text{Effektorzellen}}}{\text{OD}_{\text{Tumorzellen}} - \text{OD}_{\text{Medium}}} \times 100$$

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = 100 - \text{Viabilität [\%]}$$

XTT-Reagenz Lösung pro Vertiefung, vorgewärmt auf 37 °C:

50 µl 1 mg/ml XTT (Biomol, Hamburg) in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze,
1 µl 1,25 mM Phenazine Methosulfate (PMS) (Biomol, Hamburg), 50 µl
RPMI 1640 Medium

3.20 Tumorinduktion in der Maus

Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) genehmigt (Genehmigungsnummer 84-02.04.2012.A417). Für die Experimente wurden Rag2^{-/-}cγ^{-/-} Mäuse (Taconic, Hudson, NY, USA) des Stammes C57BL/6 verwendet. Hierbei handelt es sich um immundefiziente Mäuse, die durch Deletion der „common cytokine receptor γ chain“ in der Bildung funktionaler Rezeptoren der Gammakettenzytokine verhindert sind und infolgedessen keine NK Zellen besitzen (Cao et al., 1995). Die Einkreuzung mit der „recombinant activating gene 2“ (Rag2) defizienten Maus stellt sicher, dass aufgrund der fehlenden V(D)J Rekombination keine reifen T- und B- Lymphozyten gebildet werden (Shinkai et al., 1992).

Transduzierte humane T-Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS 24 h in RPMI 1640 Medium ohne IL-2 kultiviert und die CAR Expression durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.13). Die Anzahl der eingesetzten T-Zellen wurde auf die Anzahl CAR tragender T-Zellen normiert. Tumorzellen wurden von der Zellkulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in RPMI 1640 Medium resuspendiert. Die Zellzahlen wurden bestimmt (siehe 3.11.4) und pro Injektion 2 x 10⁶ Tumorzellen mit 1 x 10⁶ CAR T-Zellen vermischt. Nach Zentrifugation wurde die Zellmischung in kaltem

PBS resuspendiert (100 µl/Injektion). Als Kontrolle wurden 2×10^6 Tumorzellen in 100 µl kaltem PBS pro Injektion eingesetzt. Die Injektionen erfolgten zeitnah.

Tumorzellen und CAR T-Zellen wurden nach der Winn-Methode (Winn, 1961) subkutan in eine Flanke koinjiziert. In unserem Fall wurden in die andere Flanke nur Tumorzellen subkutan injiziert. Zur Analyse des subkutanen Tumorwachstums wurden Höhe, Breite und Tiefe der Tumore mittels einer Schieblehre gemessen und so das Tumolvolumen unter der Annahme des Volumens als maximaler Quader berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung der rekombinanten chimären Antigen-Rezeptoren (CARs)

Eine Weiterentwicklung der adoptiven T-Zell Therapie mit CAR T-Zellen stellt die selektive Erkennung von Antigen-Kombinationen durch Koexpression zweier CARs dar. Bei dieser Strategie werden das zur vollständigen T-Zell Aktivierung notwendige Primärsignal und das kostimulatorische Signal auf zwei CARs unterschiedlicher Spezifitäten aufgeteilt. Die Signalfunktionen der koexprimierten CARs komplementieren nur dann, wenn beide Zielantigene gebunden werden.

In einem Modellsystem wurde der anti-CEA CAR #519 mit Fc ϵ R1 γ Kette (nachfolgend γ Kette genannt) als Primärsignalgeber verwendet. Als alternativer Primärsignalgeber wurde der anti-CEA CAR #1331 generiert, der im Unterschied zu dem #519 CAR im extrazellulären Teil eine zusätzliche CD8 Domäne enthält. Weiterhin wurde der anti-ErbB2 CAR #1213 generiert, der ausschließlich die CD28 kostimulatorische Domäne aufweist. Die Koexpression zweier CARs wurde durch Verwendung einer bicistronischen Expressionskassette erreicht, die beide kodierenden DNS-Sequenzen über ein P2A Peptid verknüpft. Die Sequenz BW431/26scFv kodiert für die Bindedomäne des anti-CEA CAR, die Sequenz C6-B1D2scFv für die Bindedomäne des anti-ErbB2 CAR. Die Fc Brückendomäne des #1213 CAR setzt sich aus der konstanten CH2 und CH3 Region des humanen Immunglobulins IgG₁ zusammen. Alle Expressionskassetten enthalten den Leader der Immunglobulin Leichtkette kappa (κ). Der modulare Aufbau der Expressionskassetten ist in Abb. 5 dargestellt.

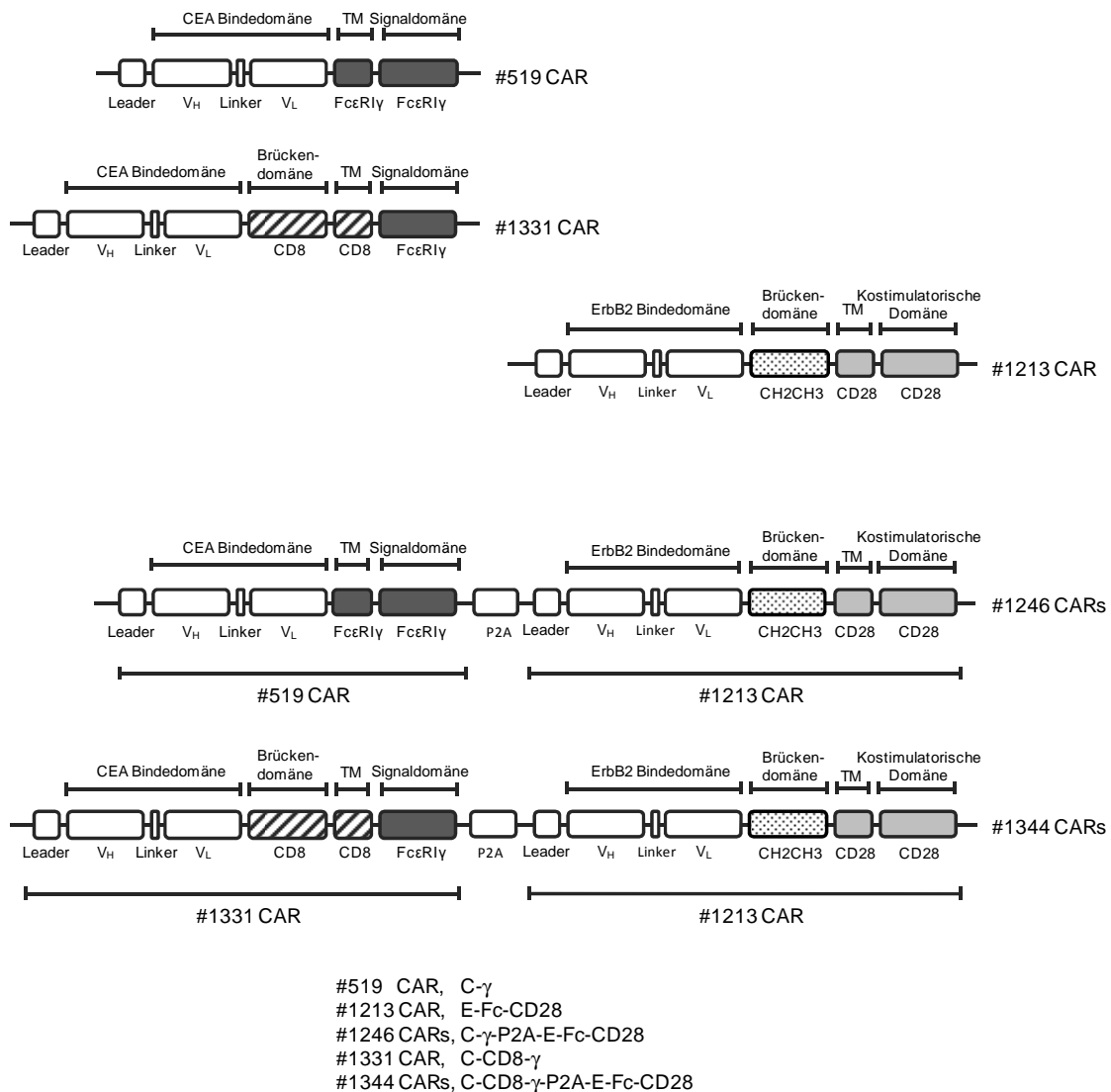


Abbildung 5: Modulärer Aufbau der Expressionskassetten der chimären Antigen-Rezeptoren.

Der CAR ist modular aufgebaut und besteht in der extrazellulären Domäne aus einem Einzelkettenantikörper (scFv) aus der variablen Region der schweren Kette (V_H) und der leichten Kette (V_L) mit Spezifität für CEA oder ErbB2 sowie einer Brückendomäne aus dem CD8 Rezeptor oder aus der Immunglobulin IgG₁ CH2CH3 Domäne. Der #519 CAR besitzt keine Brückendomäne. Die Transmembrandomäne (TM) besteht aus der Transmembranregion des CD8, FcεRIγ oder CD28 Rezeptors. Im intrazellulären Teil besteht der CAR aus der Signalkette des FcεRIγ oder CD28 Rezeptors. Die Proteine sind jeweils mit dem Leader der Immunglobulin Leichtkette kappa (κ) ausgestattet. Die bicistronische Expressionskassette gewährleistet durch das 2A Peptid eines Picornavirus (P2A) die äquimolare Translation der jeweiligen Proteine.

4.1.1 Klonierung des Plasmids pQCXIN-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR, E-Fc-CD28)

Im ersten Schritt wurde aus dem Plasmid #710 das L κ -C6-B1D2scFv DNS-Fragment durch die Restriktionsenzyme NcoI und BamHI isoliert (Abb. 6). Das Plasmid #637 wurde zur Isolation des Fragments pBullet Fc-CD28 mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten. Im nächsten Schritt wurden beide Fragmente ligiert. Aus dem neu generierten Plasmid #1195 wurde die L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 DNS mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „NotI-L κ -S“ (Nr. 527) und des 3'-Oligonukleotids „EcoRI-CD28-AS“ (Nr. 614) mittels PCR amplifiziert. Diese Reaktion fügte zugleich am 5' Ende eine NotI sowie am 3' Ende eine EcoRI Schnittstelle an. Das PCR-Produkt wurde zur Erzeugung des neuen Plasmids pQCXIN-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213) mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor #735 ligiert. Die Sequenz des neu generierten Plasmids wurde mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode (siehe 3.10) unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 76, 78, 127, 128, 539, 617 (siehe 2.7.2) verifiziert. Die annotierte DNS-Sequenz der #1213 Expressionskassette befindet sich im Anhang (siehe 6.1.1).

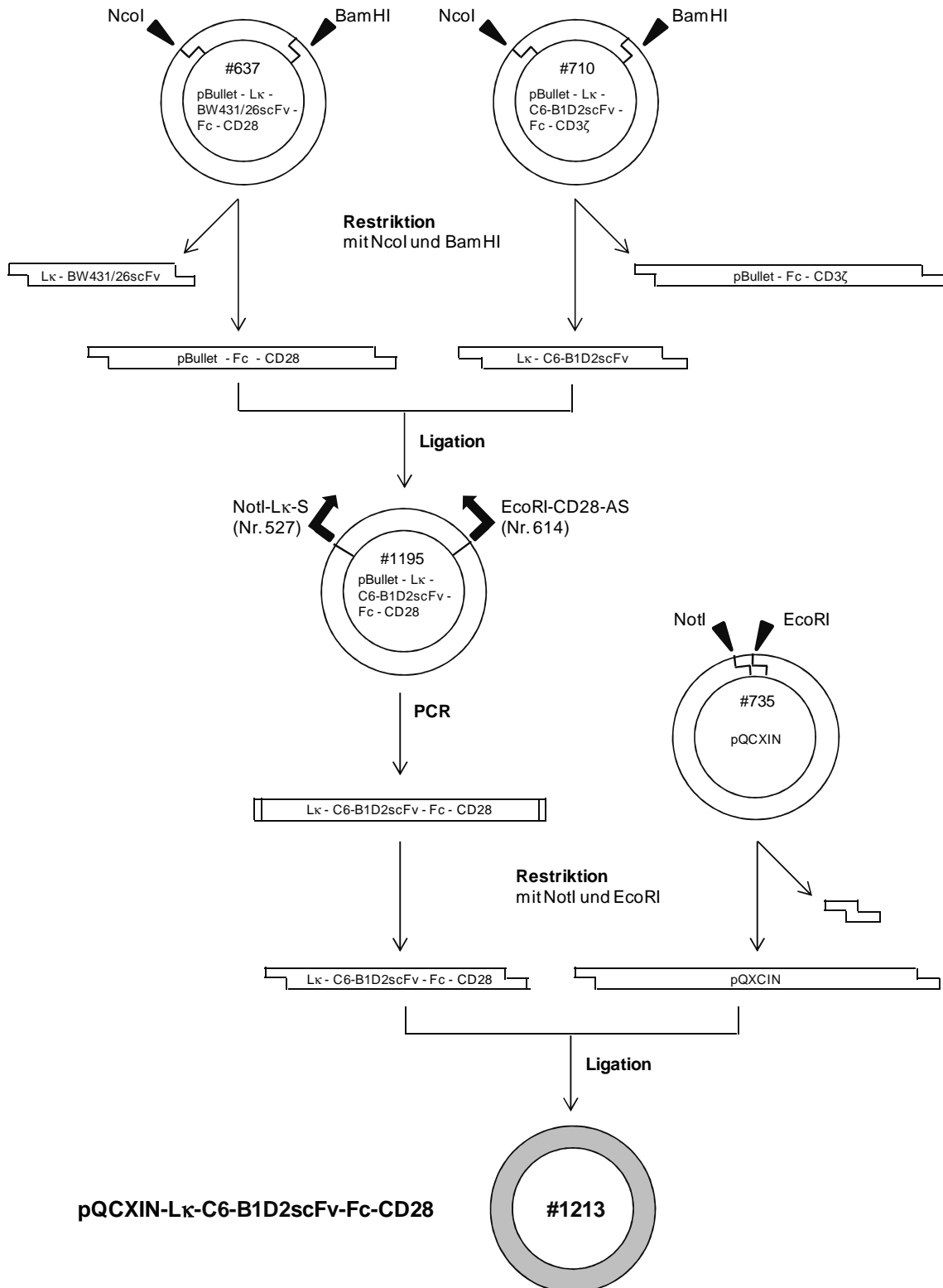


Abbildung 6: Klonierung der Expressionskassette für den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR).

Der #1213 CAR mit Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, humaner IgG₁-Fc Brückendomäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne wurde generiert. Die Klonierung des Zwischenprodukts (Plasmid #1195) erfolgte

durch Restriktion der Plasmide #637 und #710 und anschließender Ligation der entstandenen DNS-Fragmente. Die Expressionskassette für den #1213 CAR wurde aus dem Plasmid #1195 mittels PCR amplifiziert und in den pQCXIN Vektor #735 ligiert.

4.1.2 Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246 CARs, C- γ -P2A-E-Fc-CD28)

Zur Generierung der bicistronischen Expressionkassette für den CAR BW431/26scFv- γ und den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28 wurde das L κ -BW431/26scFv- γ DNS-Fragment aus dem Plasmid #519 mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „NotI-L κ -S“ (Nr. 527) und des 3'-Oligonukleotids „gamma-P2A-AS“ (Nr. 1205) amplifiziert (Abb. 7). Ebenso wurde das L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 DNS-Fragment aus dem Plasmid #1213 mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „P2A-L κ -S“ (Nr. 1204) und des 3'-Oligonukleotids „CD28-EcoRI-AS“ (Nr. 1203) vervielfältigt. Bei diesen Reaktionen wurden sowohl Überhänge zur Generierung der P2A Sequenz als auch am 5' Ende eine NotI sowie am 3' Ende eine EcoRI Schnittstelle angefügt. Durch Verwendung des P2A Peptids wird gewährleistet, dass beide Proteine in äquimolaren Mengen translatiert werden. Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem 5'-Oligonukleotid „NotI-L κ trunkiert-S“ (Nr. 1202) und dem 3'-Oligonukleotid „CD28-EcoRI-AS“ (Nr. 1203) amplifiziert und in den linearisierten pCR2.1 Vektor ligiert. Das Insert mit der kodierenden Sequenz für beide CARs wurde aus dem neu erzeugten Plasmid #1245, der Vektor pMP71 aus dem Plasmid #1178 mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI isoliert. Anschließend wurde der Vektor mit dem Insert zur Generierung des Expressionsplasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246) ligiert. Die Sequenz (siehe 6.1.2) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 76, 77, 78, 127, 128, 144, 282, 285, 617 (siehe 2.7.2) verifiziert.

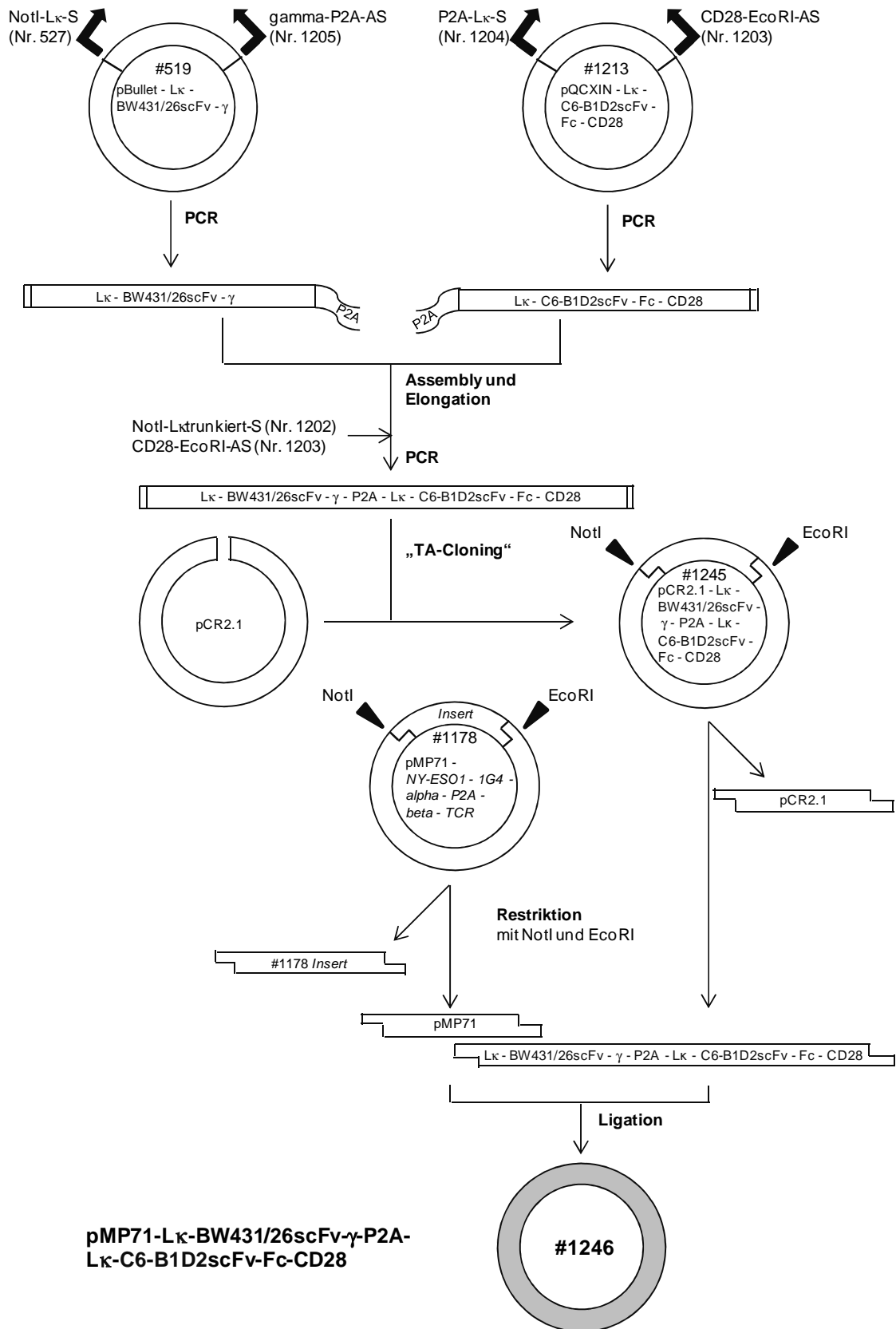


Abbildung 7

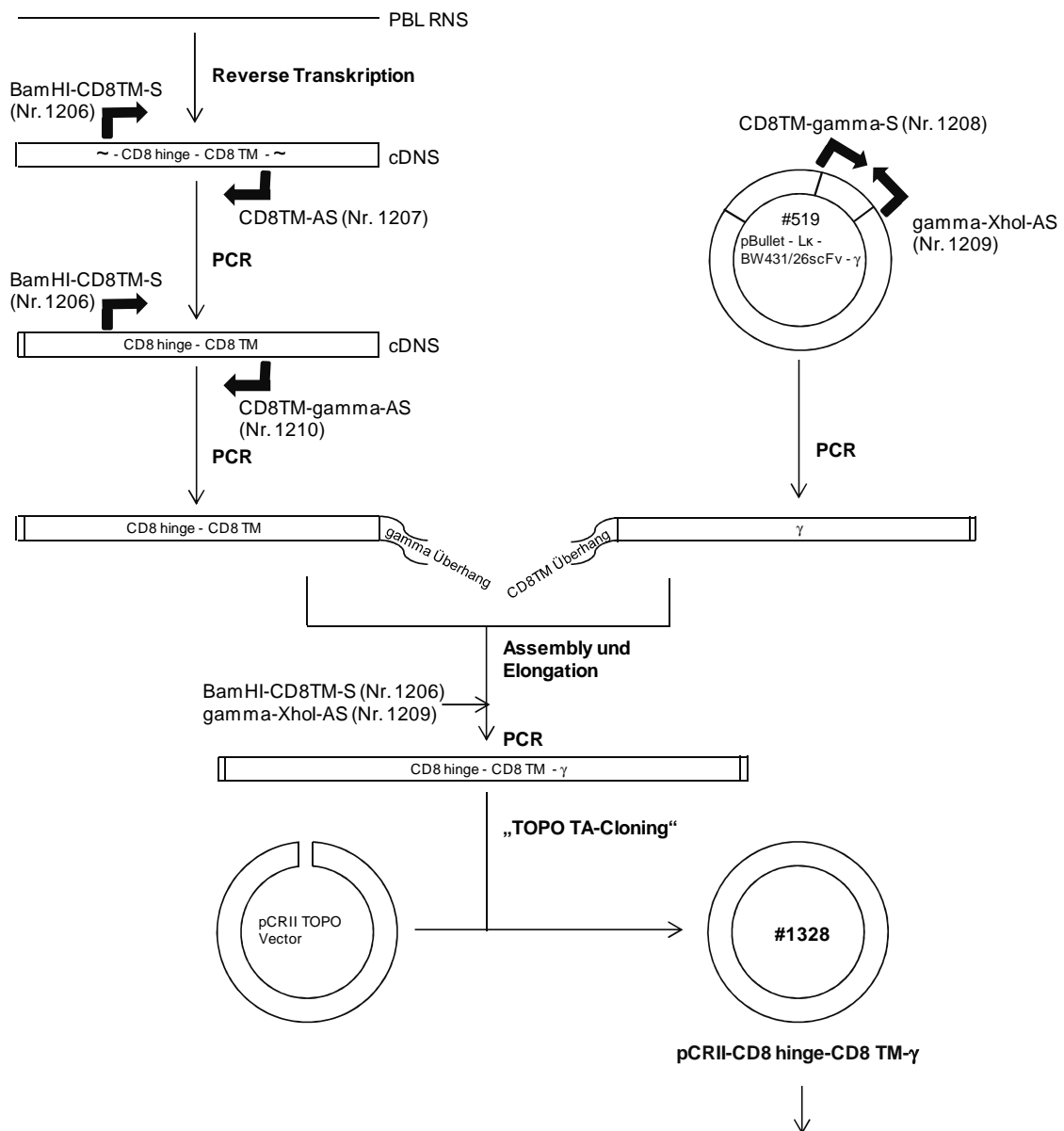
Abbildung 7: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette BW431/26scFv- γ -P2A-C6-B1D2scFv-Fc-CD28 für den #519 CAR und den #1213 CAR (#1246 CARs).

Die bicistronische Expressionskassette, die die DNS für den #519 CAR und den #1213 CAR enthält, wurde mit Hilfe eines Zwischenprodukts (Plasmid #1245) generiert. Die DNS des #519 CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26 und die humane Fc ϵ R1 γ Transmembran- und Signaldomäne. Die DNS des #1213 CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, die humane IgG₁-Fc Brückendomäne sowie die humane CD28 Transmembran- und Signaldomäne. Die DNS für den #519 CAR wurde aus dem Plasmid #519, die DNS für den #1213 CAR aus dem Plasmid #1213 mittels PCR amplifiziert. Bei dieser Reaktion wurde die DNS kodierend für das P2A Peptid angehängt. Nach Zusammenlagerung der DNS-Fragmente und Amplifikation mittels PCR wurde die bicistronische Expressionskassette mit Hilfe des „TA-Cloning“ in das linearisierte Plasmid pCR2.1 ligiert. Aus dem so entstandenen Plasmid #1245 wurde die für beide CARs kodierende DNS-Sequenz isoliert und in den Vektor pMP71 ligiert.

4.1.3 Klonierung des Plasmids pBullet-L κ -BW431/26scFv-CD8 hinge-CD8 TM- γ (#1331 CAR, C-CD8- γ)

Die kodierende Sequenz für die CD8 Domäne wurde aus humanen Lymphozyten isoliert, um eine Brückendomäne in den #519 CAR zu integrieren. Dazu wurde aus peripheren Blutlymphozyten RNS gewonnen, revers transkribiert und die CD8hinge-CD8TM cDNS zunächst mit Hilfe einer PCR und dem 5'-Oligonukleotid „BamHI-CD8TM-S“ (Nr. 1206) und dem 3'-Oligonukleotid „CD8TM-AS“ (Nr. 1207) amplifiziert (Abb. 8). In einem zweiten Schritt wurde eine PCR mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „BamHI-CD8TM-S“ (Nr. 1206) und des 3'-Oligonukleotids „CD8TM-gamma-AS“ (Nr. 1210) durchgeführt. Zur Isolation der γ Kette wurde das Plasmid #519 mit dem 5'-Oligonukleotid „CD8TM-gamma-S“ (Nr. 1208) und dem 3'-Oligonukleotid „gamma-XhoI-AS“ (Nr. 1209) amplifiziert. Die letzten beiden PCR Reaktionen fügten hybridisierende DNS Überhänge an, um die Anlagerung der CD8 hinge-CD8 TM mit der γ Ketten DNS zu erleichtern. Die neu generierte DNS-Sequenz wurde mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „BamHI-CD8TM-S“ (Nr. 1206) und des 3'-Oligonukleotids „gamma-XhoI-AS“ (Nr. 1209) amplifiziert. Diese Reaktion fügte zugleich am 5' Ende eine BamHI sowie am 3' Ende eine XhoI Schnittstelle an. Das PCR-Produkt wurde in den linearisierten Vektor pCRII TOPO ligiert. Im nächsten Schritt wurde aus dem neu generierten Plasmid #1328 das Insert durch die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI isoliert und in den ebenso gespaltenen pBullet Vektor #422 ligiert. Zur Generierung der Expressionskassette für den anti-CEA CAR mit der CD8 Brückendomäne und der γ Signalkette wurde das so entstandene Plasmid #1330 mit den Restriktionsenzymen

NcoI und BamHI gespalten. Zur Einfügung des L_K-BW431/26scFv DNS-Fragments wurde das Plasmid #607 mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten und das isolierte scFv Fragment mit der linearisierten pBullet-CD8 hinge-CD8 TM- γ Sequenz ligiert. Hiermit wurde das Plasmid #1331 erhalten, das für den CAR BW431/26scFv-CD8 hinge-CD8 TM- γ kodiert. Die Sequenz (siehe 6.1.3) wurde mittels der Oligonukleotide Nr. 51, 52 (siehe 2.7.2) verifiziert.



Fortsetzung nächste Seite

Abbildung 8

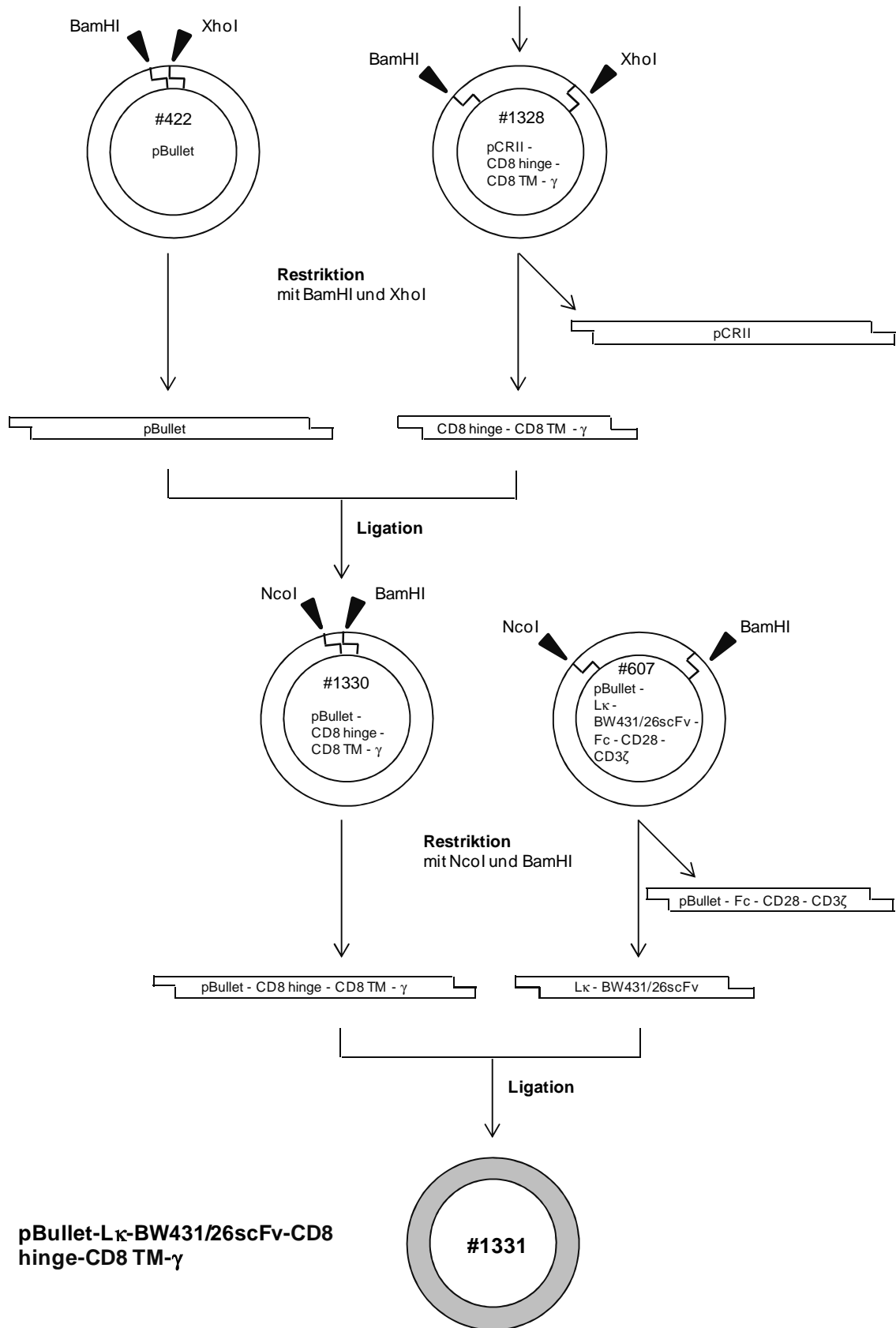


Abbildung 8

Abbildung 8: Klonierung der Expressionskassette für den CAR BW431/26scFv-CD8- γ (#1331 CAR).

Die Expressionskassette des #1331 CAR mit Einzelkettenbindedomäne des humanisierten CEA spezifischen Antikörpers BW431/26, humaner CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie humaner Fc ϵ R1 γ Signaldomäne wurde mit Hilfe zweier Zwischenprodukte (Plasmid #1328 und Plasmid #1330) generiert. Die DNS für die CD8 Brücken- und Transmembrandomäne wurde aus Blutlymphozyten mittels reverser Transkription (RT) und zwei PCR Schritten amplifiziert. Die DNS für die Fc ϵ R1 γ Signaldomäne wurde aus dem Plasmid #519 mittels PCR amplifiziert. Nach Zusammenlagerung der DNS-Fragmente und Amplifikation mittels PCR wurde die Expressionskassette für CD8 hinge-CD8 TM- γ mit Hilfe des „TOPO TA-Cloning“ in das linearisierte Plasmid pCRII TOPO ligiert. Aus dem neu generierten Plasmid #1328 wurde die Expressionskassette isoliert und in den Vektor pBullet (Plasmid #422) ligiert. Das so entstandene Plasmid pBullet-CD8 hinge-CD8 TM- γ (#1330) wurde durch Restriktion geöffnet und die aus dem Plasmid #607 isolierte Leader- und Bindedomänesequenz Lk-BW431/26scFv in das Plasmid #1330 inseriert.

4.1.4 Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344 CARs, C-CD8- γ -P2A-E-Fc-CD28)

Zur Generierung der bicistronischen Expressionkassette für den CAR BW431/26scFv-CD8- γ und den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28 wurde das L κ -BW431/26scFv-CD8- γ DNS-Fragment aus dem Plasmid #1331 mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „NotI-L κ -S“ (Nr. 527) und des 3'-Oligonukleotids „gamma-P2A-AS“ (Nr. 1205) amplifiziert (Abb. 9). Ebenso wurde das L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 DNS-Fragment aus dem Plasmid #1213 mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „P2A-L κ -S“ (Nr. 1204) und des 3'-Oligonukleotids „CD28-EcoRI-AS“ (Nr. 1203) vervielfältigt. Bei diesen Reaktionen wurden die Überhänge zur Generierung der P2A Sequenz angefügt. Zugleich wurde am 5' Ende eine NotI sowie am 3' Ende eine EcoRI Schnittstelle generiert. Nach Zusammenlagerung wurde das entstandene DNS-Fragment mit dem 5'-Oligonukleotid „NotI-L κ trunkiert-S“ (Nr. 1202) und dem 3'-Oligonukleotid „CD28-EcoRI-AS“ (Nr. 1203) amplifiziert und in den linearisierten pCR2.1 Vektor ligiert. Das Insert mit der kodierenden Sequenz für beide CARs wurde aus dem neu generierten Plasmid #1336 durch die Restriktionsenzyme NotI und EcoRI isoliert und zur Erzeugung des Plasmids pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344) in den ebenso gespaltenen Vektor pMP71 ligiert. Die Sequenz (siehe 6.1.4) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Nr. 76, 77, 78, 127, 128, 144, 282, 285, 617, 824 (siehe 2.7.2) verifiziert.

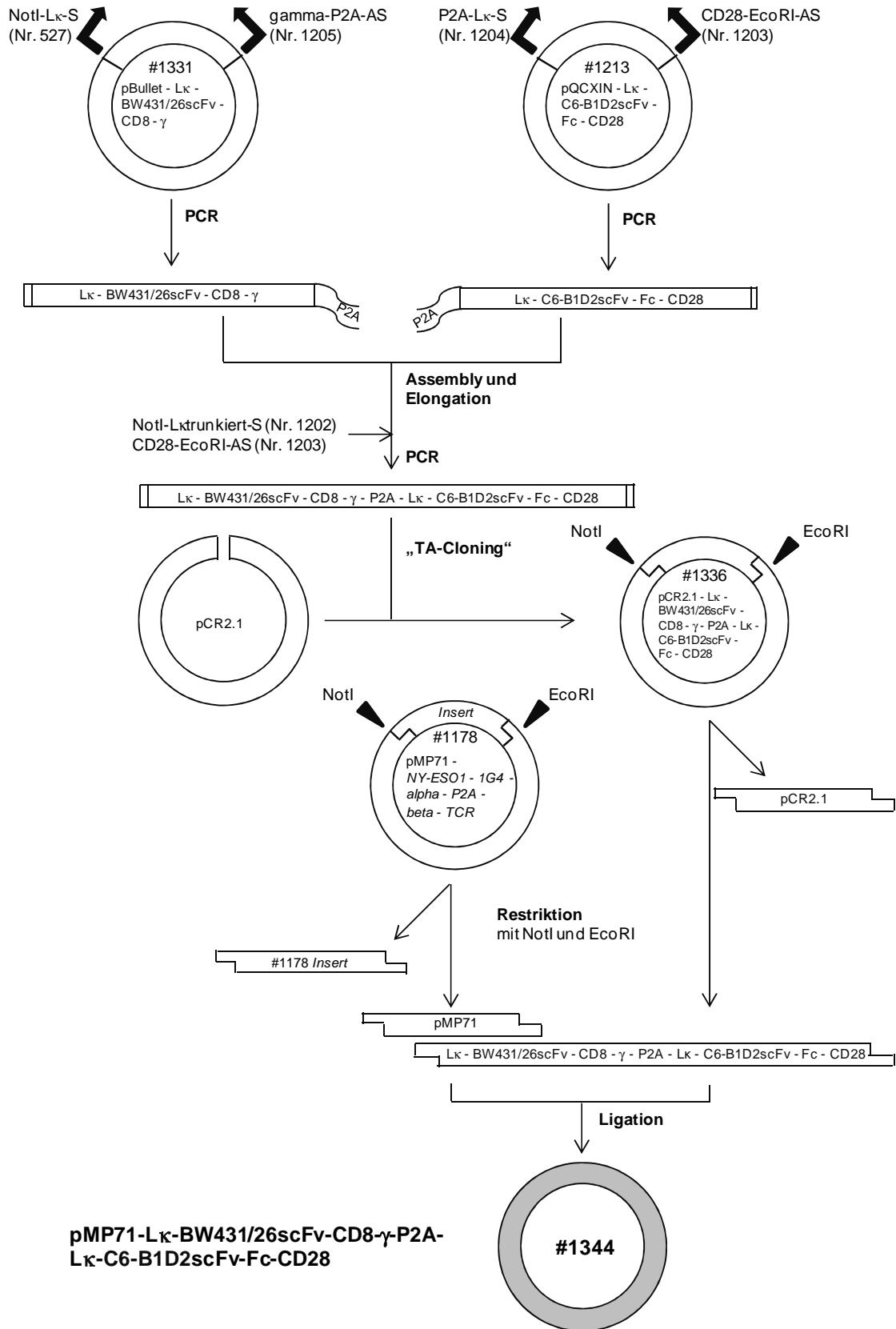


Abbildung 9

Abbildung 9: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-C6-B1D2scFv-Fc-CD28 für den #1331 CAR und den #1213 CAR (#1344 CARs).

Die bicistronische Expressionskassette, die die DNS für den #1331 CAR und den #1213 CAR enthält, wurde mit Hilfe eines Zwischenprodukts (Plasmid #1336) generiert. Die DNS des #1331 CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des humanisierten anti-CEA Antikörpers BW431/26, die humane CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie die humane Fc ϵ R1 γ Signaldomäne. Die DNS des #1213 CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des anti-human ErbB2 Maus-Antikörpers C6-B1D2, die humane IgG₁-Fc Brückendomäne sowie die humane CD28 Transmembran- und Signaldomäne. Die DNS für den #1331 CAR wurde aus dem Plasmid #1331, die DNS für den #1213 CAR aus dem Plasmid #1213 mittels PCR amplifiziert. Bei dieser Reaktion wurde die DNS kodierend für das P2A Peptid angehängt. Nach Zusammenlagerung der DNS-Fragmente und Amplifikation mittels PCR wurde die bicistronische Expressionskassette mit Hilfe des „TA-Cloning“ in das linearisierte Plasmid pCR2.1 ligiert. Aus dem so entstandenen Plasmid #1336 wurde die für beide CARs kodierende DNS-Sequenz isoliert und in den Vektor pMP71 ligiert.

4.2 Die CARs werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert

Das Ziel ist die Koexpression der anti-ErbB2 und anti-CEA CARs auf der Oberfläche derselben T-Zelle. Zunächst wurden die CARs auf Zellen der Linie 293T nach Transfektion exprimiert (Abb. 10, obere Zeile). Modifikation der 293T Zellen mit der bicistronischen Expressionskassette #1246 oder #1344 führt zur Expression beider CARs. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt die Koexpression des Primärsignalgebers #519 oder #1331 zusammen mit dem kostimulatorischen Rezeptor #1213, erkenntlich als „winkelhalbierende“ Population in der Dot Plot Auftragung der Messwerte. Die Expression der einzelnen CARs #519, #1331 und #1213 wurde ebenfalls verifiziert. Dabei ist der anti-CEA CAR #1331, der aus dem #519 CAR durch Einfügen einer CD8 Domäne entstanden ist, höher auf der Oberfläche der 293T Zellen exprimiert als der #519 CAR. Zur Expression der CARs auf T-Zellen wurden die Konstrukte retroviral transduziert (Abb. 10, untere Zeile). Der anti-CEA CAR #1331 mit CD8 Domäne zeigt auch hier eine höhere Anzahl CAR Moleküle pro Zelle als der anti-CEA CAR #519 ohne Brückendomäne. Bei Koexpression der CARs in T-Zellen ist die Expression der Primärsignalgeber #519 und #1331 überraschenderweise geringer als die Expression des kostimulatorischen CAR #1213. Der anti-CEA CAR #1331 ist auch in der bicistronischen Expressionskassette #1344 höher exprimiert als der anti-CEA CAR #519 in der bicistronischen Expressionskassette #1246. Der kostimulatorische #1213 CAR weist sowohl als einzelner Rezeptor als auch bei Koexpression mit dem anti-CEA CAR #519 oder #1331 ein annähernd gleiches Expressionsniveau auf.

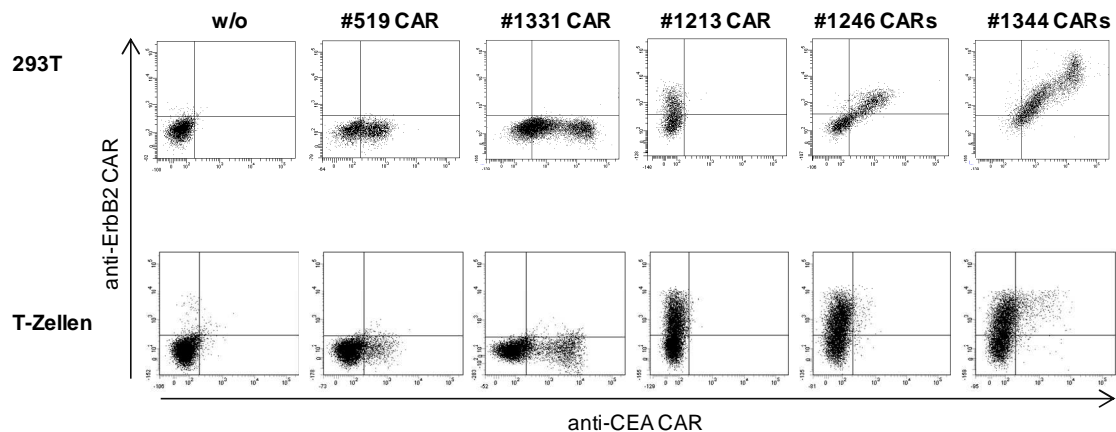


Abbildung 10: Die CARs werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert.

Zellen der Linie 293T wurden mit DNS transfiziert, die für den jeweiligen CAR kodiert. Des Weiteren wurden T-Zellen mittels retroviralen Gentransfers mit CARs unterschiedlicher modularer Komposition ausgestattet. Zum Nachweis des anti-CEA CAR wurden die Zellen mit dem anti-idiotypischen BW2064/36 Maus-Antikörper und dem anti-Maus IgG₁-FITC Antikörper inkubiert. Der anti-ErbB2 CAR wurde durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-human IgG Antikörper nachgewiesen. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch einen APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper identifiziert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte T-Zellen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch.

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C- γ
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.3 Die Effizienz der CAR-vermittelten Aktivierung ist abhängig von der Voraktivierung der T-Zelle

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Bedingungen für die T-Zell Aktivierung vor Transduktion evaluiert. Dazu wurden T-Zellen mit Kombinationen agonistischer anti-CD3/anti-CD28 Antikörper und IL-2 aktiviert. Anschließend wurden die voraktivierten T-Zellen zur Expression des #607 CAR retroviral transduziert. Der #607 CAR ist für diese Untersuchung besonders geeignet, da er als Rezeptor der zweiten Generation das Primärsignal der CD3 ζ Kette mit der CD28 Kostimulation kombiniert. Die aktivierten CAR T-Zellen wurden mit CEA⁺ ErbB2⁺ Maus Tumorzellen C15A3.C2R.A7 inkubiert und die CAR-vermittelte Aktivierung anhand der IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abb. 11A). Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung mit anti-CD3, anti-CD28 Antikörper und IL-2 effizienter ist als die Aktivierung mit anti-CD3 Antikörper und IL-2 oder anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern.

Als Kontrolle dienten CEA⁻ ErbB2⁻ Maus Tumorzellen MC38, die die parentalen Zellen der Linie C15A3 sind. Die Koinkubation der MC38 Zellen mit CAR T-Zellen führte zu keiner Aktivierung. Die Situation wurde anhand der humanen Tumorzelllinie CEA⁺ ErbB2⁺ LS174T überprüft (Abb. 11B). Auch hier erwies sich die Voraktivierung mit anti-CD3, anti-CD28 Antikörper und IL-2 als effizienter als die Aktivierung mit anti-CD3 Antikörper und IL-2 oder anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Bei allen Versuchsansätzen führte die Inkubation der T-Zellen ohne CAR als Kontrolle zu keiner Aktivierung über Hintergrund.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Effizienz der CAR-vermittelten Aktivierung von der T-Zell Aktivierung vor Transduktion abhängig ist. Die Aktivierung mit dem anti-CD3, anti-CD28 Antikörper und IL-2 ist effizienter als die Aktivierung mit dem anti-CD3 Antikörper und IL-2 oder dem anti-CD3 und dem anti-CD28 Antikörper. In allen weiteren Versuchen wurden die T-Zellen deshalb mit der Dreifachkombination aktiviert.

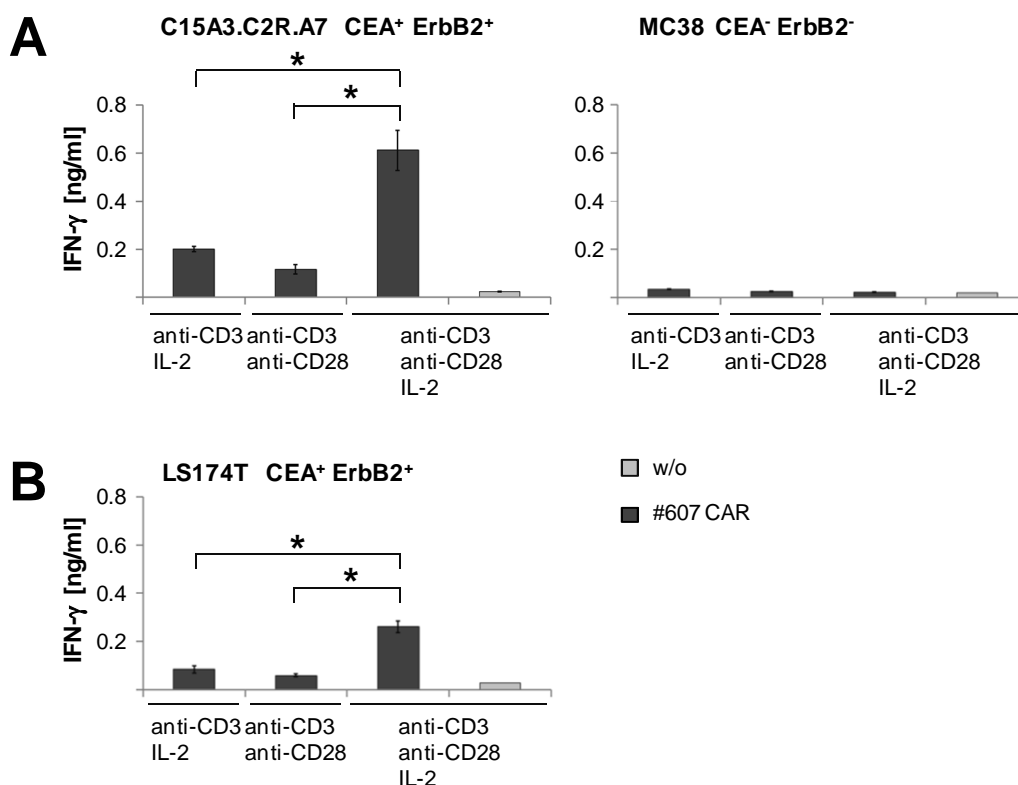


Abbildung 11: Die Effizienz der CAR-vermittelten Aktivierung ist abhängig von der Voraktivierung der T-Zelle.

T-Zellen wurden mit dem anti-CD3 Antikörper OKT3 (100 ng/ml) und IL-2 (1.000 U/ml), OKT3 (400 ng/ml) und anti-CD28 Antikörper 15E8 (50 ng/ml) oder OKT3 (200 ng/ml), 15E8 (50 ng/ml)

und IL-2 (1.000 U/ml) voraktiviert (7 Tage). Anschließend wurden die T-Zellen zur Expression des #607 CAR transduziert. **(A)** Die voraktivierten CAR T-Zellen (1×10^4 Effektorzellen pro Vertiefung) wurden 48 h mit CEA⁺ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 oder CEA⁺ErbB2⁺ MC38 Tumorzellen (je 1×10^4 Zellen pro Vertiefung) inkubiert. In **(B)** wurden die CAR T-Zellen weitere 48 h in Gegenwart von IL-2 (100 U/ml) inkubiert und anschließend $2,5 \times 10^3$ Effektorzellen pro Vertiefung 48 h mit CEA⁺ErbB2⁺ LS174T Tumorzellen (1×10^4 Zellen pro Vertiefung) inkubiert. Als Kontrollen dienten Koinkubationen mit nicht-modifizierten T-Zellen, die mit OKT3 (200 ng/ml), 15E8 (50 ng/ml) und IL-2 (1.000 U/ml) voraktiviert wurden. Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM dar. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (* $p < 0,05$).

w/o, ohne („without“) CAR
#607 CAR, C-Fc-CD28-CD3 ζ

4.4 Der CAR vermittelt eine Ligand-abhängige Aktivierung der T-Zelle

Es wurde untersucht, ob die jeweiligen CAR T-Zellen spezifisch durch Bindung an den Liganden aktiviert werden. Dazu wurden T-Zellen mit anti-CEA CAR #1331 auf Platten mit immobilisiertem CEA Protein oder dem Antikörper BW2064/36 inkubiert und die T-Zell Aktivierung anhand der IFN- γ Freisetzung bestimmt (Abb. 12A). Der Antikörper BW2064/36 ist ein idiotypischer Antikörper mit Spezifität für die anti-CEA scFv Domäne des CAR. Als Kontrolle diente die Beschichtung mit Maus IgG, einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps wie der BW2064/36 Antikörper. Die #1331 CAR T-Zellen wurden spezifisch durch Bindung an CEA Protein wie auch an den BW2064/36 Antikörper aktiviert, während die Inkubation mit immobilisiertem Maus IgG zu keiner T-Zell Aktivierung über Hintergrund führte. Die jeweiligen Inkubationen nicht-modifizierter T-Zellen führten zu keiner spezifischen Aktivierung. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde fortan der BW2064/36 Antikörper als technisches Surrogat anstelle des CEA Proteins verwendet.

T-Zellen wurden mit der monocistronischen Expressionskassette für den anti-CEA CAR (#519 CAR oder #1331 CAR) oder der bicistronischen Expressionskassette für die Koexpression des anti-CEA CAR und anti-ErbB2 CAR (#1246 CARs oder #1344 CARs) ausgestattet. Nach Inkubation mit immobilisiertem BW2064/36 Antikörper wurden die anti-CEA CARs #519 und #1331 sowohl im mono- als auch im bicistronischen Format spezifisch über ihren Liganden aktiviert (Abb. 12B). Als Kontrolle diente die Inkubation der CAR T-Zellen mit den immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern, die zu einer vom CAR unabhängigen T-Zell Aktivierung durch den endogenen TCR und CD28 führte. Als Kontrolle diente weiterhin die Inkubation mit

dem irrelevanten Antikörper Maus IgG. T-Zellen ohne CAR als Kontrolle ließen sich nur durch die agonistischen anti-CD3/anti-CD28 Antikörper aktivieren, nicht jedoch durch den CAR spezifischen Antikörper BW2064/36.

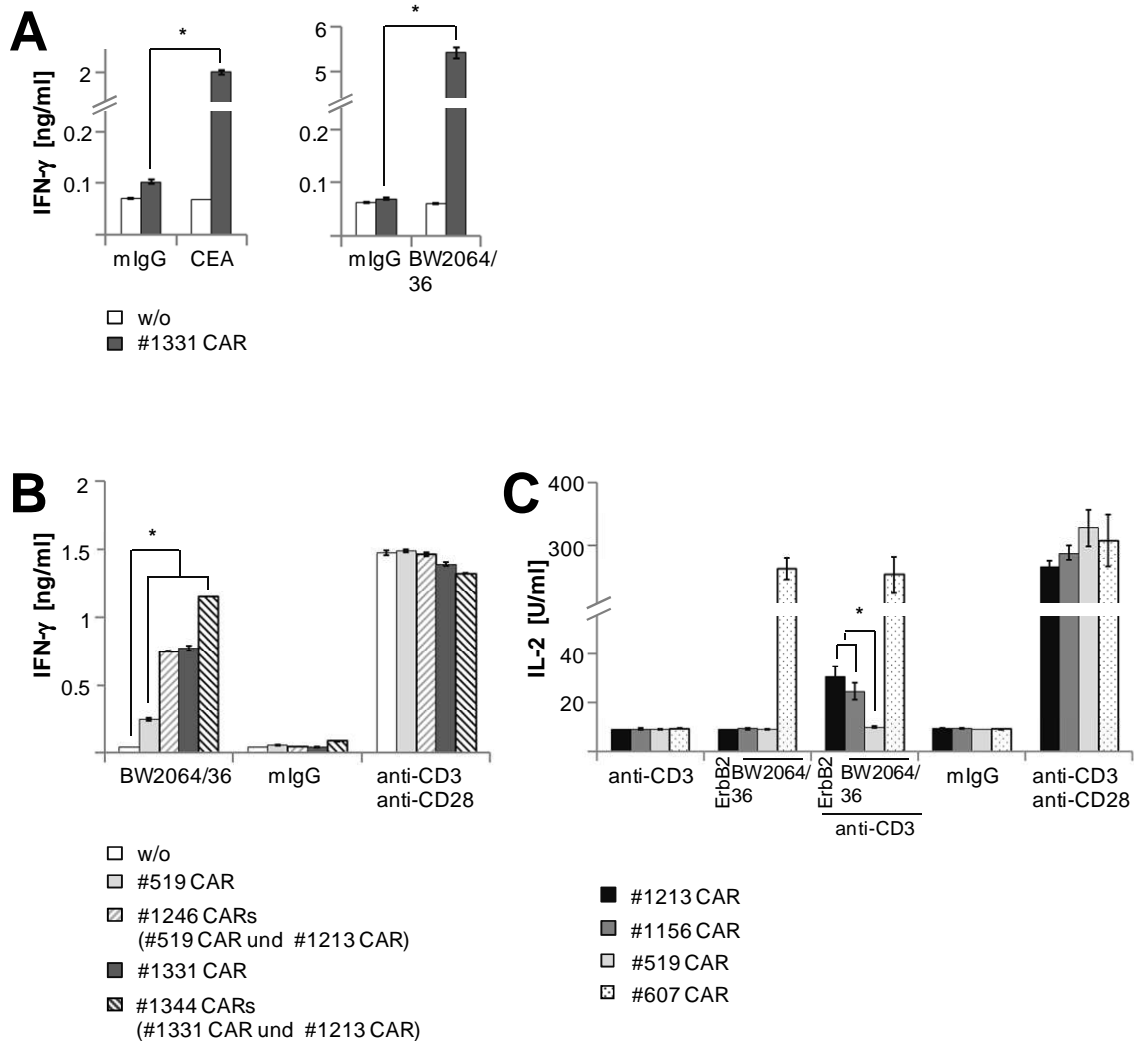


Abbildung 12: Der CAR vermittelt eine Ligand-abhängige Aktivierung der T-Zelle.

(A) Der #1331 CAR wurde in T-Zellen exprimiert und pro Vertiefung 3×10^4 CAR T-Zellen mit immobilisiertem CEA (Beschichtungskonzentration $10 \mu\text{g/ml}$), BW2064/36 ($5 \mu\text{g/ml}$) oder zur Kontrolle mit Maus IgG (mIgG) ($1 \mu\text{g/ml}$) mindestens 48 h inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. (B) T-Zellen wurden zur Expression des #519 CAR oder des #1331 CAR transduziert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder durch Transduktion des Vektors #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 ($5 \mu\text{g/ml}$) oder zur Kontrolle mit mIgG ($1 \mu\text{g/ml}$) oder anti-CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 Antikörper ($5 \mu\text{g/ml}$) beschichtet. Pro Vertiefung wurden 3×10^4 CAR T-Zellen für 72 h inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. (C) T-Zellen wurden zur Expression des #1213, #1156, #519 oder #607 CAR transduziert. Die Inkubation (1×10^4 CAR

T-Zellen pro Vertiefung) erfolgte 72 h mit immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (Beschichtungskonzentration 1 µg/ml), BW2064/36 (5 µg/ml), ErbB2 (1 µg/ml), anti-CD3 Antikörper (1 µg/ml) und BW2064/36 (5 µg/ml) oder anti-CD3 Antikörper (1 µg/ml) und ErbB2 (1 µg/ml). Als Kontrollen dienten Beschichtungen mit mIgG (1 µg/ml) oder anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 Antikörper (5 µg/ml).

Bei allen Ansätzen wurde die IFN- γ Konzentration (A, B) oder die IL-2 Konzentration (C) in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. * $p < 0,05$ (T-Test)

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C- γ
 #607 CAR, C-Fc-CD28-CD3 ζ
 #1156 CAR, C-Fc-CD28
 #1213 CAR, C-Fc-CD28
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Der anti-ErbB2 CAR #1213 weist als Signaldomäne nur die kostimulatorische Domäne CD28 auf, die ohne Primärsignal zu keiner T-Zell Aktivierung führt. Um die Funktionalität der CD28 Domäne im Kontext des primären Signals zu prüfen, wurde die IL-2 Sekretion als Indikator verwendet. Dabei wurde das primäre Signal durch die Inkubation mit immobilisiertem anti-CD3 Antikörper geliefert. Die Inkubation mit immobilisiertem anti-CD3 Antikörper oder die Inkubation mit dem spezifischen Liganden ErbB2 führten bei dem #1213 CAR zu keiner IL-2 Sekretion über Hintergrund (Abb. 12C). Dagegen zeigten #1213 CAR T-Zellen eine IL-2 Sekretion, wenn zusätzlich zu der Aktivierung durch ErbB2 das Primärsignal mittels Aktivierung des endogenen TCR durch Inkubation mit immobilisiertem anti-CD3 Antikörper geliefert wurde. Als Vergleichsrezeptor diente #1156, der anstelle der ErbB2 eine CEA-spezifische Bindedomäne hat und ebenfalls die kostimulatorische CD28 Domäne aufweist. Dieser CAR zeigte ebenfalls nur nach Inkubation mit dem spezifischen Liganden BW2064/36 und anti-CD3 Antikörper eine IL-2 Sekretion, jedoch nicht nach Inkubation mit dem BW2064/36 oder anti-CD3 Antikörper allein. Der #519 CAR hat eine CEA Bindedomäne und keine kostimulatorische Domäne. Hier zeigte sich weder bei der Inkubation mit dem anti-CD3 Antikörper noch mit dem spezifischen CAR Liganden noch bei der Inkubation mit beiden Antikörpern eine IL-2 Sekretion. Der #607 CAR hat eine CEA Bindedomäne; die CD3 ζ Signaldomäne ist mit der kostimulatorischen CD28 Domäne in einer Kette fusioniert. Die Aktivierung durch den spezifischen CAR Liganden allein führte zu einer IL-2 Sekretion, ebenso wie die Inkubation mit dem spezifischen CAR Liganden und anti-CD3 Antikörper. Als weitere Kontrolle diente die Inkubation mit Maus IgG, die bei keinem Rezeptor eine Aktivierung induzierte. Die jeweiligen CAR T-Zellen sezernierten IL-2, wenn sie mit den immobilisierten

Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 inkubiert wurden, die der T-Zelle sowohl das Primärsignal als auch das kostimulatorische Signal durch den nativen TCR-Komplex und unabhängig vom CAR liefern.

Die Untersuchungen belegen, dass sich die CAR T-Zellen spezifisch durch ihren CAR Liganden aktivieren lassen. Bei T-Zellen mit #1213 CAR führt die Aktivierung der CD28 Domäne durch den Liganden ErbB2 nur in Kombination mit einem Primärsignal zu einer IL-2 Sekretion.

4.5 Die CD8 Brückendomäne erhöht die Anzahl der γ CAR Moleküle bei Erhalt der Funktionalität

Es wurde wiederholt beobachtet, dass der anti-CEA- γ CAR #519 eine geringere Expression im Vergleich zu dem anti-ErbB2-Fc-CD28 CAR #1213 hat (vgl. Abb 10). Durch einen veränderten CAR Aufbau sollte die Anzahl der anti-CEA CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche erhöht werden. Dies wurde durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne zwischen scFv und γ Signalkette erreicht. Auf diese Weise wurde der #1331 CAR aus dem #519 CAR durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne und der CD8 Transmembrandomäne generiert. Die T-Zellen mit hoher #519 CAR Expression wurden durch MACS Trennung isoliert (Abb. 13A). Allerdings zeigte sich, dass der #519 CAR einen Tag nach MACS Anreicherung auf einem ähnlichen Niveau exprimiert war wie vor MACS Trennung. Im Vergleich dazu zeigten #1331 CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne eine CAR Expression, die auch nach sieben Tagen Inkubation auf gleichem Niveau war.

Die Expression der anti-CEA CARs #519 und #1331 ist darüber hinaus abhängig vom T-Zell Spender (Abb. 13B). Es wurden die T-Zellen mit der schwächeren CAR Expression verwendet und auf immobilisiertem BW2064/36 inkubiert. Die #519 CAR T-Zellen von Spender 2 und die #1331 CAR T-Zellen von Spender 4 ließen sich spezifisch durch ihren Liganden aktivieren. Die #519 CAR T-Zellen induzierten trotz schwacher CAR Expression die Sekretion von IFN- γ .

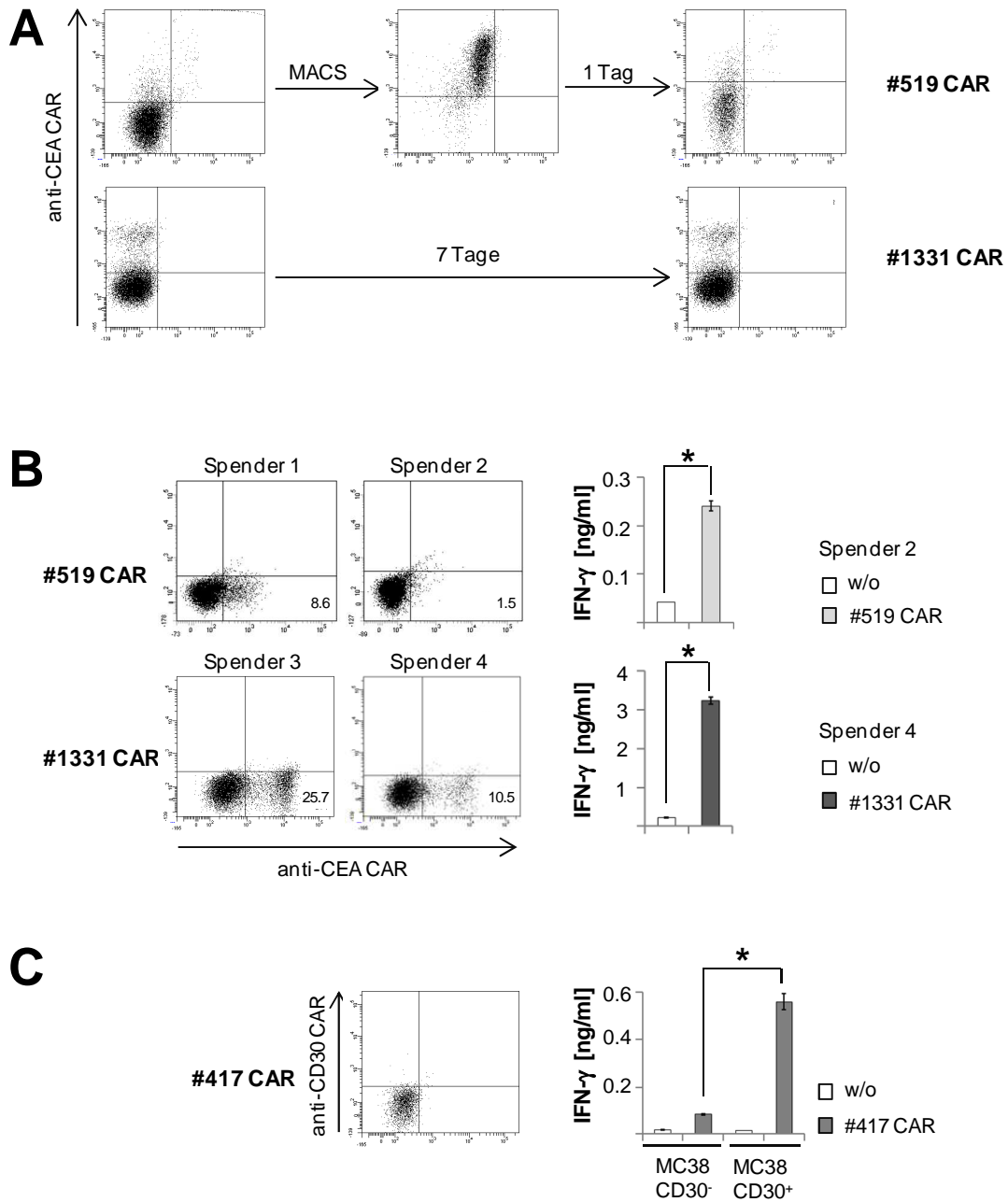


Abbildung 13: Die CD8 Brückendomäne erhöht die Anzahl der γ CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche bei Erhalt der Funktionalität.

(A) T-Zellen wurden zur Expression des #519 CAR transduziert. T-Zellen mit #519 CAR wurden mittels MACS Trennung angereichert und einen Tag kultiviert. Die anti-CEA CAR Expression wurde vor, unmittelbar nach und einen Tag nach der MACS Trennung mittels FACS analysiert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit dem #1331 CAR ausgestattet und der CAR nach der Transduktion und nach sieben Tagen Kultivierung nachgewiesen. Beide CARs haben die BW431/26scFv Bindestelle und wurden mit dem anti-idiotypischen BW2064/36 Maus-Antikörper und dem anti-Maus IgG₁-FITC Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. Die Gates wurden bei den jeweiligen Messungen an die gefärbten, nicht-transduzierten T-Zellen angepasst. (B) T-Zellen verschiedener Spender wurden mit dem #519 CAR oder dem #1331 CAR ausgestattet und die CAR Expression durch Färbung mit dem anti-idiotypischen BW2064/36 Antikörper und dem sekundären anti-Maus IgG₁-FITC Antikörper durchfluss-

zytometrisch nachgewiesen. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 (5 µg/ml) beschichtet, der an die scFv Domäne beider CARs bindet. Pro Vertiefung wurden 3×10^4 #519 CAR T-Zellen von Spender 2 für 72 h inkubiert (Daten aus Abb. 12B). T-Zellen von Spender 4 (2×10^4 #1331 CAR T-Zellen pro Vertiefung) wurden 72 h inkubiert. Die Zahlen in den Dot Plots stellen die prozentualen Anteile CAR positiver T-Zellen von der Gesamtzellzahl dar. (C) T-Zellen wurden zur Expression des #417 CAR transduziert und der CAR durch Inkubation mit dem anti-idiotypischen 9G10 Antikörper und dem sekundären anti-Maus IgG₁-PE Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. Pro Vertiefung wurden $7,4 \times 10^4$ T-Zellen 48 h mit den Maus Tumorzelllinien CD30⁺ MC38 oder CD30⁻ MC38 (je 1×10^4 Zellen pro Vertiefung) inkubiert.

Bei allen Ansätzen wurde die IFN-γ Konzentration (B, C) in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte von mindestens Triplikaten ± SEM. *p < 0,05 (T-Test)

w/o, ohne („without“) CAR
 #417 CAR, CD30-γ
 #519 CAR, C-γ
 #1331 CAR, C-CD8-γ

Um zu überprüfen, ob die schwache Expression eine Besonderheit des #519 CAR ist, wurde diese Beobachtung bei einem CAR gleichen Aufbaus mit anderer Bindedomäne überprüft. Dazu wurden T-Zellen mit dem anti-CD30-γ CAR #417 ausgestattet. Hier zeigte sich ebenfalls eine geringe Anzahl CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche (Abb. 13C). Zur Überprüfung der CAR-vermittelten T-Zell Aktivierung wurden CAR T-Zellen mit CD30⁺ oder CD30⁻ MC38 Tumorzellen inkubiert und die Aktivierung anhand der IFN-γ Konzentration bestimmt. Die #417 CAR T-Zellen wurden spezifisch durch ihren Liganden aktiviert, während T-Zellen ohne CAR keine Aktivierung über Hintergrund zeigten.

Durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne wurde die Expression des anti-CEA CAR auf einem höheren Niveau nachweislich stabilisiert. Sowohl der #519 CAR ohne CD8 Brückendomäne als auch der #1331 CAR mit CD8 Brückendomäne induzieren eine Ligand-abhängige IFN-γ Sekretion. Die schwache Expression des anti-CEA CAR #519 ist eine Eigenschaft der scFv-γ Rezeptoren, die keine Brückendomäne aufweisen.

4.6 Der γ CAR und der CD28 CAR bilden nicht-kovalente Heterodimere

Es wurde untersucht, ob die koexprimierten CAR Moleküle Heterodimere ausbilden. Dazu wurden der anti-CEA CAR #1331 und der anti-ErbB2 CAR #1213 (#1344 CARs) in T-Zellen koexprimiert und der anti-CEA CAR durch Bindung an den anti-CEA CAR

Liganden immobilisiert. Der kopräzipitierte anti-ErbB2 CAR wurde hinsichtlich seiner kovalenten oder nicht-kovalenten Interaktion unter verschiedenen Salzbedingungen geprüft. Eine kovalente Interaktion sollte unter Salzkonzentrationen $> 1 \text{ M Na}^+$ stabil sein, wohingegen nicht-kovalente Interaktionen getrennt werden. Als Vergleich wurden T-Zellen mit dem Vektor #1262 transduziert, der für den anti-ErbB2-Fc-CD3 ζ (#710 CAR) und anti-CEA-Fc-CD28 CAR (#1156 CAR) kodiert. Bei dieser Konfiguration bilden die Rezeptoren Disulfidbrücken über die Cysteinreste in den Fc Brückendomänen aus. Entsprechend wurden die Heterodimere der Fc-Fc Konfiguration (#1262 CARs) in Gegenwart einer Salzkonzentration von $1,5 \text{ M Na}^+$ nicht getrennt (Abb. 14).

Die koexprimierten Rezeptoren der CD8-Fc Konfiguration (#1344 CARs) wurden bei einer Salzkonzentration von $0,1 \text{ M Na}^+$ kopräzipitiert, was auf Heterodimere hinweist. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf $1,5 \text{ M Na}^+$ wurden die koexprimierten CARs nicht kopräzipitiert. Wir schließen daraus, dass der γ CAR und der CD28 CAR nicht-kovalente Heterodimere bilden.

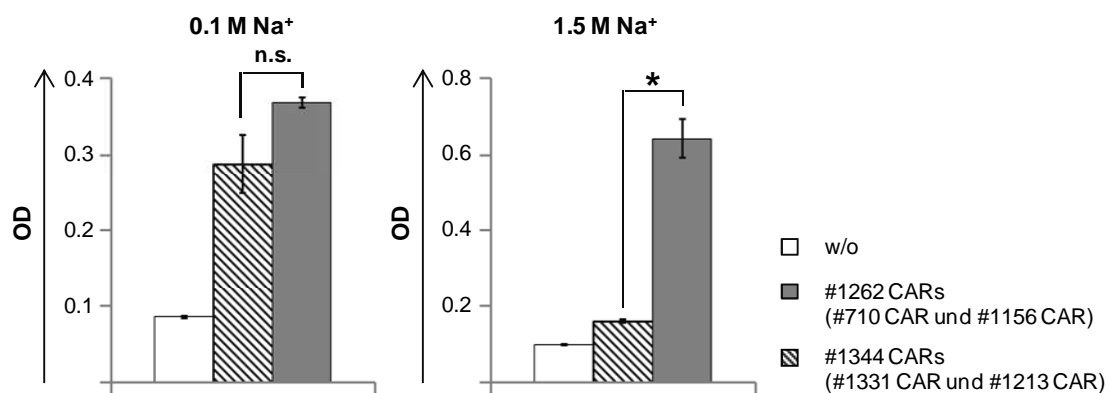


Abbildung 14: Der γ CAR und der CD28 CAR bilden nicht-kovalente Heterodimere.

T-Zellen wurden zur Koexpression von zwei CARs transduziert. Die Transduktion erfolgte mit dem Vektor #1262, der für den #710 CAR und den #1156 CAR kodiert, oder mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Anschließend wurden 1×10^6 CAR T-Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von $0,1 \text{ M Na}^+$ oder $1,5 \text{ M Na}^+$ lysiert. Die Lysate wurden auf Mikrotiterplatten inkubiert, die mit dem BW2064/36 Antikörper ($5 \mu\text{g/ml}$, „Fang-Antikörper“) beschichtet waren. Das Heterodimer, dessen anti-CEA CAR an den „Fang-Antikörper“ gebunden hat, wurde über den anti-ErbB2 CAR mit Hilfe des Fusionsproteins ErbB2-eGFP ($200 \mu\text{l}$ Kulturüberstände), das an den anti-ErbB2scFv bindet, detektiert. Das Fusionsprotein wurde mit dem biotinylierten, GFP-spezifischen Antikörper (1:32.000), Streptavidin-POD (1:10.000) und ABTS (1 mg/ml) nachgewiesen. Als Kontrolle dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Abgebildet sind Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. * $p < 0,05$ (T-Test), n.s., nicht signifikant

w/o, ohne („without“) CAR
#1262 CARs, E-Fc-CD3 ζ (#710 CAR) und C-Fc-CD28 (#1156 CAR)
#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.7 Nach primärer CD3/CD28 TCR Stimulation lassen sich T-Zellen mit ζ oder kombiniertem CD28- ζ Signal bevorzugt nach Inkubation mit niedriger IL-2 Konzentration restimulieren

Es wurde die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht. Dazu wurden T-Zellen mit dem anti-CEA-Fc-CD3 ζ CAR #700 der ersten Generation oder dem anti-CEA-Fc-CD28-CD3 ζ CAR #607 der zweiten Generation ausgestattet und die jeweiligen CAR T-Zellen einen Tag nach Transduktion ohne IL-2 oder vier Tage mit 100 U/ml IL-2 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Koinkubation mit CEA⁺ ErbB2⁺ Maus Tumorzellen C15A3.C2R.A7 oder mit CEA⁺ ErbB2⁺ humanen Tumorzellen LS174T. Es zeigte sich, dass sowohl die Zytokin-Sekretion als auch die zytolytische Aktivität der CAR T-Zellen erhöht sind, wenn die CAR T-Zellen nach Transduktion vier Tage bei geringer IL-2 Konzentration inkubiert wurden im Vergleich zu der Inkubation für einen Tag ohne IL-2 (Abb. 15). Hierbei wurde beobachtet, dass der #607 CAR mit zusätzlicher Kostimulation eine höhere konzentrationsabhängige IFN- γ Sekretion aufwies als der #700 CAR ohne kostimulatorischer Domäne. Die konzentrationsabhängige zytolytische Aktivität beider T-Zellen mit CARs ist hingegen ähnlich. Als Kontrolle dienten CEA⁻ ErbB2⁻ Maus Tumorzellen MC38, die die parentalen Zellen der Linie C15A3 sind. Die Koinkubation der MC38 Tumorzellen mit CAR T-Zellen führte zu keiner Aktivierung oder zytolytischen Aktivität über Hintergrund. T-Zellen ohne CAR dienten als weitere Kontrolle und zeigten keine spezifische Aktivierung oder zytolytische Aktivität.

Wir schließen daraus, dass sich T-Zellen mit ζ oder kombiniertem CD28- ζ Signal nach primärer CD3/CD28 TCR Stimulation erst nach längerer Inkubation in Gegenwart niedriger IL-2 Konzentration restimulieren lassen.

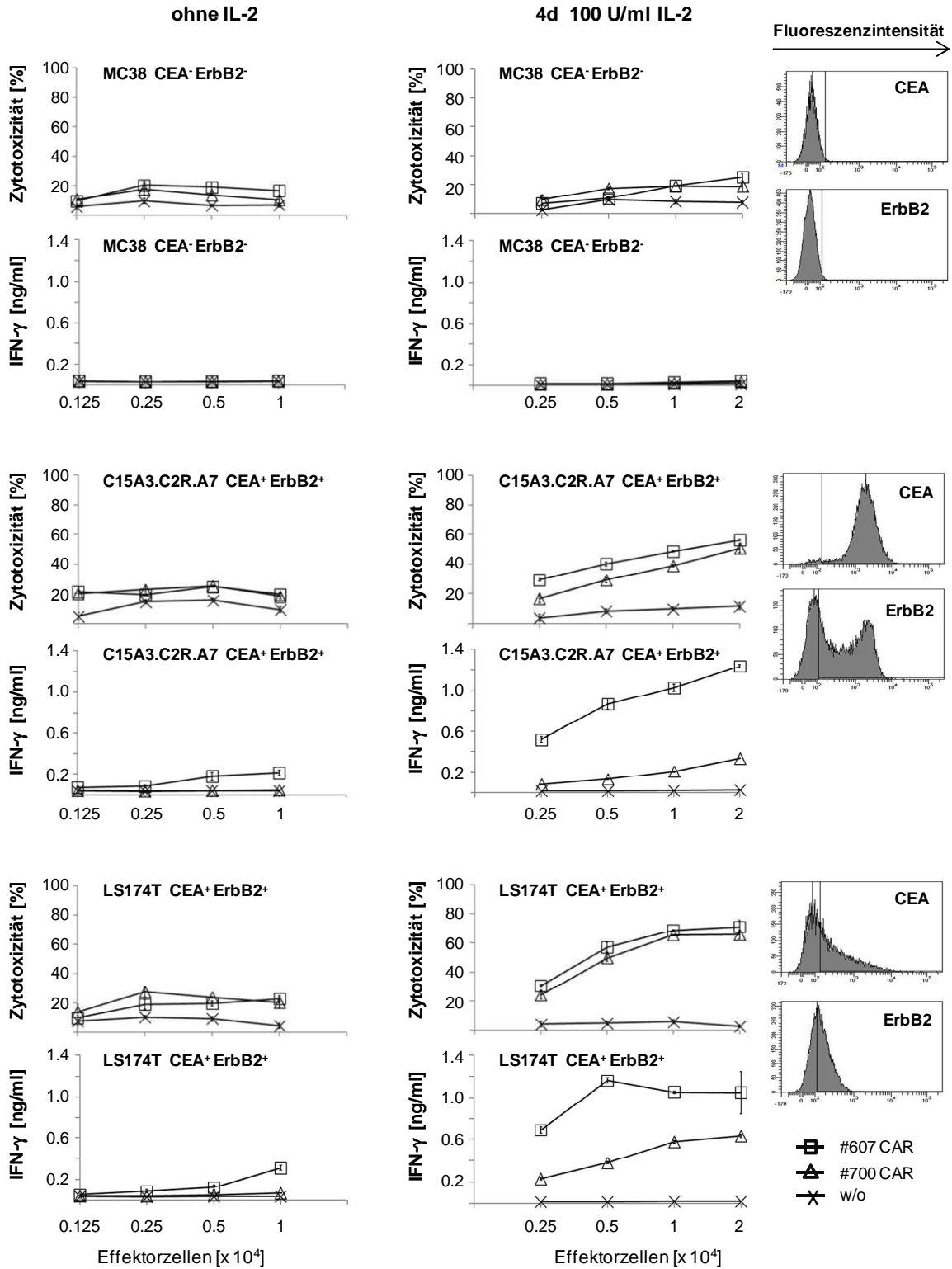


Abbildung 15

Abbildung 15: Nach primärer CD3/CD28 TCR Stimulation lassen sich T-Zellen mit ζ oder kombiniertem CD28- ζ Signal bevorzugt nach Inkubation mit niedriger IL-2 Konzentration restimulieren.

T-Zellen wurden zur Expression des #607 CAR oder #700 CAR transduziert und anschließend 24 h in Medium ohne IL-2 inkubiert. Der Ansatz wurde in zwei Teile geteilt. Ein Teil CAR T-Zellen ($0,125-1 \times 10^4$ Effektorzellen pro Vertiefung) wurde 48 h mit CEA⁻ ErbB2⁻ MC38, CEA⁺ ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 oder CEA⁺ ErbB2⁺ LS174T Tumorzellen (je $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung) inkubiert (linke Spalte). Die restlichen CAR T-Zellen wurden weitere 72 h in Gegenwart von IL-2 (100 U/ml) inkubiert und anschließend $0,25-2 \times 10^4$ Effektorzellen pro Vertiefung 48 h mit CEA⁻ ErbB2⁻ MC38, CEA⁺ ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 oder CEA⁺ ErbB2⁺ LS174T Tumorzellen (je 2×10^4 Zellen pro Vertiefung) inkubiert (rechte Spalte). Die Koinkubation der nicht-modifizierten T-Zellen mit den jeweiligen Tumorzellen diente bei beiden Ansätzen als Kontrolle. Die Zytotoxizität der CAR T-Zellen gegenüber Tumorzellen wurde mit Hilfe des XTT-basierten Viabilitätstests gemessen. Des Weiteren wurde die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM dar. Die CEA Expression der Tumorzelllinien wurde durch Färbung mit dem anti-CEA Antikörper und dem Sekundärantikörper anti-Maus IgG₁-FITC durchflusszytometrisch bestimmt. Der Nachweis der ErbB2 Expression erfolgte durch Inkubation mit dem PE-gekoppelten anti-CD340 (ErbB2/Her-2) Antikörper.

w/o, ohne („without“) CAR
 #607 CAR, C-Fc-CD28-CD3 ζ
 #700 CAR, C-Fc-CD3 ζ

4.8 Die verminderte IL-2 Stimulation erhöht die selektive Reaktivierung der T-Zelle durch den CAR

Die Untersuchungen in 4.7 zeigten, dass die primäre CD3/CD28 TCR Stimulation Einfluss auf die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung hat. Um dies auf die neu generierten Konstrukte anzuwenden, wurden T-Zellen zur Expression des #1213 CAR, #1331 CAR oder #1344 CARs transduziert und einen Tag ohne IL-2 oder neun Tage in Gegenwart von ≤ 20 U/ml IL-2 inkubiert. Die CAR T-Zellen wurden auf Platten mit den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 inkubiert. T-Zellen mit #1213 CAR, der nur eine kostimulatorische Domäne aufweist, wurden durch diese Liganden nicht spezifisch aktiviert (Abb. 16A). Die CAR-vermittelte Aktivierung der #1331 CAR T-Zellen durch Bindung an BW2064/36 allein war unter beiden Kulturbedingungen höher als durch Bindung an BW2064/36 und ErbB2. T-Zellen, die sowohl den Primärsignalgeber #1331 CAR als auch den kostimulatorischen #1213 CAR exprimierten, zeigten je nach Kulturbedingung eine unterschiedliche CAR-vermittelte Aktivierung. T-Zellen mit #1344 CARs, die einen Tag ohne IL-2 inkubiert wurden, sezernierten nach Bindung an BW2064/36 allein ähnlich viel IFN- γ wie nach Bindung an BW2064/36 und ErbB2. Die Aktivierung der CAR T-Zellen durch ErbB2 war geringer als durch BW2064/36 und ErbB2. Eine spezifische

IL-2 Sekretion über Hintergrund wurde bei keiner Inkubation nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten T-Zellen mit #1344 CARs, die neun Tage unter Bedingungen ≤ 20 U/ml IL-2 inkubiert wurden, eine höhere IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand nach Stimulation durch BW2064/36 und ErbB2 als nach Stimulation durch BW2064/36 oder ErbB2 allein. Außerdem wurde unter diesen Bedingungen eine CAR-vermittelte IL-2 Sekretion nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 nachgewiesen.

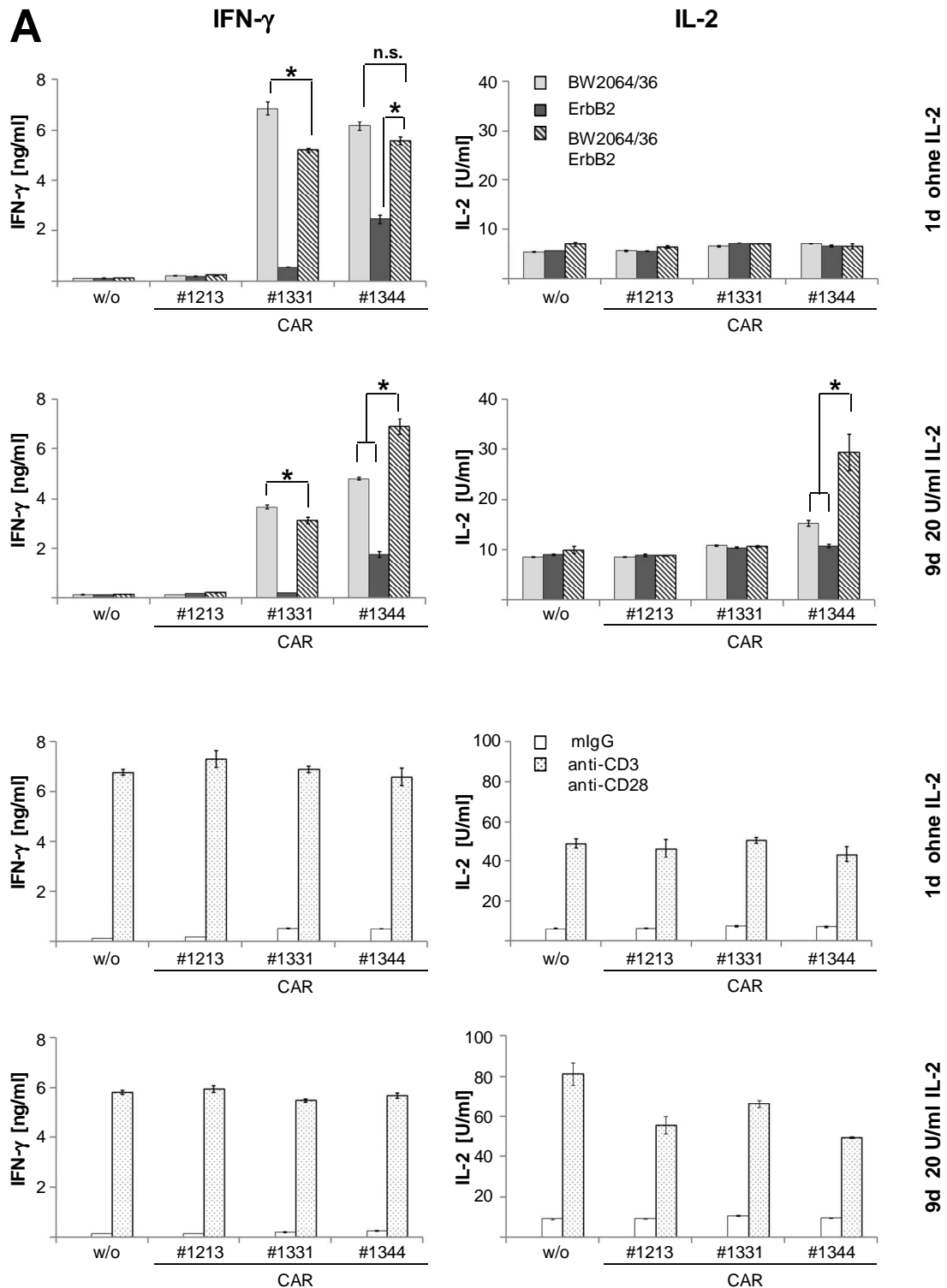


Abbildung 16

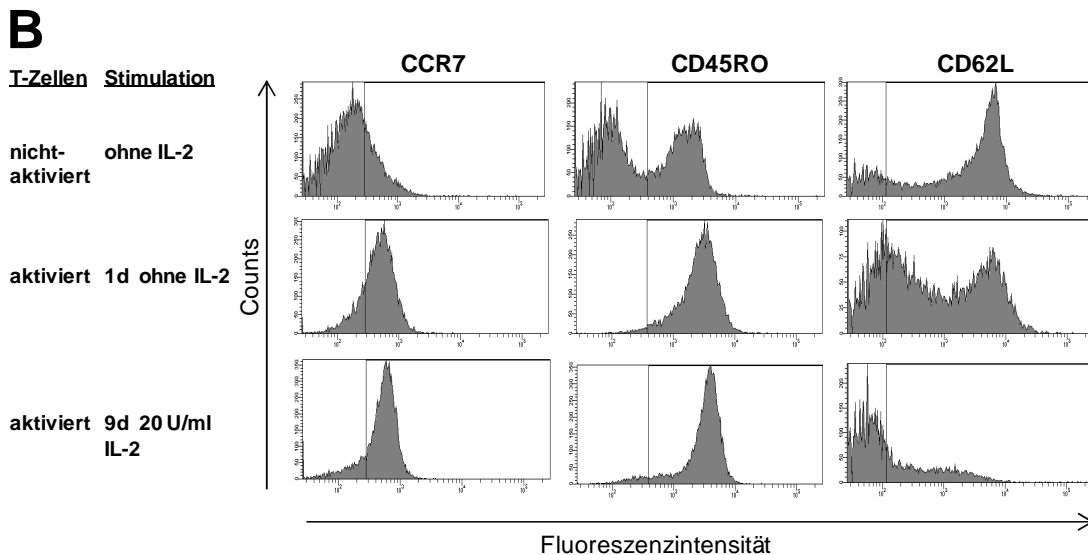


Abbildung 16: Die verminderte IL-2 Stimulation erhöht die selektive Reaktivierung der T-Zelle durch den CAR.

(A) T-Zellen wurden zur Expression des #1213 CAR oder #1331 CAR transduziert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1344 ausgestattet, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Die CAR T-Zellen wurden nach der Transduktion einen Tag ohne IL-2 oder neun Tage mit 20 U/ml IL-2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640 Medium gewaschen. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 (5 µg/ml), ErbB2 (1 µg/ml) oder BW2064/36 (5 µg/ml) und ErbB2 (1 µg/ml) beschichtet. Als Kontrollen dienten Beschichtungen mit Maus IgG (mIgG) (1 µg/ml) oder anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 Antikörper (5 µg/ml). Pro Vertiefung wurden 3 x 10⁴ CAR T-Zellen 72 h inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Die Zytokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte von Triplikaten ± SEM. *p < 0,05 (T-Test), n.s., nicht signifikant (B) Nicht-aktivierte T-Zellen und die aktivierten #1344 CARs T-Zellen aus (A) wurden mittels Durchflusszytometrie phänotypisch charakterisiert unter Verwendung des PE-konjugierten anti-CCR7 Antikörpers, des FITC-gekoppelten anti-CD45RO Antikörpers sowie des APC-konjugierten anti-CD62L Antikörpers.

w/o, ohne („without“) CAR
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1331 CAR, C-CD8-γ
 #1344 CARs, C-CD8-γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Die Inkubation mit einem Maus IgG Antikörper irrelevanter Spezifität als Kontrolle zeigte hierbei keine spezifische Aktivierung. Die agonistischen anti-CD3/anti-CD28 Antikörper induzierten hingegen unter beiden Kulturbedingungen bei allen T-Zellen eine IFN-γ und IL-2 Sekretion, was die Aktivierbarkeit der T-Zellen nachweist.

Die #1344 CARs T-Zellen wurden unter beiden Kulturbedingungen hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert. Nicht-aktivierte T-Zellen dienten hierbei als Vergleich. T-Zellen mit #1344 CARs wiesen nach der Inkubation für einen Tag ohne IL-2 eine höhere CCR7 und CD45RO Expression sowie eine niedrigere CD62L Expression auf

als nicht-aktivierte T-Zellen (Abb. 16B). Dieser Phänotyp findet sich auch bei T-Zellen mit #1344 CARs, die neun Tage unter Bedingungen ≤ 20 U/ml IL-2 inkubiert wurden. Auffallend ist ein stärkerer Verlust der CD62L Expression im Vergleich zu CAR T-Zellen, die nur für einen Tag ohne IL-2 inkubiert wurden. Offensichtlich fördert die Inkubation in Gegenwart geringer IL-2 Konzentrationen die Differenzierung der T-Zellen zu „central memory“ T-Zellen.

Die Daten weisen darauf hin, dass die CAR-vermittelte Reaktivierung der T-Zelle durch eine Inkubation länger als einen Tag unter geringen Konzentrationen IL-2 erhöht wird. Dieses geht einher mit einer Änderung des Phänotyps zu CCR7⁺, CD45RO⁺ und CD62L^{low}.

4.9 Die Aktivierung des CD28 CAR wirkt der verminderten T-Zell Aktivierung durch den γ CAR entgegen

Die vorhergehenden Untersuchungen haben ergeben, dass die selektive Reaktivierung der T-Zelle durch den CAR durch eine längere Inkubationsdauer vor Antigen-Kontakt erhöht wird. Im Nachfolgenden wurde überprüft, ob die selektive Reaktivierung der T-Zelle durch den CAR ebenso erfolgt, wenn die Aktivierung durch den γ CAR reduziert wird. Dies sollte durch eine niedrigere Anzahl CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche, wie sie beim #519 CAR beobachtet wurde, erreicht werden. Dazu wurden T-Zellen mit dem #519 CAR ohne Brückendomäne oder dem #1331 CAR mit CD8 Domäne ausgestattet. Weiterhin wurden T-Zellen mit dem entsprechenden bicistronischen Vektor (#1246 bzw. #1344) transduziert. Die Inkubation der CAR T-Zellen erfolgte auf mit BW2064/36 Antikörper beschichteten Platten. Es zeigte sich, dass T-Zellen mit #519 CAR allein oder koexprimiert mit #1213 CAR (#1246 CARs) eine geringere IFN- γ Konzentration im Überstand aufwiesen als entsprechende CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne (#1331 CAR, #1344 CARs) (Abb. 17A). T-Zellen mit #1213 CAR, #519 CAR oder #1246 CARs wurden kurz nach Transduktion auf Platten mit immobilisierten BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 inkubiert. Hierbei zeigten T-Zellen mit #1213 CAR oder #519 CAR keine IFN- γ oder IL-2 Sekretion (Abb. 17B). Hingegen zeigten T-Zellen, die sowohl den Primärsignalgeber #519 CAR als auch den kostimulatorischen #1213 CAR exprimierten, nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 eine höhere IFN- γ Konzentration im Überstand als nach Inkubation mit BW2064/36 oder ErbB2. Eine Induktion der IL-2 Sekretion wurde nicht

nachgewiesen. Als Kontrolle wurde eine Inkubation mit einem Maus IgG Antikörper irrelevanter Spezifität durchgeführt, die zu keiner spezifischen Aktivierung führte. T-Zellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern inkubiert, um zu prüfen, ob sich die CAR T-Zellen über ihren endogenen TCR Komplex stimulieren lassen. Hier zeigte sich, dass alle CAR T-Zellen nach CD3/CD28 Stimulation sowohl IFN- γ als auch IL-2 sezernierten.

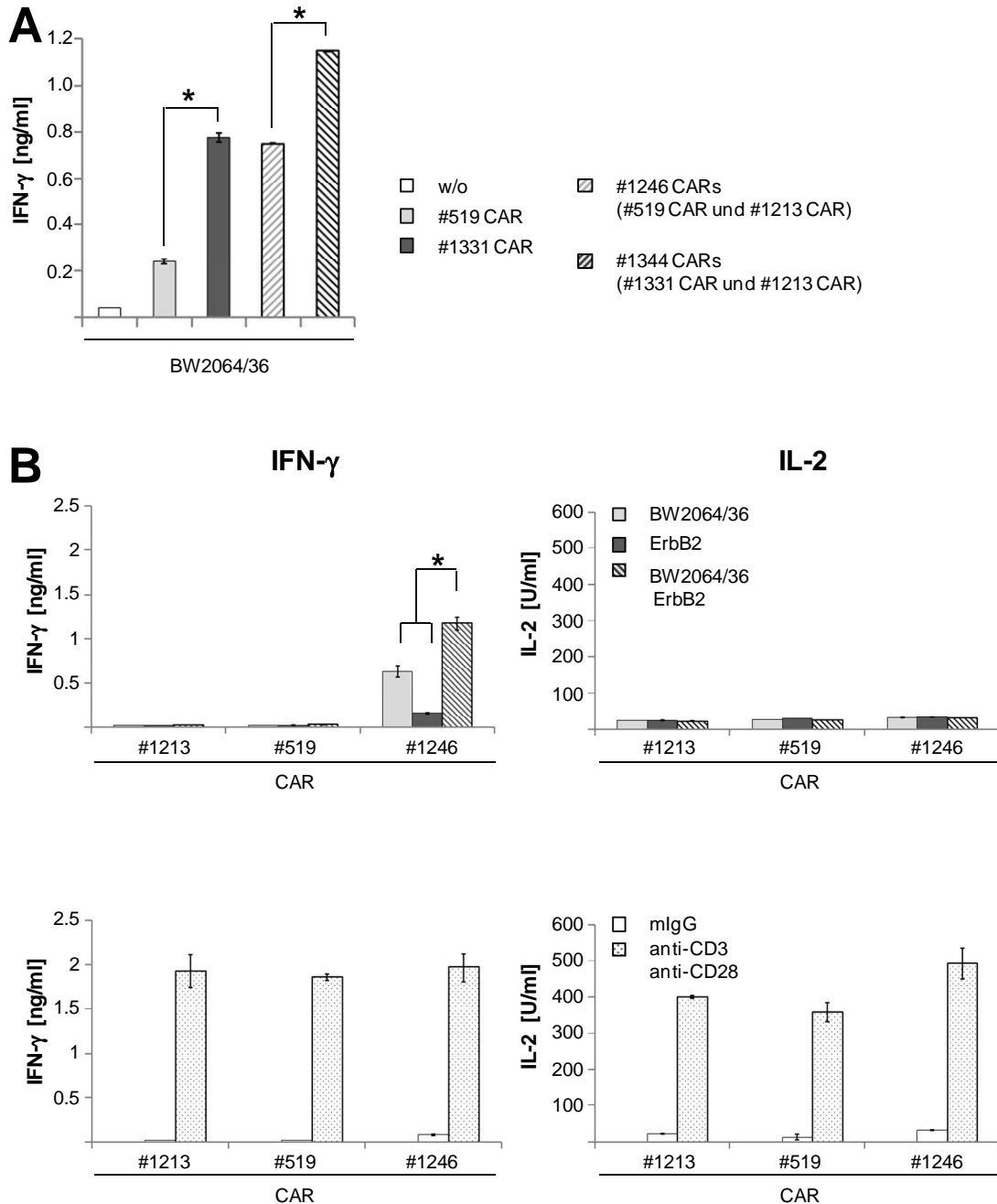


Abbildung 17

Abbildung 17: Die Aktivierung des CD28 CAR wirkt der verminderten T-Zell Aktivierung durch den γ CAR entgegen.

(A) Der #519 CAR oder #1331 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder durch Transduktion des Vektors #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Die Inkubation (3×10^4 CAR T-Zellen pro Vertiefung) erfolgte 72 h mit immobilisiertem BW2064/36 Antikörper (Beschichtungskonzentration $5 \mu\text{g/ml}$) (Daten aus Abb. 12B). (B) T-Zellen wurden zur Expression des #1213 CAR oder #519 CAR transduziert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 ($5 \mu\text{g/ml}$), ErbB2 ($1 \mu\text{g/ml}$) oder BW2064/36 ($5 \mu\text{g/ml}$) und ErbB2 ($1 \mu\text{g/ml}$) beschichtet. Als Kontrollen dienten Beschichtungen mit Maus IgG (mIgG) ($1 \mu\text{g/ml}$) oder anti-CD3 ($1 \mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 Antikörper ($5 \mu\text{g/ml}$). Pro Vertiefung wurden 5×10^3 CAR T-Zellen 72 h inkubiert.

Bei allen Ansätzen wurden die IFN- γ Konzentration (A, B) oder die IL-2 Konzentration (B) in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden als Triplikate erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ (T-Test)

#519 CAR, C- γ
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Es wurde gezeigt, dass das Entfernen der CD8 Brückendomäne die T-Zell Aktivierung durch die γ Signaldomäne reduziert, welche durch die Koexpression des CD28 CAR wieder erhöht wird. Dies bedarf der Bindung an beide CAR Liganden, was eine erhöhte Selektivität darstellt.

4.10 CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zeigen eine selektive Reaktivierung durch den CAR

Die für die Untersuchungen verwendeten Zellen, die aus dem peripheren Blut gewonnen wurden, stellen weitgehend Lymphozyten dar. Es wurde überprüft, ob die selektive Reaktivierung durch den CAR für die T-Zell Subpopulationen gleichermaßen gilt. Dazu wurden CD3⁺ T-Zellen isoliert und zur Expression des #1213 CAR, #519 CAR und #1246 CARs transduziert. CD3⁺ T-Zellen wurden durch Inkubation auf mit den CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 beschichteten Platten stimuliert. CD3⁺ T-Zellen mit #1213 CAR oder #519 CAR zeigten keine spezifische Aktivierung (Abb. 18A). Bei Koexpression des #519 CAR und #1213 CAR durch den Vektor #1246 auf CD3⁺ T-Zellen war die IFN- γ Konzentration im Überstand nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 höher als nach Inkubation mit BW2064/36

oder ErbB2 allein. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Maus IgG, die keine Aktivierung zeigte. Alle CD3⁺ T-Zellen ließen sich durch CD3/CD28 Stimulation des endogenen TCR Komplexes aktivieren, angezeigt durch Anstieg der IFN- γ Sekretion.

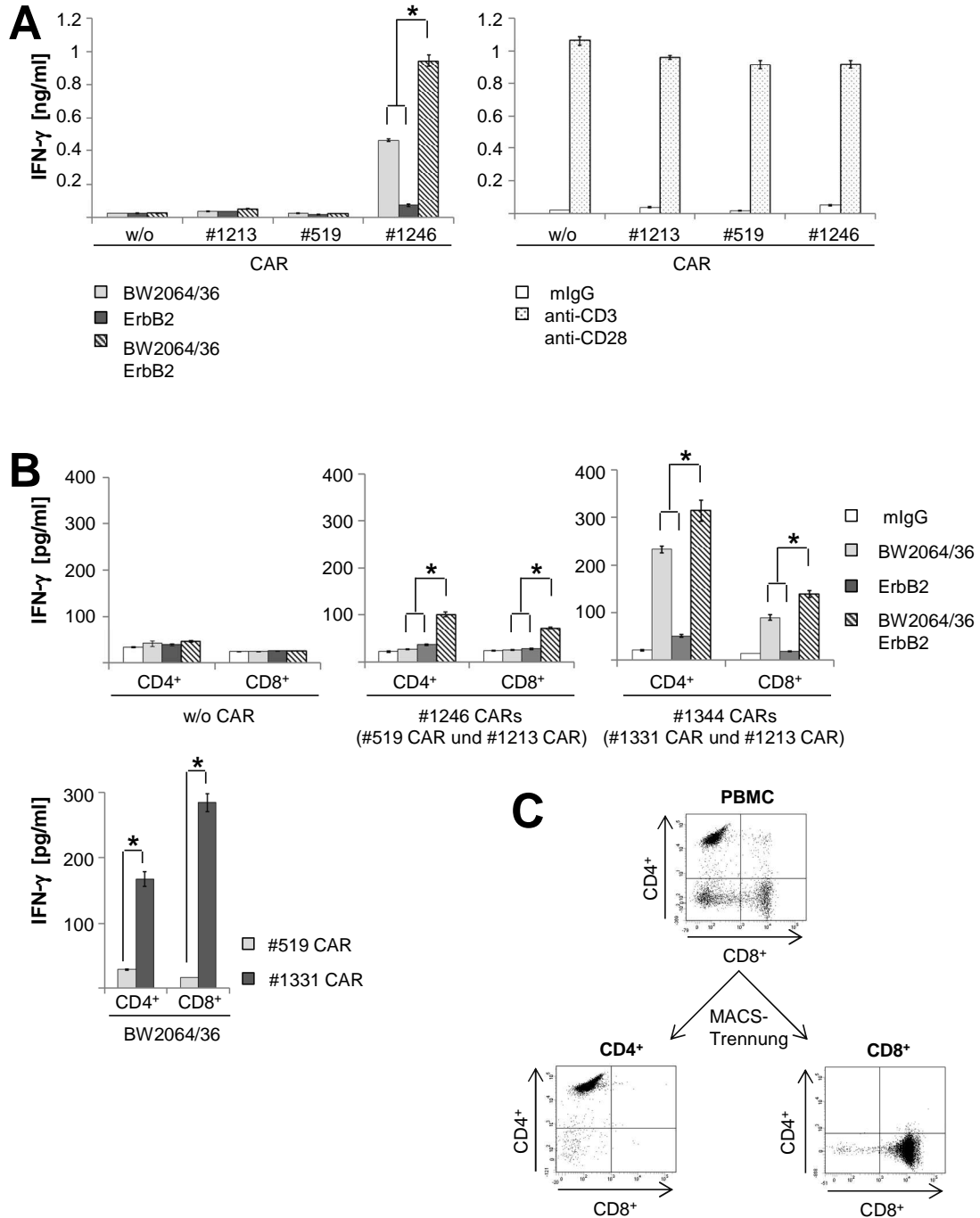


Abbildung 18

Abbildung 18: CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zeigen eine selektive Reaktivierung durch den CAR.

(A) Isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden zur Expression des #1213 CAR oder #519 CAR transduziert. Weiterhin wurden CD3⁺ T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 (5 µg/ml), ErbB2 (1 µg/ml) oder BW2064/36 (5 µg/ml) und ErbB2 (1 µg/ml) beschichtet. Als Kontrollen dienten Beschichtungen mit Maus IgG (mIgG) (1 µg/ml) oder anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 Antikörper (5 µg/ml). Pro Vertiefung wurden 5 x 10³ CAR CD3⁺ Zellen 72 h inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte CD3⁺ Zellen. (B) CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurden isoliert und zur Koexpression von zwei CARs transduziert. Die Transduktion erfolgte mit dem Vektor #1246, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Des Weiteren wurden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zur Expression des #519 CAR oder #1331 CAR transduziert. CAR CD4⁺ Zellen oder CAR CD8⁺ Zellen (je 3 x 10⁴ pro Vertiefung) wurden 72 h auf mit BW2064/36 (5 µg/ml), ErbB2 (1 µg/ml) oder BW2064/36 (5 µg/ml) und ErbB2 (1 µg/ml) beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Als Kontrolle diente die Beschichtung mit mIgG (1 µg/ml). Bei allen Ansätzen (A,B) wurde die IFN-γ Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte von Triplikaten ± SEM. *p < 0,05 (T-Test) (C) CD4⁺ Zellen und CD8⁺ Zellen wurden vor und nach der Trennung mit dem MACS System durchflusszytometrisch gemessen. Zum Nachweis der Subpopulationen wurde der PE-konjugierte anti-CD4 Antikörper und der FITC-konjugierte anti-CD8 Antikörper verwendet. Die Reinheit war bei dieser Trennung für CD4⁺ Zellen und CD8⁺ Zellen jeweils 98 %.

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C-γ
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1246 CARs, C-γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8-γ
 #1344 CARs, C-CD8-γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Zur weiteren Analyse wurde die Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht (Abb. 18B). Dazu wurden die Subpopulationen mit Hilfe der MACS Trennung isoliert (Abb. 18C). CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurden zur Koexpression des #519 CAR und #1213 CAR (#1246 CARs) oder des #1331 CAR und #1213 CAR (#1344 CARs) transduziert. Die modifizierten T-Zellen wurden durch immobilisierten BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 stimuliert. Auch hier zeigte sich, dass sowohl CAR CD4⁺ als auch CAR CD8⁺ T-Zellen eine höhere IFN-γ Konzentration im Überstand nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 als nach Inkubation mit BW2064/36 oder ErbB2 allein aufwiesen. Die Stimulation durch Maus IgG als Kontrolle zeigte keine spezifische Aktivierung. Des Weiteren zeigte sich, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen mit #519 CAR ohne Brückendomäne eine geringere IFN-γ Sekretion induzierten als entsprechende CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit CD8 Brückendomäne (#1331 CAR). Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen der vorhergehenden Untersuchungen (siehe 4.9).

Die Daten belegen, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen selektiv durch die #1246 CARs und #1344 CARs reaktiviert werden.

4.11 Die Bindung beider Antigene durch den CD8- γ CAR und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle

Ziel war es, die Schwellen der CAR-vermittelten Aktivierung der T-Zellen in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration zu ermitteln, wobei BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 als spezifische Liganden verwendet wurden. Die Aktivierungsschwelle definiert die höchste Antigen-Konzentration, die noch einen Messwert sezernierter Zytokine im Hintergrund ergibt. Die Daten wurden für die jeweiligen CAR T-Zellen im Hinblick auf den Einfluss des CAR Liganden untersucht. Des Weiteren wurde ausgewertet, wie sich die Aktivierungsschwellen der T-Zellen mit einem CAR im Vergleich zu den Aktivierungsschwellen der T-Zellen mit koexprimierten CARs nach Bindung an das dasselbe Antigen verhalten. T-Zellen wurden mit #1213 CAR, #1331 CAR oder beiden koexprimierten CARs (#1344 CARs) ausgestattet. Mikrotiterplatten wurden mit den CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 in einer Verdünnungsreihe beschichtet und die jeweiligen CAR T-Zellen inkubiert. T-Zellen mit koexprimierten CARs benötigten eine geringere Antigen-Konzentration für die Aktivierung nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 als nach Inkubation mit BW2064/36 oder ErbB2 allein (Abb. 19A). T-Zellen mit #1331 CAR, der nur die γ Signaldomäne trägt, zeigten bei der Stimulation durch BW2064/36 und ErbB2 oder BW2064/36 allein ähnliche Aktivierungsschwellen. Die Inkubation mit ErbB2 induzierte in dieser Durchführung keine IFN- γ Sekretion. T-Zellen mit #1213 CAR, der nur die CD28 kostimulatorische Domäne aufweist, zeigten eine Aktivierung nach Bindung an BW2064/36 und ErbB2. Allerdings erforderte dieses eine höhere Konzentration als 2 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde keine IFN- γ Sekretion durch die einzelnen Liganden induziert.

Die Daten wurden ebenfalls hinsichtlich der CAR-vermittelten Aktivierung nach Bindung an dasselbe Antigen ausgewertet. Die Inkubation mit beiden CAR Liganden erforderte bei T-Zellen mit koexprimierten CARs eine geringere Antigen-Konzentration zur IFN- γ Induktion als bei T-Zellen mit nur einem CAR (Abb. 19B). Im Gegensatz dazu benötigte die Bindung des anti-CEA CAR Liganden BW2064/36 zur IFN- γ Sekretion bei T-Zellen mit #1331 CAR weniger Antigen als bei T-Zellen mit koexprimierten CARs (#1344 CARs). Hier zeigten T-Zellen mit #1213 CAR keine Aktivierung. Bei Inkubation mit ErbB2 wurde in den höheren Konzentrationen bei T-Zellen mit koexprimierten

CARs eine geringe IFN- γ Konzentration nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde bei T-Zellen mit nur einem CAR nicht gemacht.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Bindung beider Antigene die Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit koexprimierten anti-CEA-CD8- γ CAR und anti-ErbB2-Fc-CD28 CAR vermindert im Vergleich zur Aktivierung durch einen der beiden CARs. Des Weiteren wird die Aktivierungsschwelle bei koexprimierten CARs bei Bindung beider Antigene vermindert im Vergleich zur Bindung nur eines der Antigene.

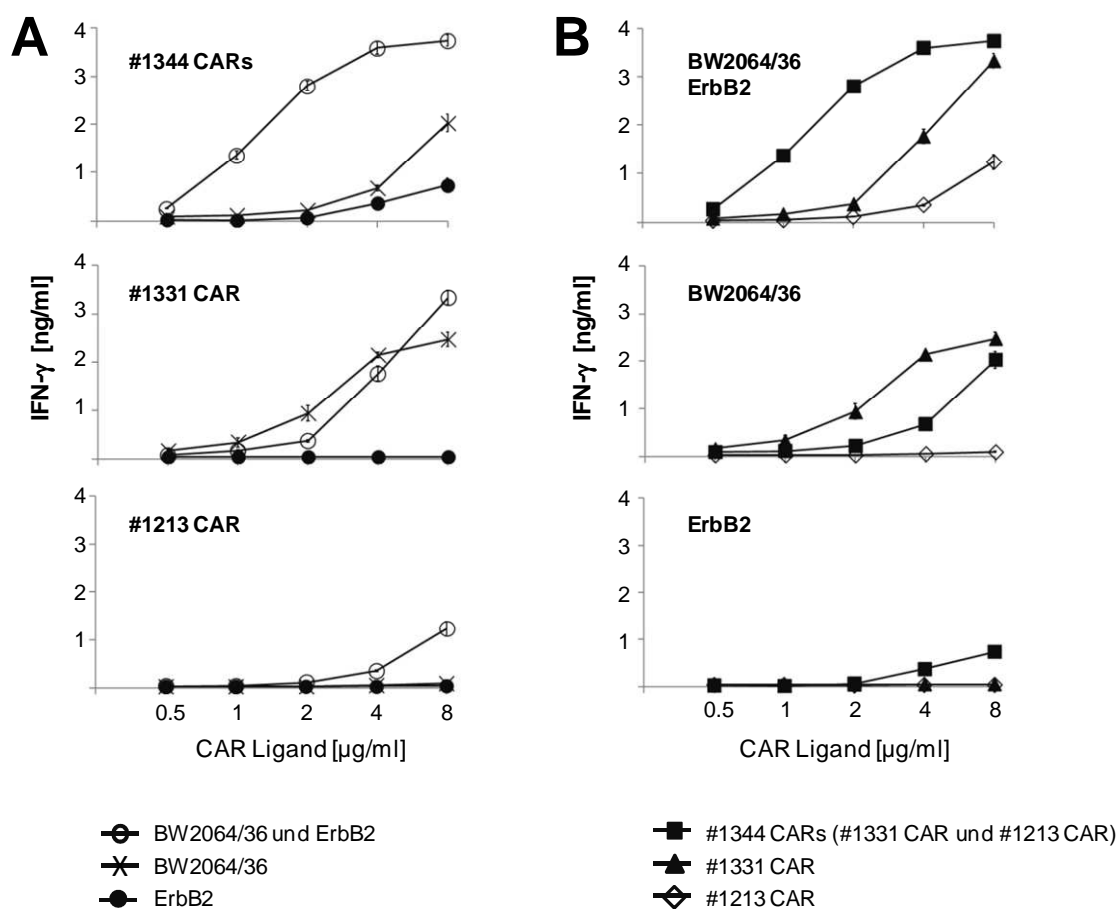


Abbildung 19: Die Bindung beider Antigene durch den CD8- γ CAR und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.

Der #1213 CAR oder der #1331 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1344 ausgestattet, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,5 μ g/ml – je 8 μ g/ml). Je $2,5 \times 10^4$ CAR T-Zellen pro Vertiefung wurden 48 h inkubiert. Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden im Hinblick auf das

Antigen (A) oder den CAR (B) ausgewertet. (A) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung der jeweiligen CAR T-Zellen in Abhängigkeit von den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2. (B) zeigt den Einfluss der Beschichtung mit dem jeweiligen CAR Liganden auf die Aktivierung der T-Zellen mit #1344 CARs, #1331 CAR oder #1213 CAR. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens Triplikaten \pm SEM.

#1213 CAR, E-Fc-CD28

#1331 CAR, C-CD8- γ

#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.12 Die Bindung beider Antigene durch den γ CAR ohne CD8 Brückendomäne und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle

Es wurde untersucht, ob die vorhergehende Beobachtung, dass die Bindung beider Antigene die Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit koexprimierten CARs vermindert, ebenfalls für CAR T-Zellen ohne CD8 Brückendomäne gilt. Auch hier wurde sowohl der Einfluss des CAR Liganden als auch des CAR ausgewertet. Dazu wurden T-Zellen mit #1213 CAR, #519 CAR oder koexprimierten CARs (#1246 CARs) ausgestattet. Die CAR T-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten inkubiert, die mit den CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 in einer Verdünnungsreihe beschichtet waren. Auch in dieser Untersuchung wurde beobachtet, dass T-Zellen mit koexprimierten CARs eine geringere Antigen-Konzentration für die Aktivierung nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 als nach Inkubation mit BW2064/36 oder ErbB2 benötigten (Abb. 20A). T-Zellen mit #519 CAR wurden nur durch Stimulation mit BW2064/36 aktiviert, während #1213 CAR T-Zellen lediglich nach Inkubation mit BW2064/36 und ErbB2 eine geringe Induktion der IFN- γ Sekretion zeigten.

Die Auswertung im Hinblick auf die CAR-vermittelte Aktivierung nach Bindung an dasselbe Antigen ergab, dass die Aktivierung durch beide CAR Liganden bei T-Zellen mit koexprimierten CARs eine geringere Antigen-Konzentration erforderte als die der T-Zellen mit nur einem CAR (Abb. 20B). Die Aktivierungsschwelle durch immobilisierten BW2064/36 Antikörper war bei T-Zellen mit #519 CAR die gleiche wie bei T-Zellen mit koexprimierten CARs. T-Zellen mit #1213 CAR zeigten bei dieser Inkubation keine Induktion der IFN- γ Sekretion. Die Stimulation durch ErbB2 führte nur bei den T-Zellen mit koexprimierten CARs zu einer IFN- γ Sekretion im Hintergrundbereich. Die anti-CD3/anti-CD28 Stimulation induzierte bei allen CAR

T-Zellen und T-Zellen ohne CAR eine IFN- γ Sekretion und zeigte, dass alle T-Zellen sich gleichermaßen aktivieren ließen (Abb. 20C).

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Bindung beider Antigene die Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit koexprimierten CARs im Vergleich zur Aktivierung durch einen CAR oder eines der Antigene auch dann vermindert, wenn der γ CAR keine CD8 Brückendomäne aufweist.

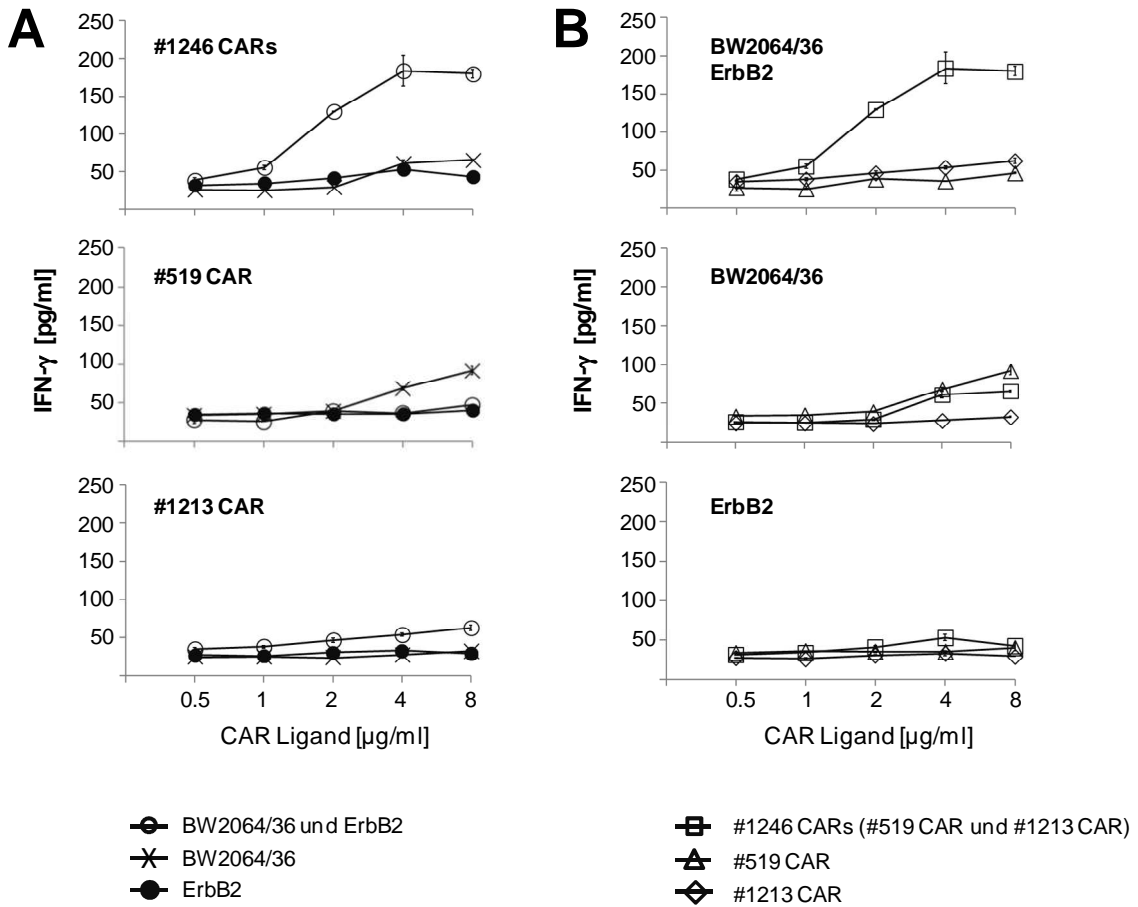


Abbildung 20

Abbildung 20: Die Bindung beider Antigene durch den γ CAR ohne Brückendomäne und den CD28 CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.

Der Ansatz wurde wie in Abbildung 19 durchgeführt unter Verwendung von CARs ohne CD8 Domäne.

Der #519 CAR oder der #1213 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,5 $\mu\text{g/ml}$ – je 8 $\mu\text{g/ml}$). Je 3×10^4 CAR T-Zellen pro Vertiefung wurden 72 h inkubiert (#519 CAR Ansatz enthält $11,6 \times 10^4$ T-Zellen pro Vertiefung). Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden im Hinblick auf das Antigen (A) oder den CAR (B) ausgewertet. **(A)** zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung der jeweiligen CAR T-Zellen in Abhängigkeit von den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2. **(B)** zeigt den Einfluss der Beschichtung mit dem jeweiligen CAR Liganden auf die Aktivierung der T-Zellen mit #1246 CAR, #519 CAR oder #1213 CAR. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. **(C)** Zum Nachweis der Aktivierbarkeit der T-Zelle wurden Mikrotiterplatten mit anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 Antikörper (5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet und wie oben beschrieben verfahren.

#519 CAR, C- γ

#1213 CAR, E-Fc-CD28

#1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.13 Die Affinität des CAR Liganden hat keinen Einfluss auf die Verschiebung der Aktivierungsschwelle

Die Untersuchungen in 4.11 und 4.12 haben ergeben, dass bei Bindung beider Antigene die Aktivierungsschwelle der T-Zelle mit zwei CARs geringer ist als die der T-Zelle mit nur einem CAR. Es wurde nachfolgend untersucht, ob die Verschiebung der Aktivierungsschwelle auch bei einem anti-CEA CAR Liganden niedrigerer Affinität zu beobachten ist. Dazu wurde anstelle des hochaffinen CAR Liganden BW2064/36 der niederaffine CAR Ligand BW2064/399 verwendet. Für die Untersuchung wurde der #519 CAR mit Primärsignalgeber ohne Brückendomäne gewählt, der eine geringere Aktivierung aufwies als der #1331 CAR mit CD8 Domäne (vgl. Abb 17A). T-Zellen wurden mit #519 CAR, #1213 CAR oder #1246 CARs ausgestattet und mit immobilisiertem BW2064/399 und ErbB2 inkubiert. Es stellte sich heraus, dass die IFN- γ Sekretion der T-Zellen mit zwei CARs (#519 CAR und #1213 CAR) bei einer niedrigeren Antigen-Konzentration als die der T-Zellen mit nur #519 CAR induziert wurde (Abb. 21). Dies entspricht der Beobachtung in 4.12, wobei dort der hochaffine BW2064/36 Antikörper als Ligand für den anti-CEA CAR verwendet wurde. T-Zellen mit #1213 CAR sowie nicht-modifizierte T-Zellen als Kontrolle zeigten keine Aktivierung.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Verschiebung der Aktivierungsschwelle durch Koexpression zweier CARs mit γ und CD28 Signal im Rahmen der untersuchten Bindung nicht durch die Affinität des Liganden für die Bindedomäne des γ CAR bestimmt wird.

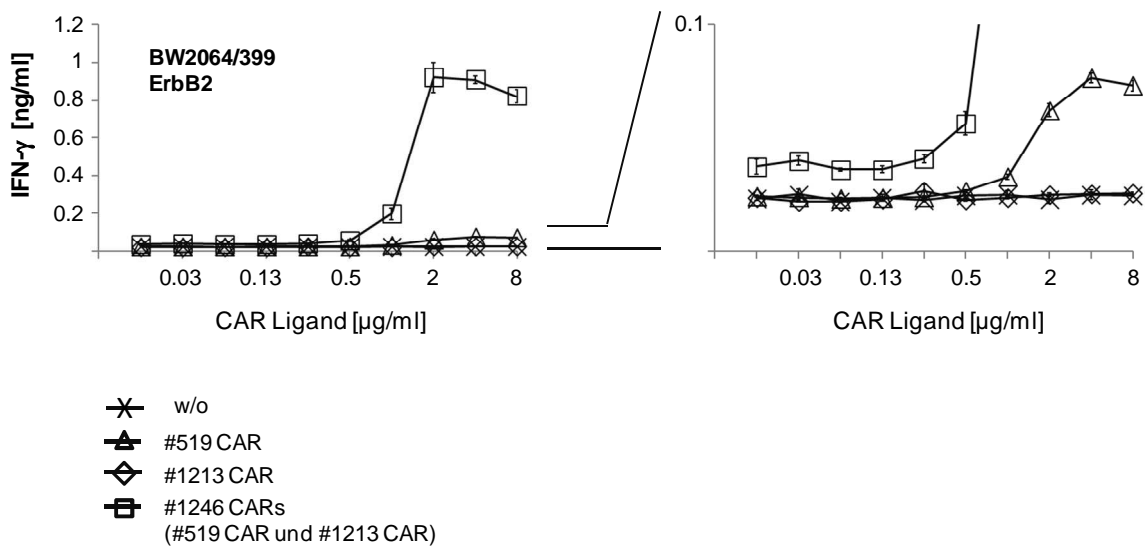


Abbildung 21: Die Affinität des CAR Liganden hat keinen Einfluss auf die Verschiebung der Aktivierungsschwelle.

Der #519 CAR oder #1213 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit dem niederaffinen CAR Liganden BW2064/399 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,0156 μ g/ml – je 8 μ g/ml). Pro Vertiefung wurden 3×10^4 CAR T-Zellen 72 h inkubiert (#519 CAR Ansatz enthält $15,6 \times 10^4$ T-Zellen pro Vertiefung). Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Das rechts dargestellte Diagramm zeigt einen vergrößerten Ausschnitt. Abgebildet sind die Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM.

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C- γ
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.14 Die T-Zell Aktivierung durch den γ CAR und den CD28 CAR ist abhängig von der Antigen-Dosis

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Dosis des jeweiligen Antigens auf die Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CARs hat. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit den CAR Liganden in Verdünnungsreihen so beschichtet, dass die Konzentration des einen Liganden konstant ist, während die Konzentration des anderen Liganden abnimmt. Die Inkubation erfolgte mit T-Zellen, die den Primärsignalgeber #1331 mit CD8 Brückendomäne oder den Primärsignalgeber #519 ohne Brückendomäne und den kostimulatorischen #1213 CAR koexprimierten. Es zeigte sich, dass T-Zellen mit #1344 CARs bei BW2064/36 Stimulation des Primärsignalgebers CD8- γ CAR (#1331 CAR) eine höhere IFN- γ Konzentration im Überstand aufwiesen als bei ErbB2 Stimulation des kostimulatorischen CD28 CAR (#1213 CAR) (Abb. 22A). Auffallend hierbei ist, dass bei 8 $\mu\text{g/ml}$ BW2064/36 die Stimulation durch ErbB2 keine Steigerung der T-Zell Aktivierung zur Folge hatte. Allerdings führte bei einer Konzentration $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ BW2064/36 eine Erhöhung der ErbB2 Konzentration zu einer Steigerung der IFN- γ Sekretion. Im Gegensatz dazu führte die Erhöhung der BW2064/36 Dosis bei allen gewählten ErbB2 Stimulationen zu einer Steigerung der T-Zell Aktivierung. Die Induktion der IL-2 Sekretion benötigte eine höhere Konzentration der CAR Liganden als die der IFN- γ Sekretion (Abb. 22B). Die Darstellung der Daten in Abb. 22C zeigt die Zytokin-Konzentration bei maximaler Konzentration des einen und minimaler Konzentration des anderen Liganden. Hierbei wird nochmals deutlich, dass die Stimulation des Primärsignalgebers #1331 CAR mit CD8 Brückendomäne einen größeren Einfluss auf die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung hatte als die Stimulation des #1213 CAR mit der CD28 kostimulatorischen Domäne.

T-Zellen mit #1246 CARs, bei denen der Primärsignalgeber keine CD8 Brückendomäne hat, wurden ebenso mit den CAR Liganden stimuliert. Dabei bestätigte sich, dass die Stimulation des Primärsignalgebers γ CAR (#519 CAR) eine höhere IFN- γ und IL-2 Konzentration im Überstand aufwies als die Stimulation des kostimulatorischen #1213 CAR (Abb. 22D, E). Gleichfalls führte die CD28 Kostimulation bei maximaler Stimulation des γ CAR zu keiner weiteren Steigerung der IFN- γ Sekretion.

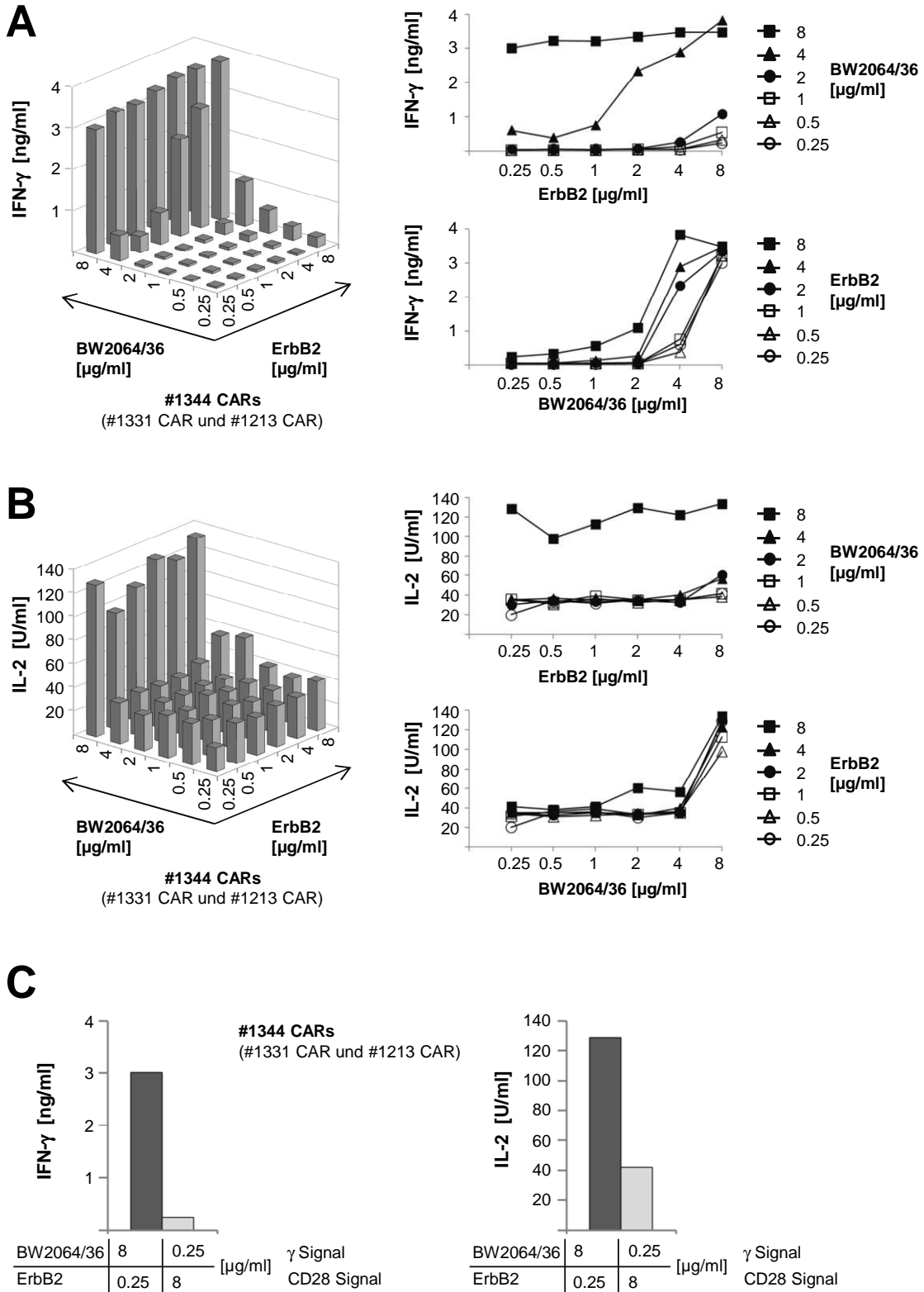


Abbildung 22

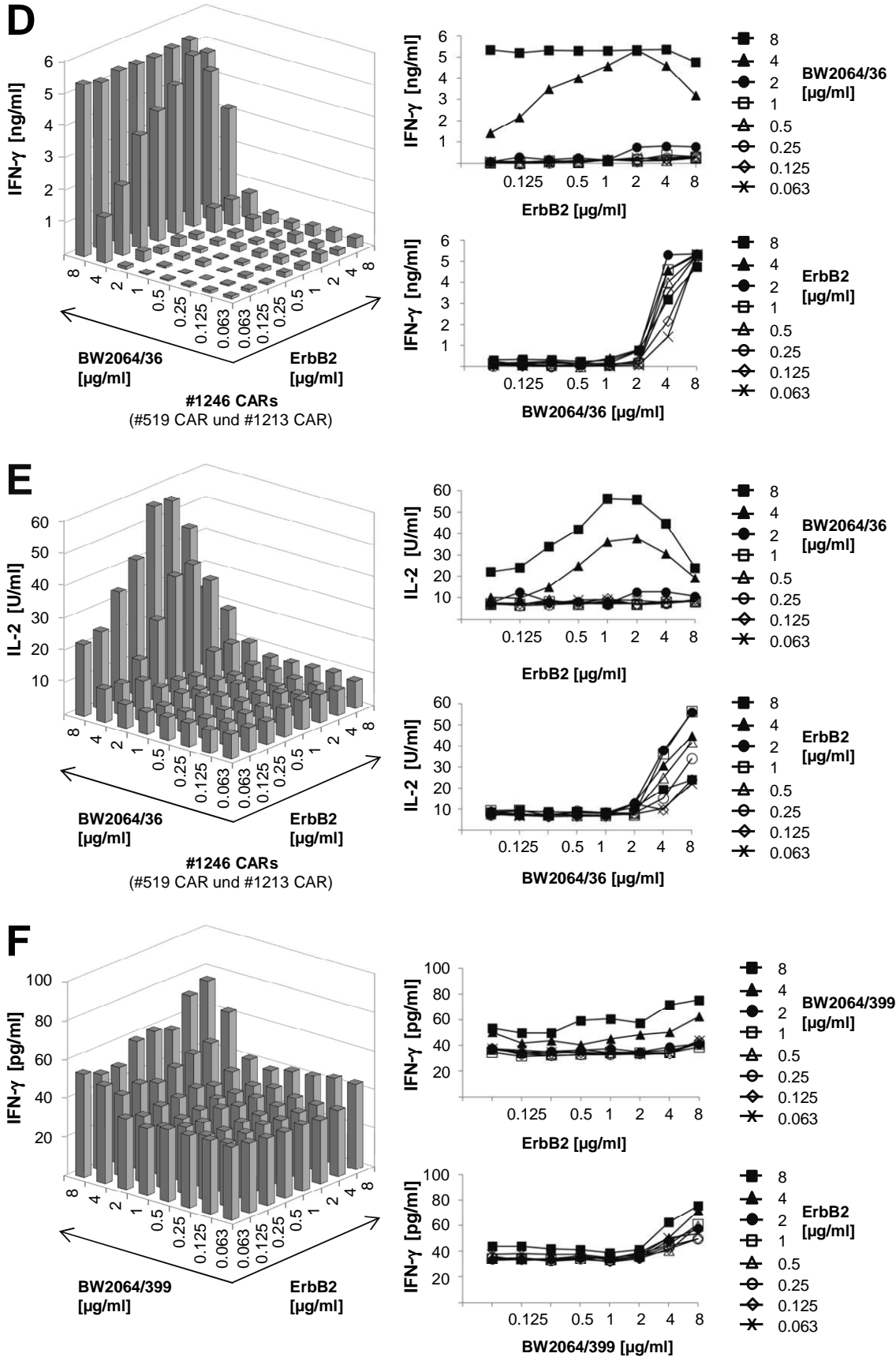


Abbildung 22

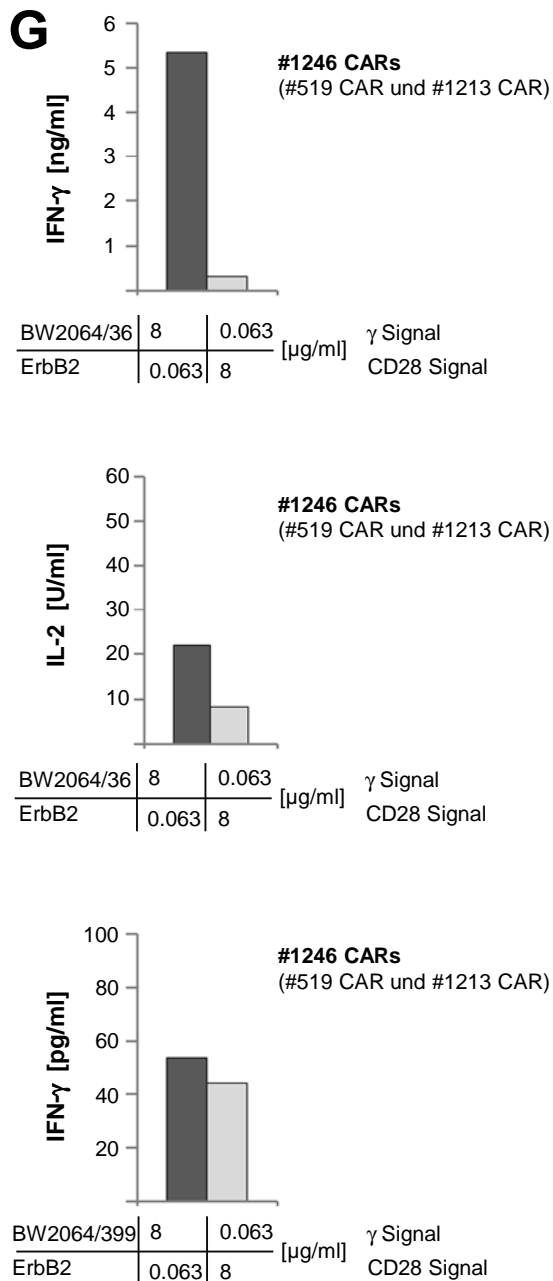


Abbildung 22: Die T-Zell Aktivierung durch den γ CAR und den CD28 CAR ist abhängig von der Antigen-Dosis.

T-Zellen wurden zur Koexpression von zwei CARs transduziert. Die Transduktion erfolgte mit dem Vektor #1246, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit dem hochaffinen CAR Liganden BW2064/36 und ErbB2 (A, B, D, E) oder dem niederaffinen CAR Liganden BW2064/399 und ErbB2 (F) beschichtet. Es wurden je 3×10^4 (A, B, F) oder 5×10^4 (D, E) CAR T-Zellen pro Vertiefung 48 h (A, B, D, E) oder 72 h (F) inkubiert. In den Kulturüberständen wurde die IFN- γ Konzentration (A, D, F) oder die IL-2 Konzentration (B, E) mittels ELISA bestimmt. Die rechte Kolumne stellt die Zytokin-Konzentration in Abhängigkeit von der Beschichtungskonzentration des einen CAR Liganden bei konstanter Beschichtungskonzentration des anderen CAR Liganden dar. Diese Darstellung spiegelt die einzelnen Reihen der Säulendiagramme (linke Kolumne) wider. (C, G) zeigt die Zytokin-Konzentration bei maximaler Beschichtungskonzentration des einen und minimaler Beschichtungskonzentration des anderen CAR Liganden, was den Eckpunkten der Säulendiagramme (linke Kolumne) entspricht.

#1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Die #1246 CARs T-Zellen wurden mit dem niederaffinen BW2064/399 Antikörper anstelle des hochaffinen BW2064/36 Antikörpers inkubiert. Auch hier zeigte sich, dass die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung insbesondere von dem Primärsignalgeber abhängt (Abb. 22F). Allerdings führte eine Erhöhung der ErbB2 Stimulation auch bei höheren BW2064/399 Konzentrationen zu einer Steigerung der T-Zell Aktivierung. Gleichfalls steigerte die Erhöhung der BW2064/399 Dosis bei jeder gewählten ErbB2 Inkubation die Aktivierung der CAR T-Zellen. Der Einfluss der Stimulation des

Primärsignalgebers nahm bei maximaler Konzentration des einen und minimaler Konzentration des anderen Liganden bei Bindung an den niederaffinen anti-CEA CAR Liganden ab im Vergleich zu der Bindung an den hochaffinen anti-CEA CAR Liganden (Abb. 22G).

Die Untersuchungen zeigen, dass die T-Zell Aktivierung durch den Primärsignalgeber und den kostimulatorischen CAR von der Dosis des Liganden abhängig ist. Die Stimulation des Primärsignalgebers hat dabei eine größere Induktion der IFN- γ Sekretion zu Folge als die des CD28 CAR. Dieser Unterschied reduzierte sich, wenn der Primärsignalgeber keine CD8 Brückendomäne aufwies und zugleich ein niederaffiner anti-CEA CAR Ligand verwendet wurde.

4.15 T-Zellen mit zwei CARs exprimieren den jeweiligen CAR in geringerer Anzahl als T-Zellen mit dem einzelnen CAR

Die vorhergehenden Daten in 4.11 und 4.12 zeigen, dass T-Zellen mit zwei CARs eine niedrigere Schwelle der CAR-vermittelten Aktivierung aufweisen als T-Zellen mit nur einem CAR. Es wurde überprüft, ob diese Beobachtung mit einer erhöhten Anzahl der jeweiligen Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche einhergeht. Dazu wurden T-Zellen mit den einzelnen Rezeptoren #519, #1213 oder #1331 ausgestattet. Des Weiteren wurden T-Zellen zur Koexpression der CARs mit den Vektoren #1246 oder #1344 transduziert. Die Expression der Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die „mean fluorescence intensity“ (MFI) diente als Maß für die Anzahl der Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche. Die MFI des CAR auf T-Zellen mit einem CAR (#519 CAR, #1213 CAR, #1331 CAR) wurde verglichen mit der MFI des CAR bei Koexpression des zweiten CAR (#1246 CARs, #1344 CARs). Hierbei fiel auf, dass die MFI des anti-CEA CAR bei Koexpression des anti-ErbB2 CAR geringer ist als die MFI der T-Zelle mit dem anti-CEA CAR (#519 CAR, #1331 CAR) allein (Abb. 23). Bei dem entsprechenden Vergleich der MFI des anti-ErbB2 CAR (#1213 CAR) zeigte sich ebenfalls, dass der CAR bei Koexpression eines weiteren CAR eine geringere MFI als bei alleiniger Expression aufwies.

Die Daten belegen, dass T-Zellen mit zwei CARs weniger Moleküle des jeweiligen CAR exprimieren als T-Zellen mit nur einem CAR. Wir schließen daraus, dass die Reduktion der Aktivierungsschwelle der koexprimierten CARs nicht durch eine Erhöhung der Anzahl der jeweiligen Rezeptoren zu erklären ist.

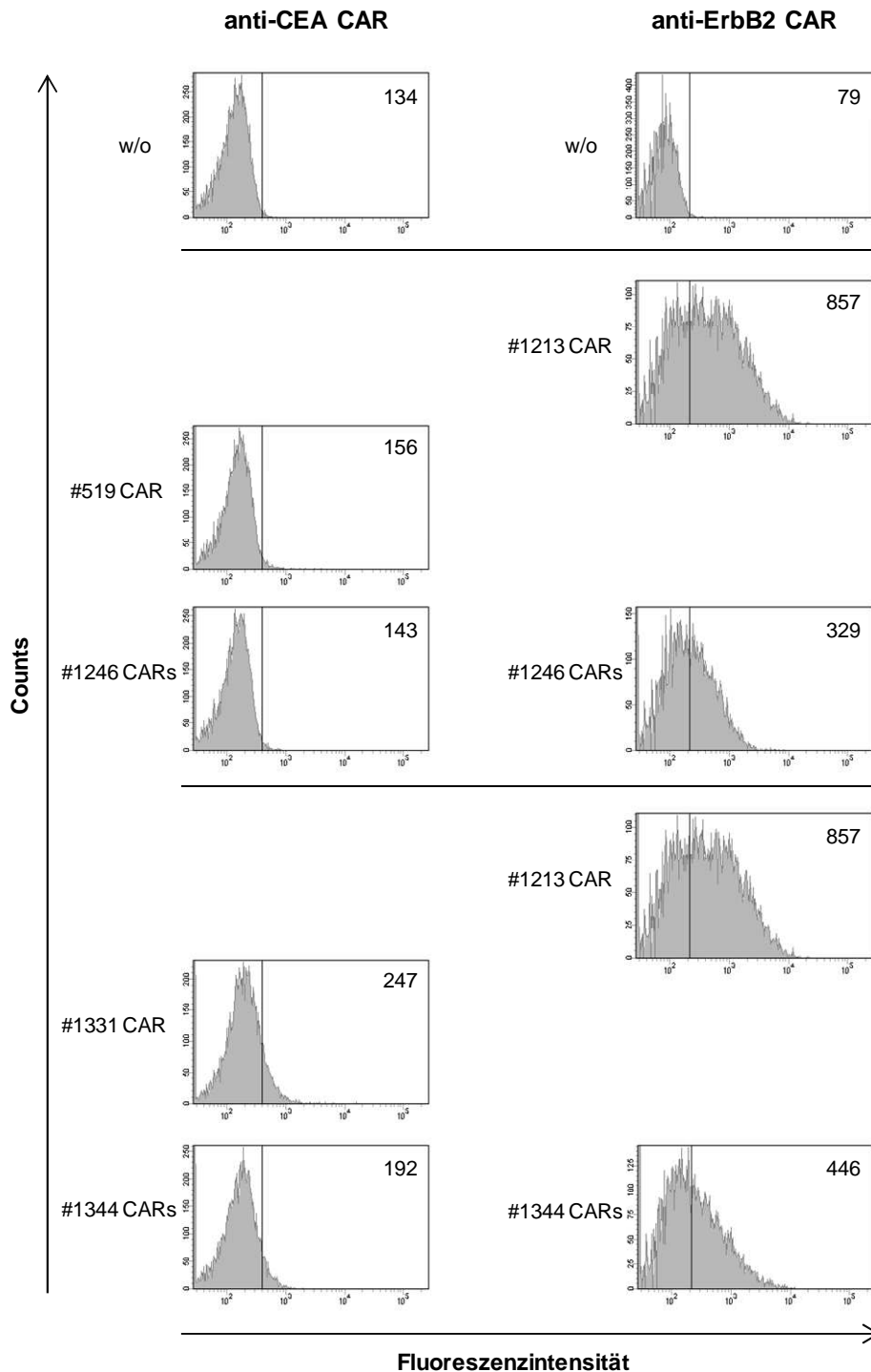


Abbildung 23: T-Zellen mit zwei CARs exprimieren den jeweiligen CAR in geringerer Anzahl als T-Zellen mit dem einzelnen CAR.

T-Zellen wurden zur Expression des #519 CAR, #1213 CAR oder #1331 CAR transduziert. Zur Koexpression von zwei CARs erfolgte die Transduktion mit dem Vektor #1246, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Der anti-CEA CAR wurde durch Färbung mit dem anti-idiotypischen BW2064/36 Antikörper und dem sekundären anti-Maus IgG₁-FITC Antikörper bestimmt. Der Nachweis des anti-ErbB2 CAR erfolgte durch Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-human IgG Antikörper. Zur Identifizierung der T-Zellen wurde ein APC-

gekoppelter anti-human CD3 Antikörper verwendet. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte T-Zellen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Die Zahl in dem jeweiligen Histogramm zeigt die „mean fluorescence intensity“ (MFI) des CAR an. In der Vielzahl der Experimente war die MFI des #1213 CAR bei Koexpression niedriger, selten gleich (siehe Abb. 10). Die anti-CEA CARs #519 und #1331 wurden bei Koexpression immer in geringerer Anzahl exprimiert als bei alleiniger Expression.

w/o, ohne („without“) CAR
#519 CAR, C- γ
#1213 CAR, E-Fc-CD28
#1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
#1331 CAR, C-CD8- γ
#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.16 Die Stimulation der T-Zelle durch den γ CAR und den CD28 CAR induziert IL-2 Sekretion

Die vollständige T-Zell Aktivierung benötigt zwei Signale; das Primärsignal induziert die IFN- γ und zusammen mit dem kostimulatorischen Signal CD28 die IL-2 Sekretion. Es wurde überprüft, ob eine konzentrationsabhängige IL-2 Sekretion nach Bindung beider Antigene durch das Primärsignal und die Kostimulation induziert wurde. Des Weiteren wurde ausgewertet, welche Antigen-Konzentration für die IFN- γ oder IL-2 Induktion nötig war. T-Zellen wurden mit dem CAR #519, #1213 oder #1331 ausgestattet, sowie zur Koexpression von zwei CARs mit dem Vektor #1246 oder #1344 transduziert. Es erfolgte eine Inkubation mit den CAR Liganden BW2064/36 und ErbB2, die in Verdünnungsreihen gleicher Konzentration immobilisiert wurden. Die Sekretion von IL-2 als indikativer Marker für die CD28 Kostimulation der T-Zelle wurde nur bei T-Zellen mit koexprimierten CARs nachgewiesen (Abb. 24A). Hierbei war die IL-2 Konzentration im Überstand der CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne (#1344 CARs) höher als im Überstand der CAR T-Zellen ohne Brückendomäne (#1246 CARs). T-Zellen, die entweder den Primärsignalgeber #519 oder #1331 oder den kostimulatorischen #1213 CAR exprimierten, sezernierten kein IL-2. Die Induktion der IFN- γ Sekretion bei koexprimierten CARs mit CD8 Brückendomäne benötigte weniger Antigen als die Induktion der IL-2 Sekretion (Abb. 24B). Im Gegensatz dazu wurde bei koexprimierten CARs ohne CD8 Brückendomäne die IFN- γ und IL-2 Sekretion bei derselben Antigen-Konzentration induziert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Induktion der IL-2 Sekretion nur bei simultaner Stimulation des Primärsignalgebers und des kostimulatorischen Rezeptors erfolgt. T-Zellen mit koexprimierten CARs mit CD8 Brückendomäne haben eine

geringere Aktivierungsschwelle für die Induktion der IFN- γ Sekretion als für die Induktion der IL-2 Sekretion.

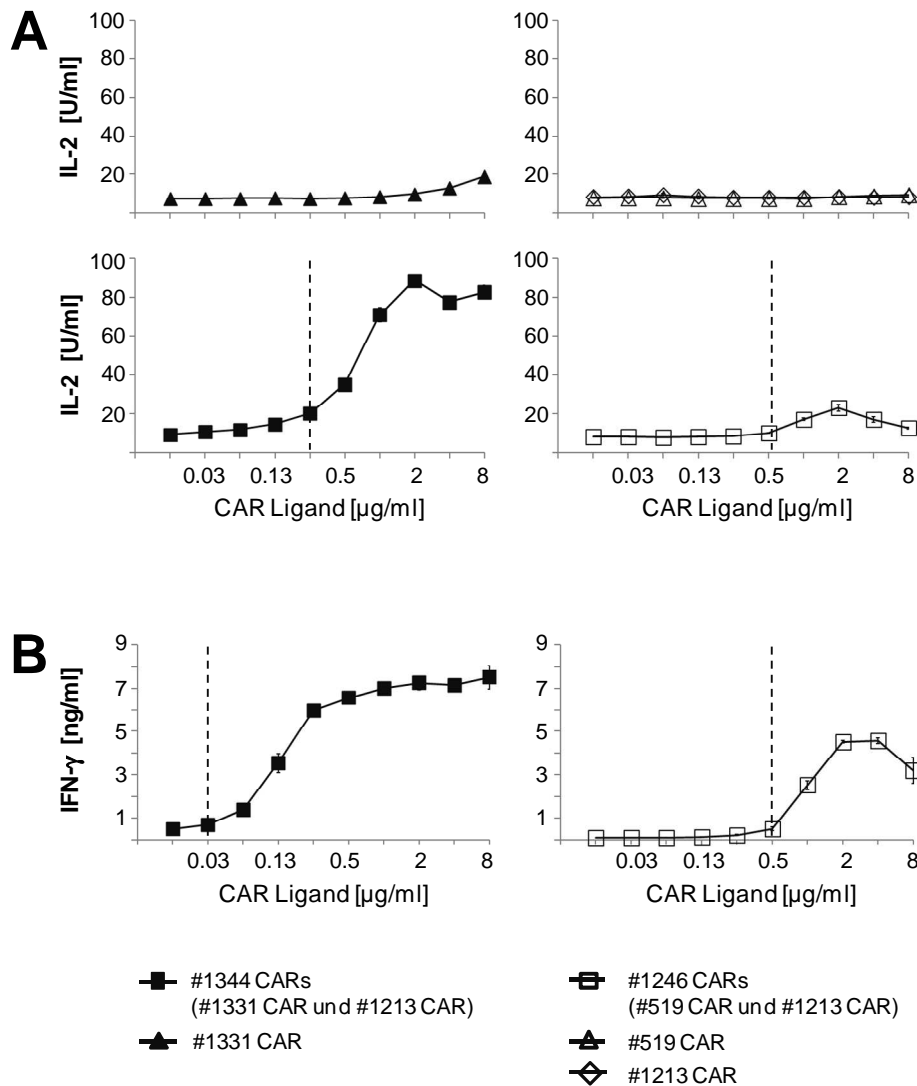


Abbildung 24: Die Stimulation der T-Zelle durch den γ CAR und den CD28 CAR induziert IL-2 Sekretion.

T-Zellen wurden zur Expression des #519 CAR, #1213 CAR oder #1331 CAR transduziert. Des Weiteren wurden T-Zellen zur Koexpression von zwei CARs transduziert. Dafür erfolgte die Transduktion mit dem Vektor #1246, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit den CAR Liganden BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,0156 $\mu\text{g/ml}$ – je 8 $\mu\text{g/ml}$). Angegeben sind die Konzentrationen der Beschichtungslösung. Pro Vertiefung wurden 3×10^4 CAR T-Zellen 72 h inkubiert. Die IL-2 Konzentration (A) und IFN- γ Konzentration (B) in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die Aktivierungsschwelle, die wir als die höchste Beschichtungs-

konzentration definieren, die keine Zytokin-Freisetzung induziert. Abgebildet sind Mittelwerte von mindestens Triplikaten \pm SEM.

#519 CAR, C- γ

#1213 CAR, E-Fc-CD28

#1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

#1331 CAR, C-CD8- γ

#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.17 Das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle

In den vorhergehenden Daten wurde gezeigt, dass das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung erhöht (siehe Abb. 17A). Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkung das Einfügen der CD8 Brückendomäne auf die Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit einem CAR oder mit zwei CARs hat. Dazu wurden T-Zellen mit dem Primärsignalgeber ohne Brückendomäne (#519 CAR) oder mit CD8 Brückendomäne (#1331 CAR) ausgestattet. Des Weiteren wurden T-Zellen zur Koexpression mit dem kostimulatorischen #1213 CAR mit dem Vektor #1246 (Primärsignalgeber ohne Brückendomäne) oder #1344 (Primärsignalgeber mit CD8 Brückendomäne) transduziert. Die modifizierten T-Zellen wurden mit BW2064/36 und ErbB2, die in Verdünnungsreihen gleicher Konzentration immobilisiert wurden, inkubiert. T-Zellen mit dem anti-CEA CAR mit CD8 Brückendomäne (#1331 CAR) wiesen eine geringere Aktivierungsschwelle auf als T-Zellen mit dem anti-CEA CAR ohne Brückendomäne (#519 CAR) (Abb. 25A). In diesem Versuch lag die Aktivierungsschwelle der #519 CAR T-Zellen im Hintergrundbereich. Dieselbe Beobachtung wurde bei T-Zellen mit zwei CARs gemacht. Auch hier war die Aktivierungsschwelle der #1344 CARs T-Zellen, die den anti-CEA CAR mit CD8 Domäne koexprimierten, niedriger als die Aktivierungsschwelle der #1246 CARs T-Zellen, die den anti-CEA CAR ohne Brückendomäne koexprimierten (Abb. 25B). Die Induktion einer IL-2 Sekretion über Hintergrund erfolgte nur bei #1344 CARs T-Zellen (Abb. 25A–C). Die IFN- γ Induktion erforderte eine niedrigere Antigen-Konzentration als die IL-2 Sekretion. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung in 4.16. T-Zellen mit dem kostimulatorischen #1213 CAR allein oder T-Zellen ohne CAR wiesen weder eine IFN- γ noch eine IL-2 Sekretion auf (Abb. 25C).

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR sowohl bei alleiniger Expression als auch bei Koexpression mit dem kostimulatorischen CAR die Aktivierungsschwelle der T-Zelle vermindert.

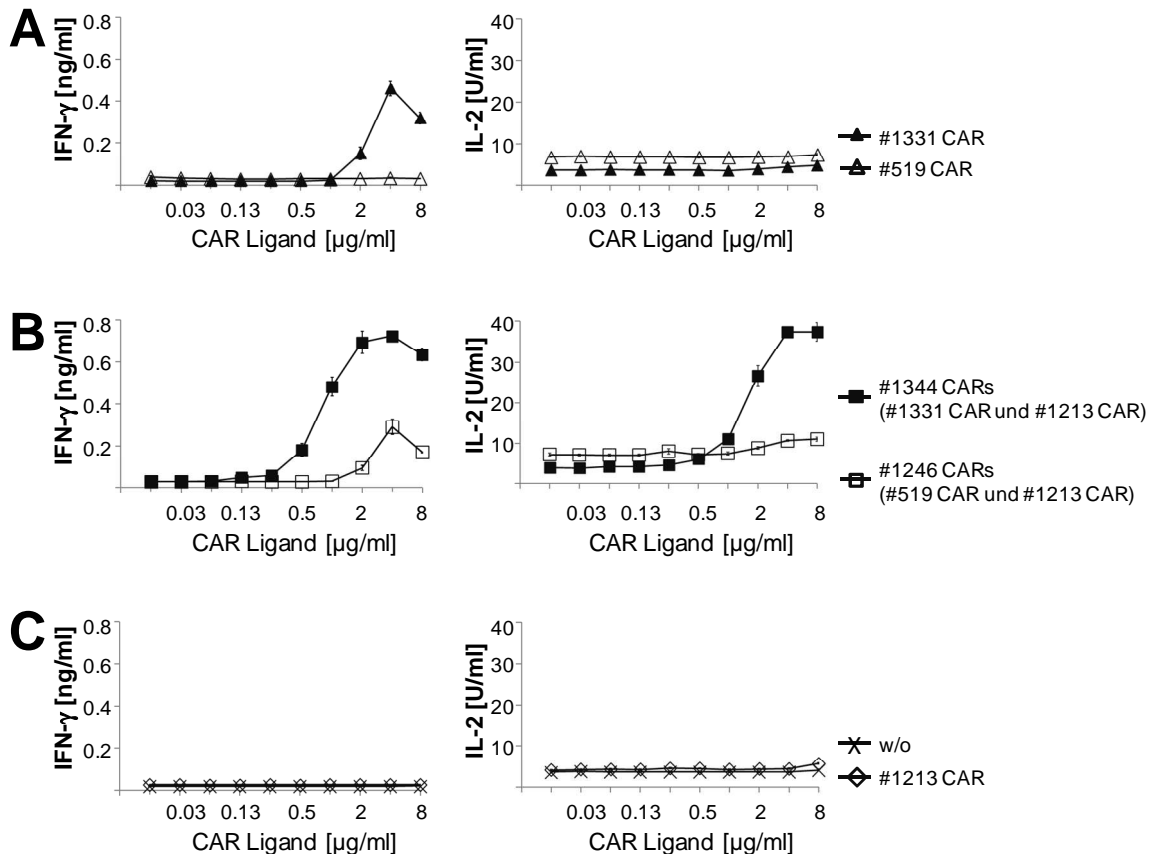


Abbildung 25: Das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR vermindert die Aktivierungsschwelle der T-Zelle.

Der #519 CAR, #1213 CAR oder #1331 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Weiterhin wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1246 ausgestattet, der für den #519 CAR und den #1213 CAR kodiert, oder durch Transduktion des Vektors #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,0156 µg/ml – je 8 µg/ml). Pro Vertiefung wurden 3×10^4 CAR T-Zellen 72 h inkubiert (#519 CAR Ansatz enthält $4,5 \times 10^5$ T-Zellen pro Vertiefung). Als Vergleich dienen nicht-modifizierte T-Zellen. In den Kulturüberständen wurden die Zytokin-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden als Vierfachbestimmung erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C- γ
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.18 Die primäre Tumorzelleliminierung wird durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR erhöht

In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den #519 CAR die Anzahl der anti-CEA CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche erhöht (siehe 4.5) und die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen vermindert (siehe 4.17). Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkung das Einfügen der CD8 Brückendomäne auf die primäre Tumorzelleliminierung durch CAR T-Zellen mit γ CAR allein oder koexprimierten γ und CD28 CARs in einem Mausmodell hat. T-Zellen wurden mit dem γ Primärsignalgeber #519 CAR oder #1331 CAR ausgestattet. Des Weiteren wurden T-Zellen zur Koexpression der CARs mit Hilfe des Vektors #1246 oder #1344 transduziert. Die jeweiligen CAR T-Zellen oder T-Zellen ohne CAR wurden zusammen mit CEA⁺ ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 Maus Tumorzellen in immundefiziente Rag2^{-/-}c γ ^{-/-} Mäuse subkutan inokuliert. Dabei wurden in die linke Flanke nur Tumorzellen, in die rechte Flanke die jeweiligen CAR T-Zellen oder T-Zellen ohne CAR zusammen mit den Tumorzellen injiziert.

Bei Applikation der Tumorzellen mit #519 CAR T-Zellen, die den Primärsignalgeber ohne Brückendomäne exprimieren, wurde kein Effekt auf die Tumorprogression beobachtet (Abb. 26A). Dahingegen wurde durch die #1331 CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne eine effiziente primäre Tumorzelleliminierung induziert. Es fiel auf, dass T-Zellen ohne CAR hingegen das Tumorwachstum förderten. Bei Inokulation der Tumorzellen zusammen mit T-Zellen mit koexprimierten CARs zeigte sich, dass die #1246 CARs T-Zellen, die den Primärsignalgeber ohne Brückendomäne aufweisen, ebenfalls keine primäre Tumorzelleliminierung induzierten (Abb. 26B). Allerdings wurde eine primäre Tumorzelleliminierung bei den Mäusen nachgewiesen, denen #1344 CARs T-Zellen mit CD8 Brückendomäne im γ CAR zusammen mit Tumorzellen appliziert wurden.

Es zeigte sich in diesem Mausmodell, dass das Einfügen der CD8 Brückendomäne bei T-Zellen mit γ CAR allein oder γ CAR und CD28 CAR eine primäre Tumorzelleliminierung induziert. Da diese Beobachtung bei CAR T-Zellen ohne Brückendomäne sowohl bei alleiniger Expression als auch bei Koexpression eines weiteren CAR nicht gemacht wurde, haben wir uns in den nachfolgenden Untersuchungen auf CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne konzentriert.

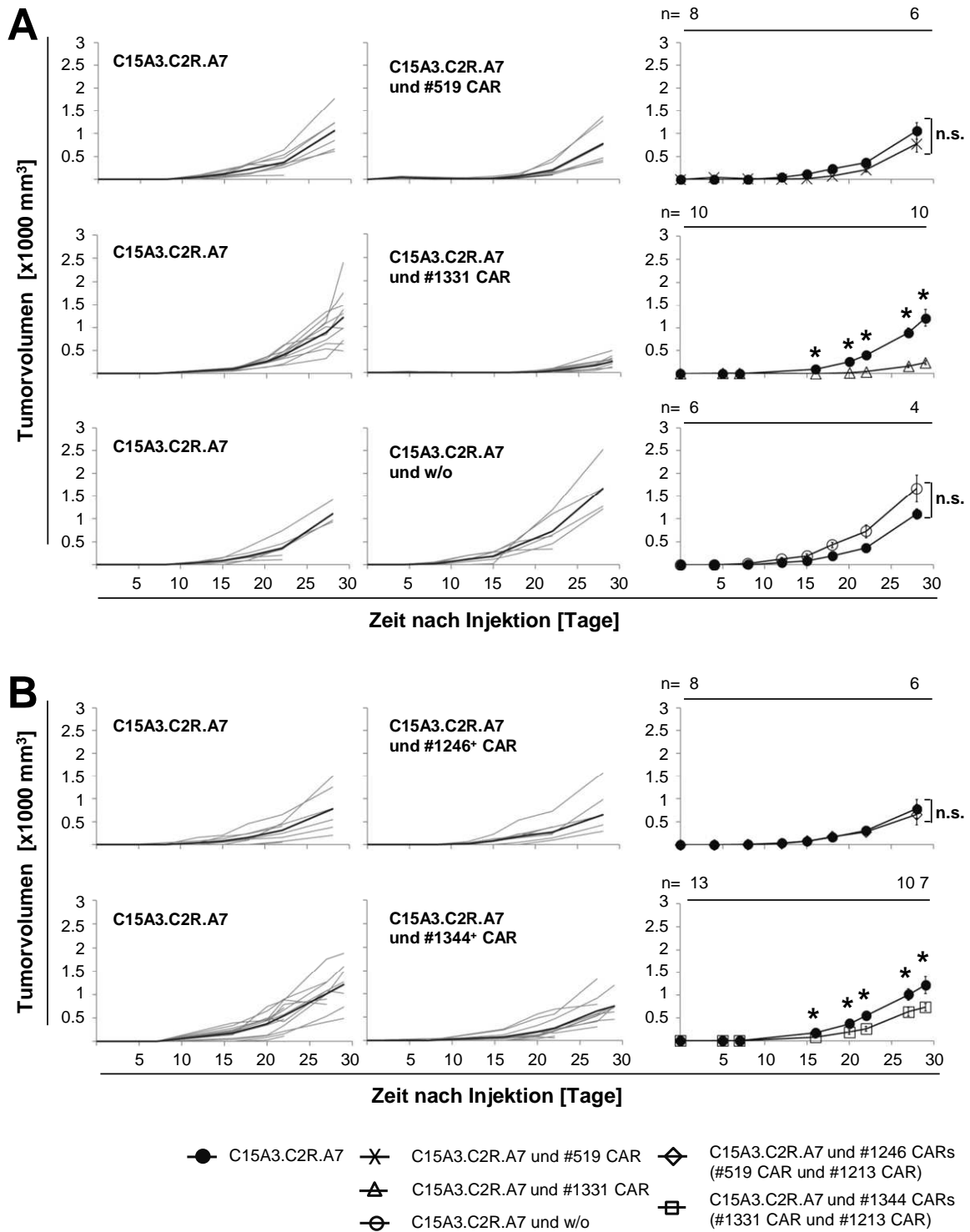


Abbildung 26: Die primäre Tumorzelleliminierung wird durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne in den γ CAR erhöht.

Rag2^{-/-}cy^{-/-} Mäusen wurden CAR T-Zellen und Tumorzellen subkutan koinjiziert (Tag 0). Jeder Maus wurden auf der linken Flanke CEA⁺ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 Tumorzellen (2×10^6 Zellen) subkutan appliziert. Die CEA und ErbB2 Expressionen der verwendeten Maus Tumorzelllinie sind in Abb. 15 dargestellt. Auf der rechten Flanke wurden Tumorzellen (2×10^6 Zellen) zusammen mit #519 CAR T-Zellen (1×10^6 Zellen) oder #1331 CAR T-Zellen (1×10^6 Zellen)

subkutan appliziert (**A**). Die Koinjektion der Tumorzellen (2×10^6 Zellen) zusammen mit nicht-modifizierten T-Zellen (1×10^6 Zellen) diente als Kontrolle. Ebenso wurden auf der rechten Flanke Tumorzellen (2×10^6 Zellen) zusammen mit #1246 CARs T-Zellen (1×10^6 Zellen) oder #1344 CARs T-Zellen (1×10^6 Zellen) inokuliert (**B**). Die Diagramme der linken und mittleren Spalte zeigen die Größe der einzelnen Tumore; die dicke Linie stellt den Mittelwert dar. Die rechts dargestellten Diagramme fassen die Mittelwerte der Tumorumfänge der linken Flanke (Tumorzellen, geschlossene Symbole) und die Mittelwerte der Tumorumfänge der rechten Flanke (Tumorzellen und CAR T-Zellen, offene Symbole) der jeweiligen Gruppe zusammen. Es ist jeweils die Anzahl lebender Mäuse (n) zu den Versuchszeitpunkten angegeben. Die Mittelwerte der Daten sind \pm SEM abgebildet. * $p \leq 0,05$ (T-Test), n.s., nicht signifikant

w/o, ohne („without“) CAR
 #519 CAR, C- γ
 #1246 CARs, C- γ (#519 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.19 Die Qualität der T-Zell Antwort verändert sich bei Aktivierung durch ein simultanes γ und CD28 Signal

Die Aktivierung der T-Zelle führt neben der Sekretion der prominenten Zytokine IFN- γ und IL-2 noch zur Sekretion weiterer Zytokine. Ziel war es zu überprüfen, ob T-Zellen mit einem CAR (#1213 CAR oder #1331 CAR) eine andere Antwort hinsichtlich der sezernierten Zytokine zeigen als T-Zellen mit zwei CARs (#1344 CARs). Dazu wurden Kulturüberstände der T-Zell Aktivierung aus Abb. 24 mittels Bead basiertem Multiplex-Immunoassay näher analysiert. Im Hinblick auf die Quantität der T-Zell Antwort sezernierten T-Zellen nach Stimulation des Primärsignalgebers #1331 CAR allein mehr IL-5 und IL-13, aber weniger IL-17A als #1344 CARs T-Zellen mit zwei CARs (Abb. 27). Es bestätigte sich, dass die Stimulation der #1344 CARs T-Zellen durch BW2064/36 und ErbB2 die IL-2 Sekretion induzierte. T-Zellen mit nur einem CAR wiesen dagegen keine IL-2 Sekretion über Hintergrundsignal auf.

Die Untersuchungen bestätigen, dass sich die Qualität der T-Zell Antwort bei Aktivierung durch ein simultanes γ und CD28 Signal im Hinblick auf die IL-2 Sekretion ändert.

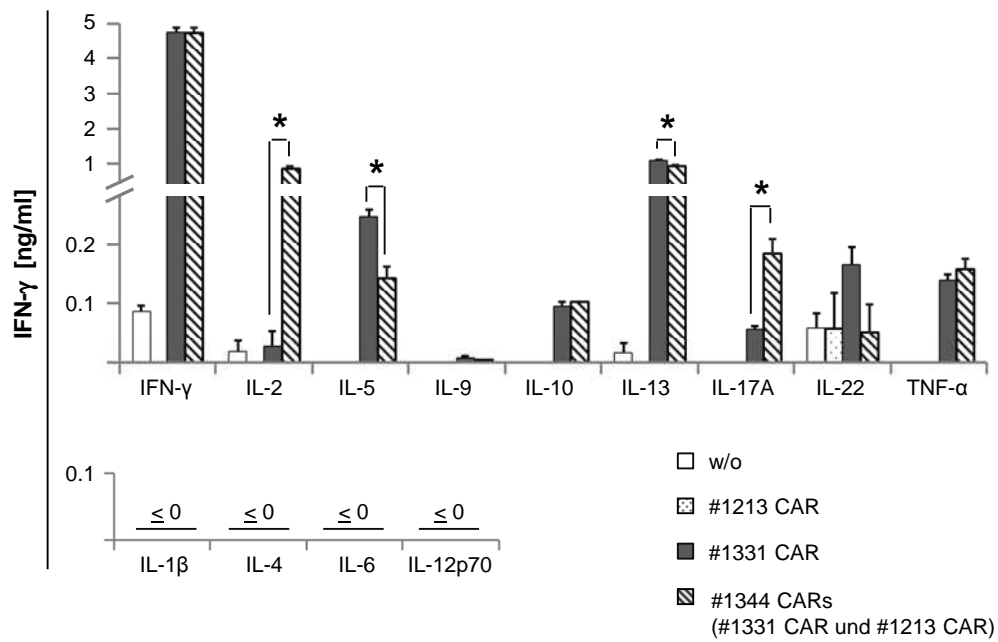


Abbildung 27: Die Qualität der T-Zell Antwort verändert sich bei Aktivierung durch ein simultanes γ und CD28 Signal.

Es wurden mehrere Zytokine in den Kulturüberständen der T-Zell Aktivierung aus Abb. 24 mittels Bead basierendem Multiplex-Immunoassay „Human FlowCytomix Th17 Panel“ bestimmt. Dazu wurden die Zellansätze aus den Inkubationen auf immobilisierten BW2064/36 und ErbB2 (Beschichtungskonzentration jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten (w/o CAR, #1331 CAR, #1344 CARs) und Duplikaten (#1213 CAR) \pm SEM. * $p < 0,05$ (T-Test)

w/o, ohne („without“) CAR
 #1213 CAR, E-Fc-CD28
 #1331 CAR, C-CD8- γ
 #1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

4.20 Die IFN- γ Freisetzung und lytische Degranulation haben die gleiche Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle

CAR T-Zellen weisen eine Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle zur IFN- γ Induktion auf, wie in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt wurde. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Freisetzung der CAR T-Zelle von Granula mit lytischen Effektormolekülen ebenfalls eine Antigen-Abhängigkeit zeigt und ob diese die gleiche Aktivierungsschwelle aufweist. Dazu wurden T-Zellen zur Expression des anti-CEA-CD8- γ CAR (#1331 CAR) transduziert und mit immobilisierten BW2064/36 und ErbB2 inkubiert. Die lytische Degranulation wurde anhand der CD107a Expression der CAR T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 28A). Als Kontrolle dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Die IFN- γ Konzentration im Überstand wurde nach Stimulation der CAR T-Zellen mittels ELISA quantifiziert (Abb. 28B). Es zeigte sich, dass die lytische Degranulation der CAR T-Zelle von der Antigen-Konzentration abhängig war. Der Vergleich mit der CAR-vermittelten T-Zell Aktivierung zur IFN- γ Induktion ergab, dass die lytische Degranulation und die IFN- γ Freisetzung der CAR T-Zelle bei der gleichen Antigen-Konzentration induziert wurden.

Es wurde beobachtet, dass mit Anstieg der Degranulation die Expressionsstärke des CAR abnimmt. Die „mean fluorescence intensity“ (MFI) der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche reduzierte sich auf weniger als die Hälfte (MFI 12 010 bei der Beschichtung 1 $\mu\text{g/ml}$, MFI 5 319 bei der Beschichtung 2 $\mu\text{g/ml}$). Dieses stimmt mit dem allgemeinen Modell überein, dass die Rezeptor-Ligand-Interaktion zur Internalisierung des Rezeptors führt.

Die Daten zeigen, dass die lytische Degranulation und die IFN- γ Freisetzung der CAR T-Zelle die gleiche Aktivierungsschwelle haben. Die lytische Degranulation geht mit einer Internalisierung des CAR einher.

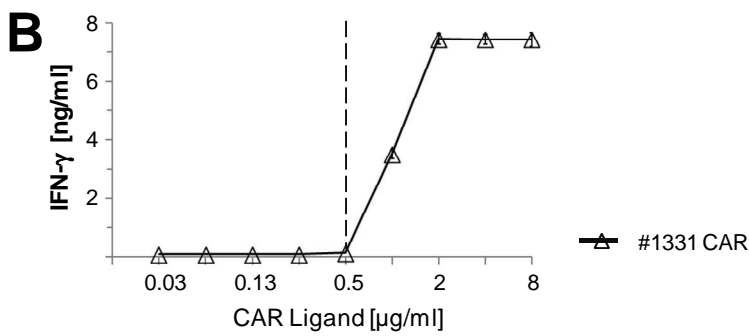
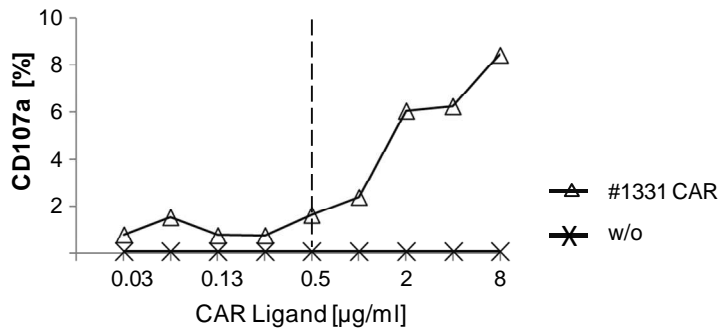
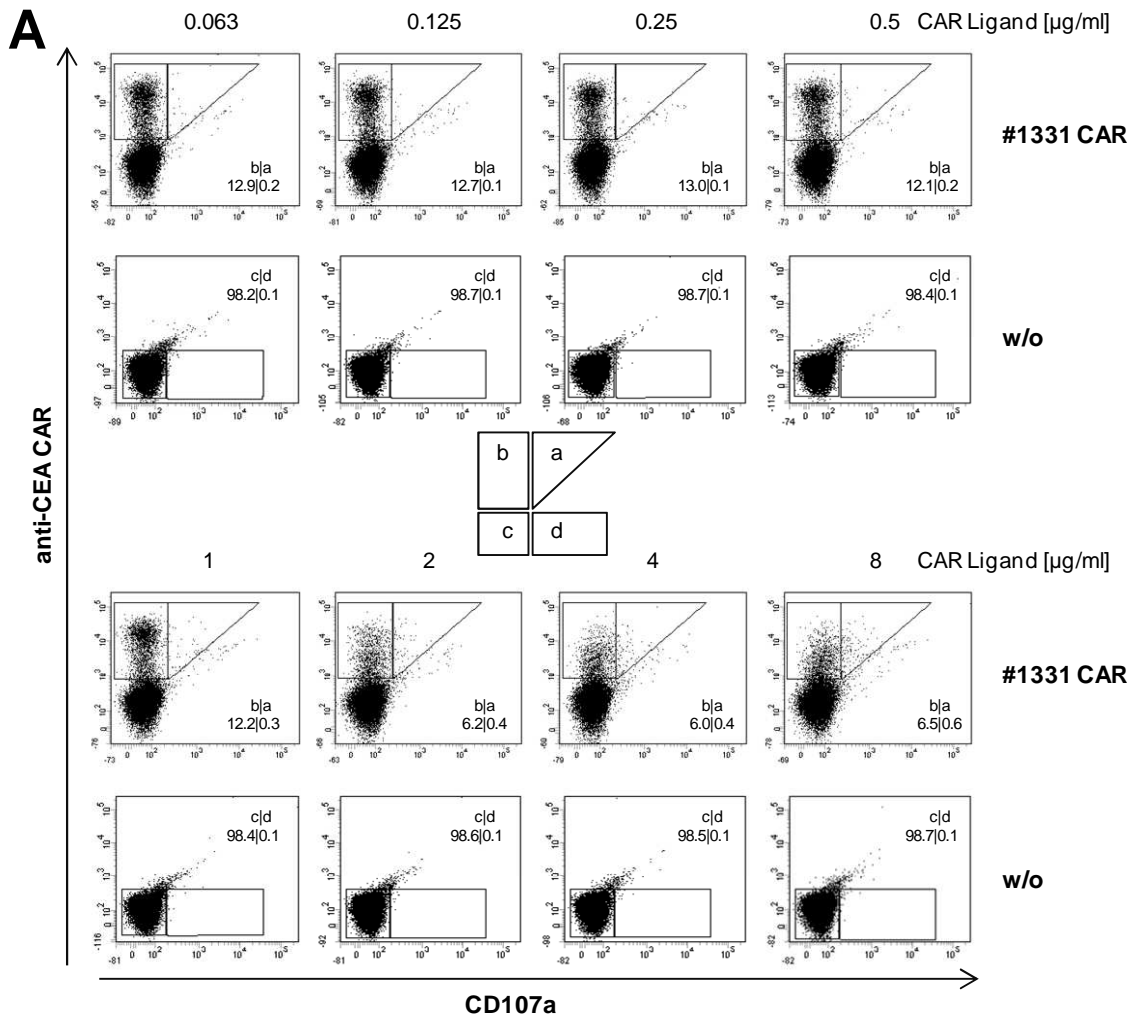


Abbildung 28

Abbildung 28: Die IFN- γ Freisetzung und lytische Degranulation haben die gleiche Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle.

(A) T-Zellen wurden zur Expression des #1331 CAR transduziert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,063 $\mu\text{g/ml}$ – je 8 $\mu\text{g/ml}$) und 3×10^4 CAR T-Zellen pro Vertiefung 4 h inkubiert. Die inkubierten CAR T-Zellen aus je drei Vertiefungen wurden zusammengeführt und mit dem FITC-konjugierten anti-CD107a Antikörper gefärbt. Zum Nachweis des #1331 CAR wurde mit dem anti-idiotypischen BW2064/36 Antikörper und dem sekundären anti-Maus IgG₁-FITC Antikörper inkubiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Das Gate (a) umfasst die #1331 CAR T-Zellen mit CD107a Expression, wobei die spontan degranulierten CD107a⁺ T-Zellen ausgegrenzt wurden. Gate (a) repräsentiert die CAR⁺ CD107a⁺ T-Zellen, (b) die CAR⁺ CD107a⁻ T-Zellen, (c) die CAR⁻ CD107a⁻ T-Zellen und (d) die CAR⁻ CD107a⁺ T-Zellen. Der Anteil CAR⁺ CD107a⁺ T-Zellen (a) an der Gesamtzahl CAR⁺ T-Zellen (a+b) wurde berechnet (Δ), ebenso der Anteil CAR⁻ CD107a⁺ T-Zellen (d) an der Gesamtzahl der nicht-modifizierten T-Zellen (c+d) (X). Die Zahlen in den Dot Plots repräsentieren den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellen von der Gesamtzellzahl. (B) T-Zellen mit #1331 CAR des Transduktionsansatzes (A) wurden auf mit BW2064/36 und ErbB2 beschichteten Mikrotiterplatten (je 0,03 $\mu\text{g/ml}$ – je 8 $\mu\text{g/ml}$) 72h inkubiert (3×10^4 CAR T-Zellen pro Vertiefung). Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden als Dreifachbestimmung erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die gestrichelte Linie zeigt die höchste Beschichtungskonzentration an, die keine Zytokin-Freisetzung oder lytische Degranulation induziert (Aktivierungsschwelle).

w/o, ohne („without“) CAR
#1331 CAR, C-CD8- γ

4.21 Zwei CARs mit getrenntem γ und CD28 Signal haben eine erniedrigte Aktivierungsschwelle bei der Erkennung von Antigen-Mustern im Vergleich zum kombinierten CD28- γ CAR

In der bisherigen Arbeit haben wir die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung durch zwei CARs mit getrennten Signalen untersucht. Im Folgenden vergleichen wir die Aktivierungsschwellen der CAR T-Zellen mit komplementierenden Signaldomänen mit denen der T-Zellen, die einen CAR mit fusionierten Signaldomänen tragen. Hierzu wurden T-Zellen zur Koexpression des #1331 CAR und des #1213 CAR durch den Vektor #1344 transduziert. Hier liegen das Primärsignal und das kostimulatorische Signal auf zwei CAR Molekülen getrennt vor. Des Weiteren wurden T-Zellen mit dem #1601 CAR (C-CD8-CD28- γ) modifiziert. Dieser CAR enthält in einer Polypeptidkette die gleiche Bindedomäne für CEA wie der #1331 CAR, die CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre CD28 und γ Signaldomäne. Die CAR T-Zellen wurden auf den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 inkubiert und die Zytokin-Freisetzung in den Kulturüberständen gemessen.

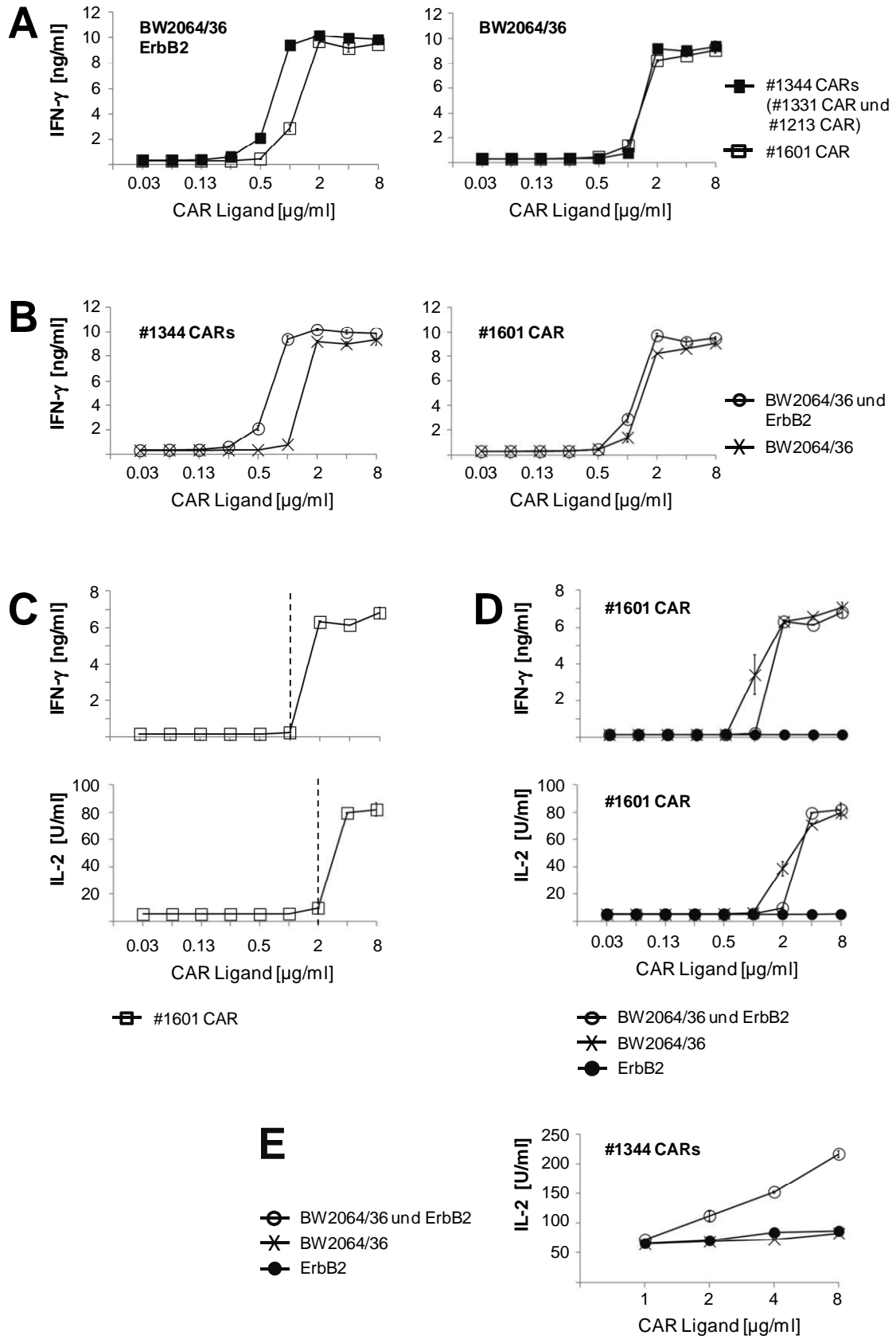


Abbildung 29

Abbildung 29: Zwei CARs mit getrenntem γ und CD28 Signal haben eine erniedrigte Aktivierungsschwelle bei der Erkennung von Antigen-Mustern im Vergleich zum kombinierten CD28- γ CAR.

T-Zellen wurden zur Expression des #1601 CAR transduziert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit zwei CARs ausgestattet. Dafür erfolgte die Transduktion mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,03 $\mu\text{g/ml}$ – je 8 $\mu\text{g/ml}$). Pro Vertiefung wurden 5×10^4 (A, B) oder 3×10^4 (C, D) oder $2,5 \times 10^4$ (E) CAR T-Zellen 48 h (A, B, E) oder 72 h (C, D) inkubiert. Die IFN- γ und IL-2 Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden im Hinblick auf den CAR (A) oder das Antigen (B) ausgewertet: (A) zeigt den Einfluss der Beschichtung mit dem jeweiligen CAR Liganden auf die Aktivierung der T-Zellen mit #1344 CARs oder #1601 CAR. (B) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung der jeweiligen CAR T-Zellen in Abhängigkeit von den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36 oder BW2064/36 und ErbB2. (C) Die IFN- γ Daten der #1601 CAR T-Zellen wurden Abb. 29D entnommen. Die gestrichelte Linie zeigt die Aktivierungsschwelle, die wir als die höchste Beschichtungskonzentration definieren, die keine Zytokin-Freisetzung induziert. (D) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung der #1601 CAR T-Zellen in Abhängigkeit von den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2. (E) Die IL-2 Konzentration der #1344 CARs T-Zellen im Kulturüberstand wurde nach Inkubation mit den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36, ErbB2 oder BW2064/36 und ErbB2 gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM.

#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)
#1601 CAR, C-CD8-CD28- γ

Entgegen der Erwartung zeigte sich, dass #1344 CARs T-Zellen mit voneinander getrenntem γ Primärsignal und CD28 Signal eine niedrigere Antigen-Konzentration zur IFN- γ Induktion benötigten als #1601 CAR T-Zellen mit kombiniertem CD28- γ Signal bei Stimulation durch beide CAR Liganden (Abb. 29A). Hingegen war die Dosis-Abhängigkeit der T-Zell Aktivierung bei Inkubation mit dem anti-CEA CAR Liganden BW2064/36 bei beiden CAR Formaten gleich.

Die Daten zeigen, dass #1344 CARs T-Zellen eine erniedrigte Aktivierungsschwelle aufwiesen bei Bindung an beide CAR Liganden im Vergleich zu der Bindung an den anti-CEA CAR Liganden allein (Abb. 29B). Dieses trifft für T-Zellen mit #1601 CAR nicht zu, die die gleiche Aktivierungsschwelle nach Bindung an den anti-CEA CAR Liganden in Gegenwart oder Abwesenheit von ErbB2 hatten.

Die Induktion der IFN- γ Freisetzung bei T-Zellen mit #1601 CAR erfolgte bei einer niedrigeren Antigen-Konzentration als die Induktion der IL-2 Freisetzung (Abb. 29C). Die #1601 CAR T-Zellen zeigten bei Stimulation durch BW2064/36 oder BW2064/36 und ErbB2 sowohl eine IFN- γ als auch IL-2 Freisetzung (Abb. 29D). Dieses steht im Gegensatz zu den Daten mit #1344 CARs T-Zellen, bei denen eine IL-2 Induktion nur

nach Bindung an beide CAR Liganden erfolgte, nicht aber nach Bindung nur eines CAR Liganden (Abb. 29E).

Wir schließen daraus, dass #1344 CARs T-Zellen mit getrennten Signalen Antigen-Muster erkennen im Gegensatz zu #1601 CAR T-Zellen mit kombiniertem CD28- γ Signal. Dies geht einher mit der Erniedrigung der Aktivierungsschwelle der #1344 CARs T-Zellen für IFN- γ sowie der IL-2 Sekretion nach Bindung beider CAR Liganden.

4.22 Die erhöhte Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen mit fusioniertem Primärsignal und CD28 Kostimulation bleibt auch bei einem ζ Primärsignal erhalten

In dieser Arbeit wurden T-Zellen generiert, deren Primärsignal von der Fc ϵ RI γ Kette geliefert wurde. In folgendem Versuch wurde der #607 CAR mit CD28- ζ Kette zum Vergleich herangezogen, der ein starkes Primärsignal durch die CD3 ζ Kette liefert. T-Zellen wurden zur Koexpression der CARs mit getrennten Signalen durch den Vektor #1344 oder zur Expression des CAR Primärsignalgebers allein mit dem Vektor #1331 transduziert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit dem #607 CAR, der das CD28 Signal mit dem ζ Signal in einer Signalkette kombiniert, oder dem #700 CAR, der nur das ζ Signal trägt, ausgestattet. Die Inkubation der jeweiligen CAR T-Zellen erfolgte auf den immobilisierten CAR Liganden BW2064/36 und ErbB2. Dabei zeigte sich, dass auch #607 CAR T-Zellen mit kombiniertem CD28- ζ Signal eine höhere Antigen-Konzentration zur IFN- γ Induktion benötigten als #1344 CARs T-Zellen mit getrenntem γ Primärsignal und CD28 Signal (Abb. 30A). Dieses wurde beobachtet, obwohl der CD28 CAR der #1344 CARs T-Zellen in geringerer Dichte auf der T-Zell Oberfläche exprimiert wurde als der #607 CAR. Für die Induktion der IL-2 Sekretion wurde hingegen die gleiche Aktivierungsschwelle der CARs bei getrennten und kombinierten Signalen festgestellt. Es wurde wie zuvor (siehe Abb. 24) beobachtet, dass die Induktion der IL-2 Sekretion bei #1344 CARs T-Zellen mehr Antigen erfordert als die IFN- γ Induktion (Abb. 30B). Im Gegensatz dazu wiesen die IL-2 und IFN- γ Freisetzung bei #607 CAR T-Zellen mit kombinierten Signalen die gleiche Aktivierungsschwelle auf.

Des Weiteren wurde sowohl im Fall der getrennten als auch der kombinierten Signale untersucht, wie sich die Aktivierungsschwellen der T-Zellen mit dem Primärsignal allein (#1331 CAR, #700 CAR) im Vergleich zu denen der T-Zellen mit beiden Signalen (#1344 CARs, #607 CAR) verhalten. Der Primärsignalgeber #1331 CAR wird bei alleiniger Expression in höherer Anzahl auf der T-Zell Oberfläche exprimiert als bei Koexpression mit dem kostimulatorischen #1213 CAR (#1344 CARs) (vgl. Abb. 23). Es bestätigte sich die Beobachtung (siehe Abb. 19B), dass die IFN- γ Freisetzung der #1331 CAR T-Zellen eine höhere Aktivierungsschwelle zeigt als die der #1344 CARs T-Zellen (Abb. 30C).

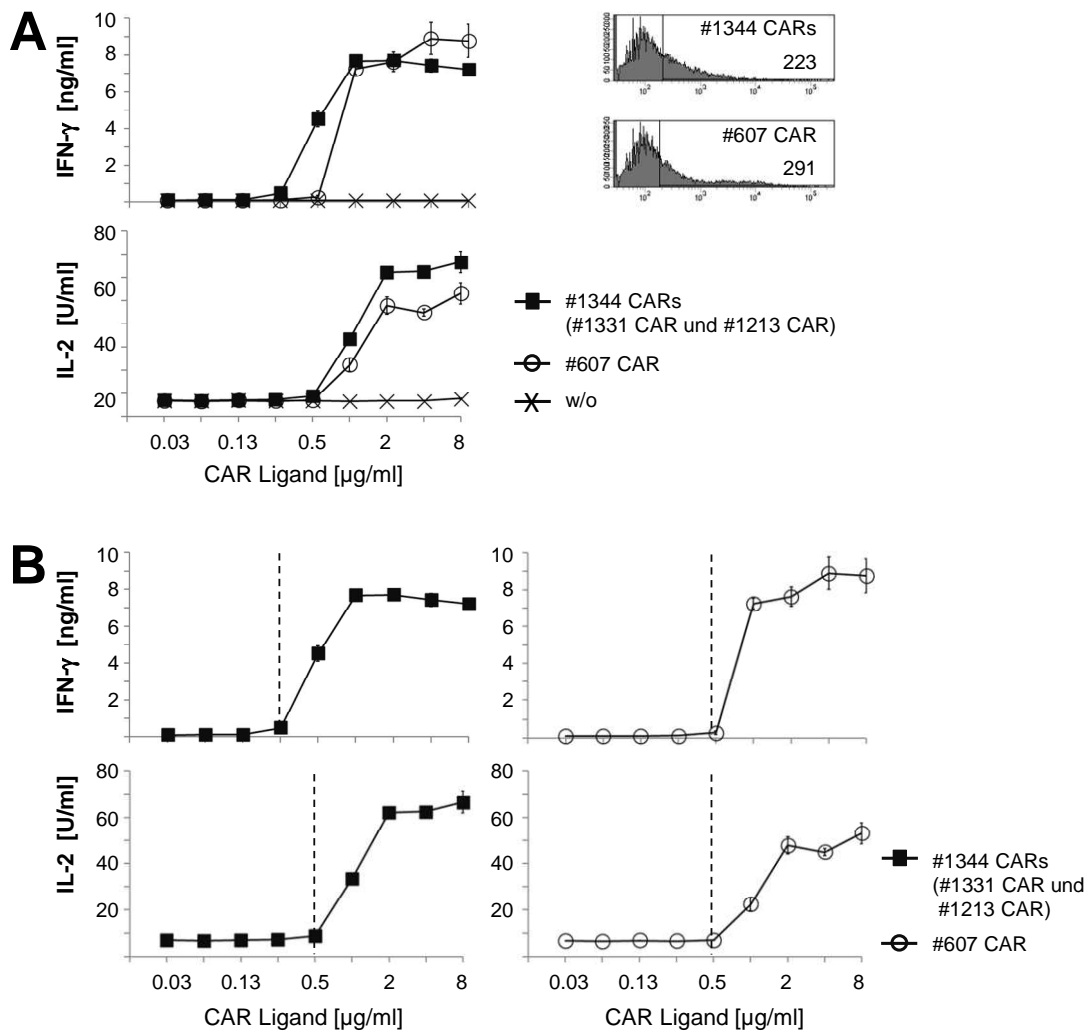


Abbildung 30

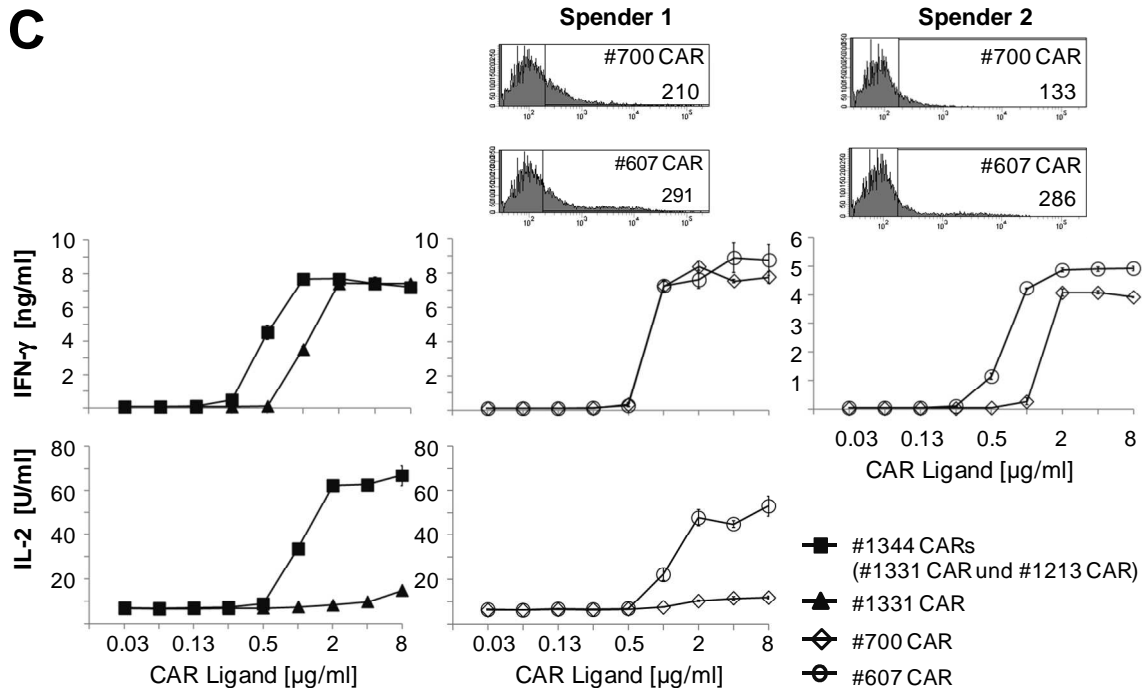


Abbildung 30: Die erhöhte Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen mit fusioniertem Primärsignal und CD28 Kostimulation bleibt auch bei einem ζ Primärsignal erhalten.

T-Zellen wurden zur Expression des #607 CAR, #700 CAR oder #1331 CAR transduziert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit zwei CARs ausgestattet. Dafür erfolgte die Transduktion mit dem Vektor #1344, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Mikrotiterplatten wurden mit BW2064/36 und ErbB2 in gleichen Konzentrationen beschichtet (je 0,03 μ g/ml – je 8 μ g/ml). Pro Vertiefung wurden 3×10^4 CAR T-Zellen 72 h inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-modifizierte T-Zellen. Die IFN- γ Konzentration und IL-2 Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden in folgender Weise ausgewertet: (A) stellt die IFN- γ und IL-2 Sekretionen der #1344 CARs T-Zellen und die der #607 CAR T-Zellen dar. (B) zeigt die Aktivierungsschwellen für die IFN- γ und IL-2 Sekretionen (gestrichelte Linie) der jeweiligen CAR T-Zellen. (C) zeigt den Vergleich der Zytokin-Sekretionen der #1344 CARs T-Zellen mit #1331 CAR T-Zellen und der #607 CAR T-Zellen mit #700 CAR T-Zellen zweier Spender. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die IFN- γ Daten der #1331 CAR T-Zellen wurden Abb. 28B entnommen. Die Expression des jeweiligen CAR wurde durchflusszytometrisch mit FITC-konjugiertem anti-human IgG Antikörper bestimmt und in einem Histogramm dargestellt. Mit dieser Färbung wird bei den #1344 CARs T-Zellen der CD28 CAR nachgewiesen. Die Zahl in dem jeweiligen Histogramm zeigt die „mean fluorescence intensity“ (MFI) des CAR an.

w/o, ohne („without“) CAR
#607 CAR, C-Fc-CD28-CD3 ζ
#700 CAR, C-Fc-CD3 ζ
#1331 CAR, C-CD8- γ
#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

Im Gegensatz dazu wiesen die #700 CAR T-Zellen die gleiche Aktivierungsschwelle für die Induktion der IFN- γ Sekretion auf wie die #607 CAR T-Zellen, obwohl in diesem Fall der #700 CAR in niedrigerer Anzahl auf der T-Zell Oberfläche exprimiert wurde als der #607 CAR mit kombiniertem CD28- ζ Signal. Bei einer Expressionsdichte des #700 CAR von weniger als die Hälfte der des #607 CAR war die Aktivierungsschwelle des #700 CAR höher als die des #607 CAR. Eine IL-2 Sekretion wurde nur bei getrenntem (#1344 CARs) oder kombiniertem (#607 CAR) Primärsignal und CD28 Signal induziert, nicht bei dem jeweiligen Primärsignalgeber allein (#1331 CAR, #700 CAR). Dies steht im Einklang mit den Daten in Abb. 24.

Es wurde gezeigt, dass #607 CAR T-Zellen mit kombiniertem CD28 und CD3 ζ Signal eine höhere Schwelle zur IFN- γ Freisetzung haben als #1344 CARs T-Zellen mit getrenntem γ Primärsignal und CD28 Kostimulation. Die Aktivierungsschwelle zur IL-2 Freisetzung war bei #1344 CARs T-Zellen und #607 CAR T-Zellen hingegen gleich.

4.23 Die Koexpression des γ und CD28 CAR vermittelt eine selektive T-Zell Aktivierung durch Zielzellen mit beiden CAR Liganden

Die vorhergehenden Daten zeigen, dass #1344 CARs T-Zellen bei Bindung beider immobilisierter CAR Liganden durch den γ CAR und den CD28 CAR eine bevorzugte Aktivierung im Vergleich zur Aktivierung durch Bindung eines CAR Liganden aufweisen (siehe Abb. 19A). Im Folgenden wurde untersucht, ob eine selektive Aktivierung der #1344 CARs T-Zellen ebenfalls bei Bindung an Tumorzellen mit beiden CAR Liganden erfolgt. Die Expression der Antigene auf Tumorzellen bildet annähernd die physiologische Situation ab. T-Zellen wurden zur Koexpression des γ CAR und CD28 CAR mit dem Vektor #1344 transduziert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit #1331 CAR (γ Primärsignal) oder #1213 CAR (CD28 Kostimulation) ausgestattet. Diese T-Zellen wurden mit CEA⁺ ErbB2⁺ Tumorzellen C15A3.C2R.A7, CEA⁺ ErbB2⁻ Tumorzellen C15A3, CEA⁻ ErbB2⁺ Tumorzellen MC38.B2.III.C1 oder CEA⁻ ErbB2⁻ Tumorzellen MC38 koinkubiert. MC38 Zellen sind die parentalen Zellen der Linie C15A3. Die jeweiligen CAR T-Zellen und Tumorzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen koinkubiert. Hierbei zeigte sich, dass #1344 CARs T-Zellen bei Koinkubation mit Tumorzellen, die CEA und ErbB2 exprimieren, bevorzugt stimuliert wurden im Vergleich zur Koinkubation mit Tumorzellen, die nur einen der CAR

Liganden exprimieren (Abb. 31A). Die Inkubation mit CEA⁺ ErbB2⁺ Tumorzellen C15A3.C2R.A7 sowie CEA⁺ ErbB2⁻ Tumorzellen C15A3 induzierte hingegen bei T-Zellen mit #1331 CAR eine ähnliche IFN- γ Sekretion. Die IFN- γ Freisetzung war bei Koinkubation von 2×10^4 #1344 CARs T-Zellen mit Tumorzellen, die beide CAR Liganden exprimieren (CEA⁺ ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7), höher als bei Koinkubation mit Tumorzellen, die nur die CEA Expression aufweisen (CEA⁺ ErbB2⁻ C15A3). Dieser Unterschied war bei CAR T-Zellen mit dem #1331 Primärsignalgeber allein nicht zu sehen. Die Koinkubation mit dem kostimulatorischen #1213 CAR zeigte keine Aktivierung der T-Zelle über Hintergrund, der durch die Verwendung von T-Zellen ohne CAR angezeigt wurde.

Die Daten wurden außerdem hinsichtlich der CAR-vermittelten Aktivierung nach Bindung an CEA und ErbB2 auf CEA⁺ ErbB2⁺ Tumorzellen C15A3.C2R.A7 ausgewertet. Die T-Zellen mit den koexprimierten CARs #1331 und #1213 (#1344 CARs) und T-Zellen mit #1331 CAR allein wurden ab demselben T-Zell zu Tumorzell Verhältnis zur IFN- γ Sekretion stimuliert (Abb. 31B). Allerdings war die IFN- γ Freisetzung der T-Zellen mit beiden CARs (#1344 CARs) bei Koinkubation von 2×10^4 CAR T-Zellen mit CEA⁺ ErbB2⁺ Tumorzellen C15A3.C2R.A7 höher als bei T-Zellen mit #1331 CAR allein.

Wir schließen daraus, dass die Koexpression des γ CAR und CD28 CAR eine selektive Aktivierung durch Zellen mit beiden CAR Liganden gegenüber Zellen mit einem CAR Liganden aufweisen. Des Weiteren zeigen Zellen mit γ und CD28 CAR eine höhere Aktivierung im Vergleich zu T-Zellen mit γ CAR allein durch Zellen mit beiden CAR Liganden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass T-Zellen mit beiden CARs selektiv auch durch Bindung an beide immobilisierte CAR Liganden aktiviert werden.

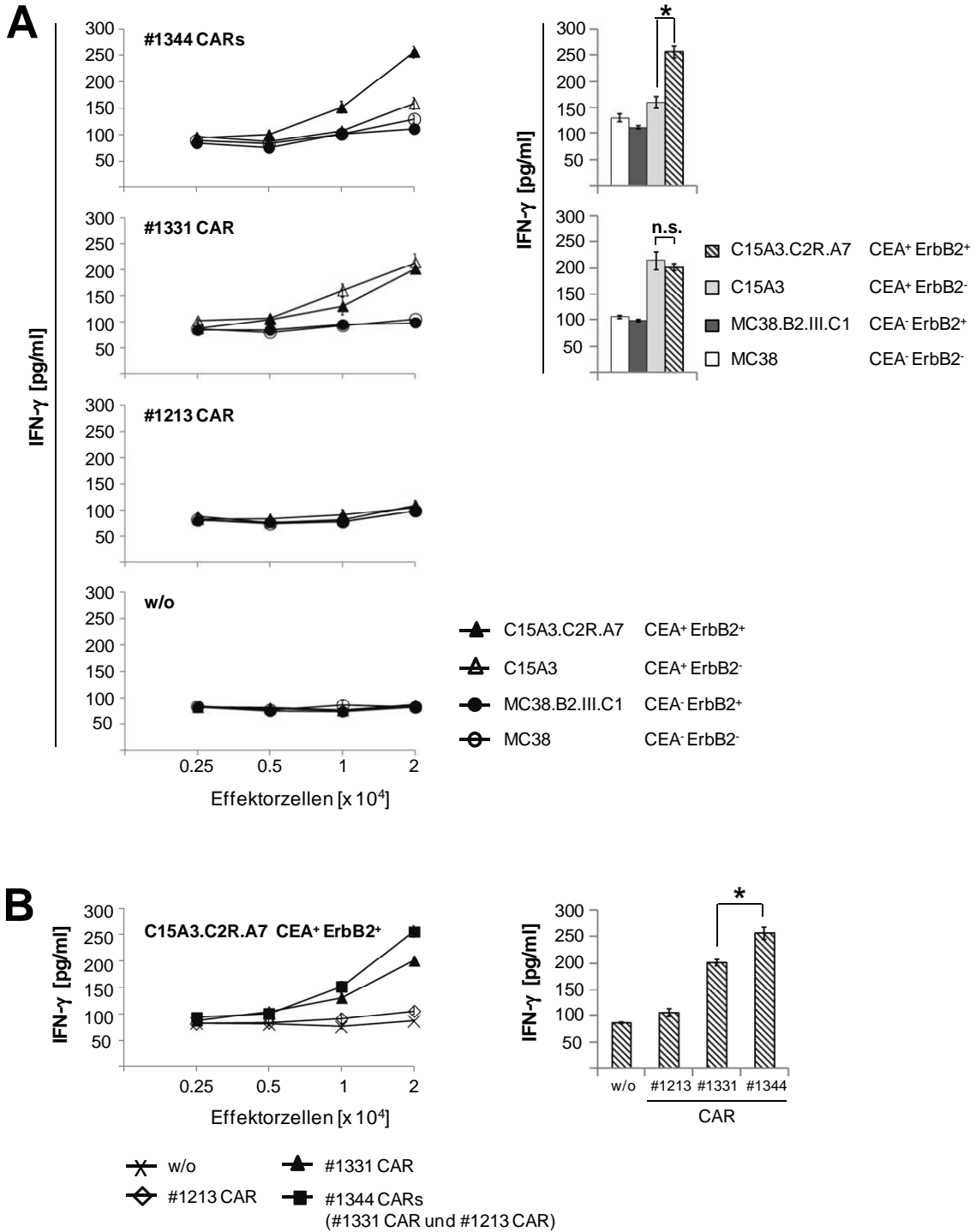


Abbildung 31: Die Koexpression des γ und CD28 CAR vermittelt eine selektive T-Zell Aktivierung durch Zielzellen mit beiden CAR Liganden.

Der #1213 CAR oder #1331 CAR wurde in T-Zellen exprimiert. Des Weiteren wurden T-Zellen mit zwei CARs durch Transduktion des Vektors #1344 ausgestattet, der für den #1331 CAR und den #1213 CAR kodiert. Die jeweiligen CAR T-Zellen ($0,25-2 \times 10^4$ Effektorzellen pro Vertiefung) wurden 48 h mit CEA⁺ ErbB2⁺ Tumorzellen C15A3.C2R.A7 (1×10^4 Zellen pro Vertiefung), CEA⁺ ErbB2⁻ Tumorzellen C15A3 (2×10^4 Zellen pro Vertiefung), CEA⁻ ErbB2⁺ Tumorzellen MC38.B2.III.C1 ($1,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung) oder CEA⁻ ErbB2⁻ Tumorzellen

MC38 (2×10^4 Zellen pro Vertiefung) inkubiert. Die Koinkubation der nicht-modifizierten T-Zellen mit den jeweiligen Tumorzellen diente als Kontrolle. In den Kulturüberständen wurde die IFN- γ Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden im Hinblick auf die Zielzellen (A) oder den CAR (B) ausgewertet. (A) zeigt die konzentrationsabhängige IFN- γ Sekretion der jeweiligen CAR T-Zellen in Abhängigkeit von den Tumorzellen. Die Balkendiagramme stellen die Messdaten nach Koinkubation der 2×10^4 CAR T-Zellen mit Tumorzellen dar. (B) zeigt die konzentrationsabhängige Aktivierung der verschiedenen CAR T-Zellen ($0,25$ – 2×10^4 Effektorzellen pro Vertiefung) nach Koinkubation mit CEA⁺ErbB2⁺ C15A3.C2R.A7 Tumorzellen (1×10^4 Zellen pro Vertiefung). Die IFN- γ Konzentration nach Koinkubation der 2×10^4 Effektorzellen mit Tumorzellen wurde zusätzlich in der Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. * $p < 0,05$ (T-Test), n.s., nicht signifikant

w/o, ohne („without“) CAR
#1213 CAR, E-Fc-CD28
#1331 CAR, C-CD8- γ
#1344 CARs, C-CD8- γ (#1331 CAR) und E-Fc-CD28 (#1213 CAR)

5 Diskussion

Bei der adoptiven Immuntherapie besteht die Gefahr einer lebensbedrohlichen Autoimmunreaktion der CAR T-Zellen gegen gesundes Gewebe, da die meisten Tumorantigene zwar Tumor-assoziiert, jedoch nicht Tumor-selektiv sind. Bei dem hier realisierten Konzept der kombinatorischen Antigen-Erkennung machen wir uns zunutze, dass Tumorzellen meist ein heterogenes Antigen-Muster aufweisen, das sie von gesunden Zellen unterscheidet. In dieser Arbeit wurden T-Zellen mit koexprimierten CARs gegen CEA und ErbB2 ausgestattet, die sich funktionell nur dann komplementieren, wenn beide Zielantigene erkannt werden. Die zentrale Fragestellung hierbei war, die T-Zell Aktivierung durch zwei CARs zu charakterisieren, insbesondere hinsichtlich der Frage, ob die T-Zell Erkennung zugunsten von Tumorzellen mit zwei Antigenen verschoben wird.

Zur Koexpression beider CARs wurden bicistronische Expressionskassetten verwendet, welche die beiden kodierenden DNS-Sequenzen über ein P2A Peptid verknüpfen. Dadurch wird eine Translation der CARs in äquimolaren Mengen gewährleistet. Auf der T-Zell Oberfläche wurde der γ CAR jedoch in geringerer Menge exprimiert als der CD28 CAR. Wir nehmen an, dass dieses ein strukturelles Phänomen der CARs ist, die die γ Signalkette ohne Brückendomäne aufweisen, da ein Rezeptor gleichen modularen Aufbaus mit anderer Bindedomäne ebenfalls eine geringe Expression auf T-Zellen zeigte. Die Expression des γ CAR auf der T-Zell Oberfläche wurde durch das Einfügen der CD8 Brückendomäne erhöht.

CARs liegen vor allem als Homodimere und im Falle der Koexpression mit einem anderen CAR auch als Heterodimere vor (Riët, 2010). Da wir annehmen, dass der jeweilige CAR als Homodimer exprimiert wird, ist von besonderem Interesse, ob der γ und der CD28 CAR ebenfalls Heterodimere bilden. Bei CAR Heterodimeren würde vermutlich die Signalrekrutierung auch nach Bindung nur eines der Antigene erfolgen. Reduziert sich allerdings die Zahl der Heterodimere, so würden das Primärsignal und das CD28 kostimulatorische Signal nur dann komplementieren, wenn beide CARs ihr Zielantigen erkennen. In dieser Arbeit wurde der Frage mit Hilfe eines ELISAs nachgegangen. Dabei wurden koexprimierte CARs aus dem Lysat modifizierter T-Zellen durch Bindung an den anti-CEA CAR Liganden immobilisiert. Der kopräzipitierte anti-ErbB2 CAR wurde durch steigende Salzkonzentration ausgetrieben. Wir schließen daraus, dass die CARs mit dem Aufbau CD8- γ und Fc-CD28 nicht-kovalente Heterodimere ausbilden. Diese Beobachtung schließt allerdings nicht aus,

dass auch Homodimere gebildet werden können. Im Gegensatz dazu bilden CARs, die beide mit einer Fc Brückendomäne ausgestattet sind, Disulfidbrücken über die Cysteinreste in den Brückendomänen aus und liegen somit als kovalente Heterodimere vor. Als Konsequenz würden nach Bindung eines Antigens beide Signale rekrutiert werden und die Möglichkeit der Komplementation des Primärsignals mit dem kostimulatorischen Signal nur bei Bindung beider Antigene verloren gehen. Deswegen wurden in dieser Arbeit CARs verwendet, die nicht-kovalente Heterodimere ausbilden.

Die Bindung einer γ CAR T-Zelle an ihren Liganden resultierte in einer IFN- γ Sekretion, die bei T-Zellen mit CD8- γ CAR nochmals gesteigert war. Die Anzahl der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche ist bei CD8- γ CAR T-Zellen mit Brückendomäne höher als bei γ CAR T-Zellen ohne Brückendomäne, was anzeigt, dass die CAR Anzahl einen Faktor für die Antigen-Sensitivität der T-Zelle darstellt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die IFN- γ Sekretion mit der Anzahl der TCR Moleküle einhergeht, die durch MHC-Peptid Bindung aktiviert wurden (Valitutti et al., 1995). Die TCR/MHC Bindung führt zur Internalisierung des Rezeptors, weshalb die Verminderung der Anzahl der TCR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche mit der TCR Aktivierung und der IFN- γ Freisetzung korreliert (Valitutti et al., 1996).

In unserem Modell wählten wir CD28 als kostimulatorische Domäne, um uns an dem Aufbau des physiologischen TCR zu orientieren. Beim TCR trägt CD28 sowohl qualitativ durch IL-2 Sekretion als auch quantitativ zur T-Zell Aktivierung durch Rekrutierung von Mikrodomänen in der Zellmembran, sog. Rafts, und Lck in die immunologische Synapse bei (Lanzavecchia und Sallusto, 2001; Tavano et al., 2004). Dies geschieht u. a. durch den Umbau des Zytoskeletts und bewirkt, dass sich Membranstücke mit Zytoskelett-vernetzten Molekülen in die Synapse bewegen (Wülfing und Davis, 1998). Hierfür assoziiert CD28 mit dem Aktin-bindenden Filamin A (FLNa), welches die CD28 Signalgebung nach Rekrutierung in die immunologische Synapse organisiert (Tavano et al., 2006). Wir nehmen deshalb an, dass ein Unterschied besteht, ob das Primärsignal und das CD28 kostimulatorische Signal in einem Rezeptormolekül geschaltet sind (Signale in cis) oder auf zwei Rezeptoren aufgeteilt werden (Signale in trans). Letzteres ermöglicht die Rekrutierung von Rafts und die Synapsenformation in einer Art wie es beim TCR geschieht, was bei einem Rezeptor mit Signalen in cis in dieser Form vermutlich nicht erfolgt.

CD28 nimmt unter den kostimulatorischen Molekülen eine besondere Rolle ein, da neben der Proliferation IL-2 induziert wird, was bei OX40, 4-1BB, CD40L oder CD27

nicht der Fall ist (Inman et al., 2007; Hombach und Abken, 2007). Wir verwendeten deshalb IL-2 als Marker für die funktionelle Komplementation der CD28 Kostimulation mit dem Primärsignal.

Es wurde der Frage nachgegangen, ob CAR T-Zellen, die sowohl den γ CAR als auch den CD28 CAR exprimieren, bei Stimulation durch beide Antigene eine CAR-vermittelte Aktivierung aufweisen. Hierbei erwarten wir bei Bindung an beide Antigene eine funktionelle Komplementation des γ Signals und CD28 Signals und infolgedessen eine zusätzliche IL-2 Sekretion. Die Aktivierung einer CAR T-Zelle durch das CD28 Signal allein führte zu keiner IFN- γ Freisetzung. Hingegen induzierte die Kombination des CD28 kostimulatorischen Signals mit dem γ Primärsignal bei Bindung beider Antigene durch Komplementation der Signale eine IFN- γ und IL-2 Sekretion.

Die Effektorfunktionen und die daraus resultierende Immunantwort einer T-Zelle hängen maßgeblich von dem Sekretionsprofil der Zytokine nach Aktivierung des TCR Komplexes ab. Daher stellten wir uns die Frage, ob die Höhe der T-Zell Aktivierung durch den koexprimierten CD8- γ CAR und CD28 CAR von der Dosis des jeweiligen Antigens abhängig ist, wobei beide Antigene simultan angeboten wurden. Dazu wurde die Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CARs durch Antigen untersucht, wobei die Konzentration des einen Liganden konstant war, während die des anderen Liganden abnahm. Die Stimulation des Primärsignalgebers induzierte eine größere IFN- γ Sekretion als die des kostimulatorischen CD28 Signals. Beim Erreichen der maximalen Aktivierung durch das γ Signal hatte die zusätzliche CD28 Kostimulation nur einen geringen Effekt auf die Höhe der IFN- γ Freisetzung. Eine starke Stimulation des CD8- γ CAR bei schwacher CD28 Kostimulation führte zu einer höheren T-Zell Aktivierung als eine schwache Stimulation des CD8- γ CAR bei starker CD28 Kostimulation, was die Dominanz des Primärsignals in der T-Zell Aktivierung zeigt. Dies ist mit dem Standard-Modell der TCR-vermittelten T-Zell Aktivierung vereinbar.

Des Weiteren wurde diese Situation nach Minderung des Primärsignals untersucht. Dieses wurde durch Deletion der CD8 Brückendomäne erreicht, wodurch eine geringere Anzahl der γ CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche exprimiert wurde. Dadurch und durch Bindung an einen niederaffinen anti-CEA CAR Liganden wurde die primäre Aktivierung der T-Zelle geringer, der verstärkende Effekt der CD28 Kostimulation blieb jedoch weiterhin erhalten. Für die klinische Anwendung kann man sich die Reduktion der Primäraktivierung zunutze machen, um unerwünschte Wirkungen der CAR T-Zellen auf gesunde Zellen, die nur ein Antigen exprimieren, zu

reduzieren. Bei Tumorzellen sind häufig weitere Antigene exprimiert, die als Zielstrukturen für die zusätzliche Kostimulation zur Steigerung der T-Zell Aktivierung verwendet werden können. Im Idealfall verfügt der Primärsignalgeber über eine so geringe Aktivierungskapazität, dass er allein keine T-Zell Aktivierung hervorruft, jedoch bei funktioneller Komplementation mit dem CD28 Signal durch einen zweiten CAR zu einer effizienten Aktivierung der T-Zelle führt. Durch Reduktion des Primärsignals und durch eine gleichzeitige Kostimulation sensibilisieren wir die CAR T-Zelle für die kombinatorische Antigen-Erkennung. Der Einfluss der Kostimulation ist umso stärker, je schwächer die Stimulation durch den Primärsignalgeber ist.

Für den TCR wird beschrieben, dass sich bei schwacher Primärstimulation der Anteil der Kostimulation in der immunologischen Synapse erhöht (Yokosuka und Saito, 2009). Es wird ein „TCR-CD28 microcluster“ Modell postuliert, entsprechend dem die Kostimulation die T-Zell Antwort dynamisch je nach Stärke der TCR Stimulation reguliert. Hierfür ist eine Voraussetzung, dass Primärsignal und Kostimulation räumlich getrennt sind, was wir in unserem CAR Modell durch Trennen der Signale auf zwei Rezeptoren erreichen.

Eines der Hauptziele der Arbeit ist es, für die verwendeten CAR Formate die jeweiligen Aktivierungsschwellen zu definieren und Unterschiede herauszuarbeiten. Die meisten Untersuchungen wurden mit immobilisierten, gereinigten Antigenen durchgeführt, um die Antigen-Konzentrationen zu titrieren und Faktoren, die bei der Verwendung von Zielzellen interferieren, auszuschließen, wie z. B. kostimulatorische oder inhibitorische Liganden.

In dieser Arbeit definieren wir die Aktivierungsschwelle als die höchste Antigen-Konzentration, bei der keine CAR-induzierte Zytokin-Freisetzung erfolgt. Diese Definition trägt der Tatsache Rechnung, dass T-Zellen auch bei geringen Antigen-Konzentrationen aktiviert werden können, die weit unterhalb der halb-maximalen Effektivdosis (ED50) liegen. Die ED50 berücksichtigt die Abhängigkeit der T-Zell Aktivierung von der Antigen-Dosis nicht hinreichend bezüglich geringer Antigen-Mengen. Zur Bestimmung der Aktivierungsschwellen wurden der anti-CEA und der anti-ErbB2 CAR Ligand in einer Verdünnungsreihe titriert. Wir bestimmten die IFN- γ Freisetzung als Maß für die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung.

Die Untersuchungen zur Titration der Antigene bestätigten unsere Annahme, dass sich das Primärsignal und das CD28 Signal in T-Zellen mit koexprimierten CARs bei simultaner Bindung beider Antigene funktionell komplementieren und dadurch die

Aktivierungsschwelle für die IFN- γ Freisetzung im Vergleich zur Bindung eines Antigen reduziert wird. Gleichfalls zeigte sich, dass die Aktivierungsschwelle bei Bindung beider Antigene für T-Zellen mit beiden CARs geringer war als für T-Zellen mit nur einem CAR. Diese Beobachtungen wurden für den koexprimierten Primärsignalgeber sowohl mit CD8 Brückendomäne als auch ohne Brückendomäne gemacht. In Analogie mit den hier erhaltenen Daten wird die Aktivierungsschwelle des TCR durch eine zusätzliche CD28 Stimulation reduziert (Viola und Lanzavecchia, 1996; Diehn et al., 2002). Hierbei spielt der nukleäre Faktor aktivierter T-Lymphozyten (NFAT) bei der Integration des kostimulatorischen Signals in die T-Zell Aktivierung eine zentrale Rolle. Es wird vermutet, dass eine CD28-induzierte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) die transkriptionale Aktivität von NFAT erhöht, indem der nukleäre Import durch Erhöhung des Ca^{2+} Einstroms gesteigert und der nukleäre Export durch Inaktivierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) reduziert wird.

Unsere Beobachtung, dass bei CAR T-Zellen mit CD28 Kostimulation in trans neben der IL-2 Sekretion auch eine Verminderung der Aktivierungsschwelle für IFN- γ erfolgt, beruht wahrscheinlich darauf, dass bei der CD28 Stimulation vermehrt Lipid Rafts in die Synapse rekrutiert werden (Lanzavecchia und Sallusto, 2001; Huppa und Davis, 2003). Bei der physiologischen T-Zell Aktivierung stellt die Lipid Raft Rekrutierung einen zentralen Schritt dar (Xavier et al., 1998; Kumari et al., 2014). Dabei reguliert die CD28 Kostimulation durch Vav-1 die Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts und erhöht die Anzahl an rekrutierten Rafts (Mañes und Viola, 2006). Dadurch trägt CD28 sowohl qualitativ durch die Sekretion von IL-2 als auch quantitativ durch die Anreicherung von Kinasen, z. B. Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), und Adaptoren, z. B. LAT (linker for activation of T cells), in die Synapse zur T-Zell Aktivierung bei (Lanzavecchia und Sallusto, 2001; Viola, 2001). Als Folge wird die Aktivierungsschwelle der T-Zelle für IFN- γ erniedrigt. Wir schließen aus, dass in diesem Fall die Verschiebung der Aktivierungsschwelle durch die Anzahl der CARs erreicht wird, da die Expression der jeweiligen CAR Moleküle bei Koexpression gleich oder geringer ist als bei alleiniger Expression des jeweiligen CAR.

Die Signal-Komplementation bei den koexprimierten γ und CD28 CARs erfolgt innerhalb eines bestimmten Bereichs der Antigen-Dosis. Jedoch wurde bei hohen Antigen-Konzentrationen nach alleiniger Stimulation des CD28 Signalgebers auch eine T-Zell Aktivierung nachgewiesen. Offensichtlich reicht ein starkes CD28 Signal in Gegenwart eines Primärsignals für eine T-Zell Aktivierung aus. Das Primärsignal kann

in diesem Fall von einem koexprimierten CAR oder durch das CD3 ζ Signal aus dem physiologischen TCR Komplex beigesteuert werden. Ähnliches ist für den TCR bekannt, bei dem ein hohes kostimulatorisches Signal für eine T-Zell Aktivierung ausreicht, sofern die T-Zelle eine Primäraktivierung erfahren hat.

Bei T-Zellen mit nur einem CAR erfolgte erwartungsgemäß keine funktionelle Komplementation. CAR T-Zellen mit CD8- γ Signal zeigten bei Stimulation durch beide Antigene eine ähnliche Aktivierungsschwelle wie durch Stimulation durch den anti-CEA CAR Liganden allein. In diesem Fall erfolgte keine Diskriminierung zwischen Zielzellen mit einem oder beiden Antigenen. Allerdings wies die Aktivierung der γ Signaldomäne durch Bindung an das respektive Antigen bei T-Zellen mit Expression des anti-CEA CAR allein (#1331 CAR) eine niedrigere Aktivierungsschwelle auf als bei T-Zellen mit beiden CARs (#1344 CARs). Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Anzahl der anti-CEA CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche bei Einzelexpression höher ist als bei Koexpression. Die reduzierte Anzahl des γ Primärsignalgebers bei Koexpression führt infolgedessen zu einer Erhöhung der Aktivierungsschwelle. Dadurch sind T-Zellen mit koexprimierten CARs gegenüber Zielzellen mit nur einem Antigen weniger sensitiv. Daraus leitet sich ab, dass gesundes Gewebe bei T-Zell Therapie mit koexprimierten CARs möglicherweise geschont wird.

Von besonderem Interesse ist, dass die alleinige Stimulation des γ CAR ohne CD8 Domäne kaum zu einer Aktivierung der T-Zelle über Hintergrund führte, während die zusätzliche Bindung des koexprimierten CD28 CAR an sein Antigen eine vollständige T-Zell Aktivierung induzierte. Bei reduzierter CAR Expression auf der T-Zell Oberfläche wurde der Schwellenwert für die T-Zell Aktivierung bei alleiniger Stimulation des Primärsignals nicht erreicht. Die zusätzliche Kostimulation bei Bindung beider Antigene reduzierte die Aktivierungsschwelle und die T-Zellen wurden aktiviert. Das gleiche Phänomen wurde bei Untersuchungen der Aktivierungsschwellen des TCR beobachtet. Auch hier wurde eine IFN- γ Sekretion bei Erreichen einer bestimmten TCR Anzahl auf der Oberfläche induziert und die Antigen-Konzentration, die zum Erreichen der Aktivierungsschwelle nötig war, erhöhte sich mit abnehmender TCR Anzahl (Viola und Lanzavecchia, 1996). Offensichtlich wird die Aktivierungsschwelle auch durch die Anzahl der Rezeptormoleküle auf der T-Zell Oberfläche bestimmt. Eine Konsequenz daraus ist, dass eine induzierbar regulierte Expression der CAR Moleküle eine Feinregulation der Aktivierungsschwelle erlaubt. Diese Feinregulation könnte eine Abgrenzung zwischen einer anti-Tumor Antwort und Autoaggression ermöglichen.

Die Aktivierungsschwelle bei der physiologischen T-Zell Aktivierung bestimmt nicht nur die Induktion der Antwort in Abhängigkeit von der Antigen-Konzentration, sondern auch die Qualität im Sinne einer Hierarchie der sezernierten Zytokine (Itoh und Germain, 1997). Die Hierarchie der Zytokine wird in diesem Zusammenhang als die Induktion verschiedener Zytokine bei Stimulation mit unterschiedlichen Antigen-Mengen verstanden. Geringe Mengen Antigen induzieren bei der TCR Stimulation beispielsweise eine IFN- γ , aber keine IL-2 Sekretion, die eine höhere Antigen-Konzentration oder eine länger anhaltende Stimulation benötigt. Diese Zytokin-Hierarchie hat deswegen Einfluss auf die Immunantwort der T-Zellen und mittelbar auch auf andere beteiligte Immunzellen. Den Aktivierungsschwellen für IFN- γ und IL-2 bei TCR Aktivierung liegt eine verschieden effiziente Transkription zugrunde. Generell erfolgt die Transkription bei Verfügbarkeit aller notwendigen Transkriptionsfaktoren in ausreichender Menge. Dabei scheint der IL-2 Promoter anders reguliert zu sein als der IFN- γ Promoter (Garrity et al., 1994). Das Zytokin IFN- γ wird in der akuten Phase einer Infektion ausgeschüttet und erfordert ein niedrigeres TCR Signal als die IL-2 Sekretion (Itoh und Germain, 1997). Dahingegen ist die IL-2 Sekretion nötig, um die Immunantwort aufrecht zu erhalten und in der späten Phase der Infektion regulatorische T-Zellen (Treg Zellen) anzulocken, die die Immunantwort wieder runterregulieren. Die Aktivierungsschwelle der γ und CD28 CAR T-Zellen mit CD8 Domäne war für die Induktion der IFN- γ Sekretion niedriger als für die IL-2 Sekretion. Dies bewirkt die beobachtete Zytokin-Hierarchie. Im Gegensatz dazu wiesen T-Zellen mit koexprimierten CARs ohne CD8 Domäne die gleiche Aktivierungsschwelle für die Induktion der IFN- γ oder IL-2 Sekretion auf. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass bei Reduktion des Primärsignals eine effiziente Aktivierung der CAR T-Zelle erst durch die simultane CD28 Kostimulation erfolgt und deshalb die IFN- γ und IL-2 Sekretion bei der gleichen Antigen-Konzentration induziert werden. Die Hierarchie in der IFN- γ und IL-2 Sekretion ist in dieser CAR Konstellation aufgehoben, was Konsequenzen für die Qualität der T-Zell Antwort haben kann. Die Akutreaktion durch IFN- γ wird durch sezerniertes IL-2 verlängert, wobei bei Erhalt der Hierarchie höhere Antigen-Konzentrationen für die Verlängerung der T-Zell Antwort durch IL-2 nötig sind. Allerdings bewirkt die Reduktion des Primärsignals, dass die Aktivierung gegen Zellen mit nur einem Antigen gemindert wird.

Daraus ergibt sich die Frage, wie sich durch Reduktion des Primärsignals die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle verändert. Das Primärsignal wurde durch Deletion der CD8 Domäne im γ CAR reduziert. Dadurch war die Aktivierungsschwelle

zur IFN- γ Sekretion erhöht im Vergleich zu CAR T-Zellen mit CD8 Brückendomäne. Des Weiteren war die Gesamtmenge des sezernierten IFN- γ der CAR T-Zelle erniedrigt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Aktivierungsschwelle des TCR zur IFN- γ Freisetzung mit der Anzahl der TCR Komplexe invers korreliert (Viola und Lanzavecchia, 1996). Auch die Aktivierungsschwelle zur IL-2 Sekretion war erhöht und die Sekretion erniedrigt, wenn ein schwacher Primärsignalgeber vorlag. Die Ergebnisse machen deutlich, dass durch eine Modulation im CAR Aufbau neben der Qualität auch die Quantität der biologischen Wirkung verändert wird.

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen unfraktionierte T-Zell Populationen verschiedener Spender. Auf klonaler Ebene kann sich die Hierarchie der Zytokin-Freisetzungen anders darstellen. Dieses wurde beim TCR nach Stimulation durch Liganden verschiedener Bindestärke auf klonaler Ebene deutlich (Hemmer et al., 1998). Die hierarchische Anordnung der Zytokin-Induktionen IFN- γ und IL-4 unterschied sich bei einzelnen Zellklonen, wohingegen andere Effektorfunktionen wie die Perforin-induzierte Zytolyse, CD69 Expression und Proliferation bei verschiedenen Klonen die gleiche Hierarchie aufwiesen.

Im Unterschied zur Expression von zwei CARs unterschiedlicher Spezifitäten und getrenntem Primärsignal und CD28 Kostimulation (Signale in trans) sind bei einem klassischen CAR der zweiten Generation beide Signale in einer Kette fusioniert (Signale in cis). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, wie sich die Aktivierungsschwellen in der cis- versus der trans- Situation verhalten. Es zeigte sich entgegen den Erwartungen, dass die Aktivierungsschwelle bei CAR T-Zellen mit kombinierter Signalkette im Vergleich zu den getrennten Signalen erhöht war. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Aktivierungsschwelle für die IL-2 Induktion gleich der der IFN- γ Induktion war, während in unserem Modell mit CD8 Domäne die Aktivierungsschwelle für die IFN- γ Induktion erniedrigt wurde. Wir nehmen an, dass bei koexprimierten CARs mit getrennten Signalen die Signalketten wie beim TCR zu einer Synapse rekrutiert werden, wodurch eine Membranumlagerung erfolgt (Viola et al., 1999; Wetzel et al., 2002). Beim CAR mit kombinierten CD28- ζ Signaldomänen erfolgt diese Membranumlagerung vermutlich in einer anderen Form.

Die Rekrutierung der Rafts nimmt bei der CD28 Kostimulation in trans durch die Bindung des zweiten Antigens wahrscheinlich zu und dadurch wird die Anzahl der Signalmoleküle in der Synapse gesteigert wird (Abb. 32). Die Rekrutierung der Rafts findet auch bei der Kostimulation in cis statt, allerdings sind die Rafts vermutlich kleiner und dadurch die Signalverstärkung weniger effizient.

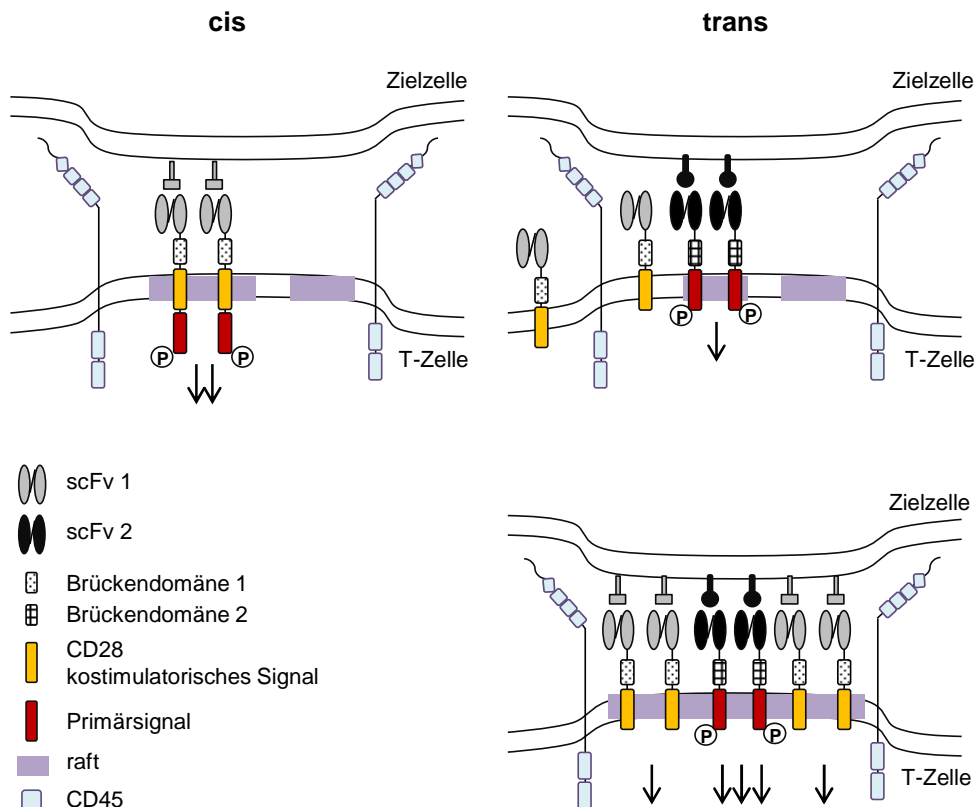


Abbildung 32: Modell der Synapsenbildung durch CARs mit Signaldomänen in cis und trans.

Die T-Zell Aktivierung geht einher mit der Rekrutierung von Lipid Rafts in die immunologische Synapse. Die Rafts stellen Membrandomänen dar, die die Signalgebung unterstützen und signalverstärkende Moleküle wie Lck und LAT anreichern. Zugleich werden signalvermindernde Proteine wie die Phosphatase CD45 verdrängt. Die Kostimulation in trans durch koexprimierte CARs mit getrennten Signalen erhöht die Anzahl der Rafts und amplifiziert dadurch das CAR-induzierte Signal. Bei der Kostimulation in cis durch einen CAR mit fusionierten Signalen ist die Anzahl der rekrutierten Rafts vermutlich geringer.

Hierbei ist vermutlich die Organisation des „central supra-molecular activation complex“ (cSMAC) der immunologischen Synapse unterschiedlich (Abb. 33). Bei einer Kostimulation in cis liegt eine 1:1 Stöchiometrie der Primärsignal-Moleküle und der CD28 kostimulatorischen Moleküle vor und die Signalkomplexe sind diffus über den cSMAC verteilt. Dahingegen ist die Stöchiometrie bei einer Kostimulation in trans wahrscheinlich zugunsten der CD28 Moleküle erhöht. Dieser cSMAC ist vermutlich wie der des physiologischen TCR organisiert. Hier teilt sich der cSMAC in zwei Bereiche, einen inneren Ring mit Primärsignal und einen äußeren Ring mit CD28 Signal (Yokosuka und Saito, 2009). Das CD28 Signal kann hierbei unabhängig vom Primärsignal Einfluss auf die T-Zell Aktivierung nehmen.

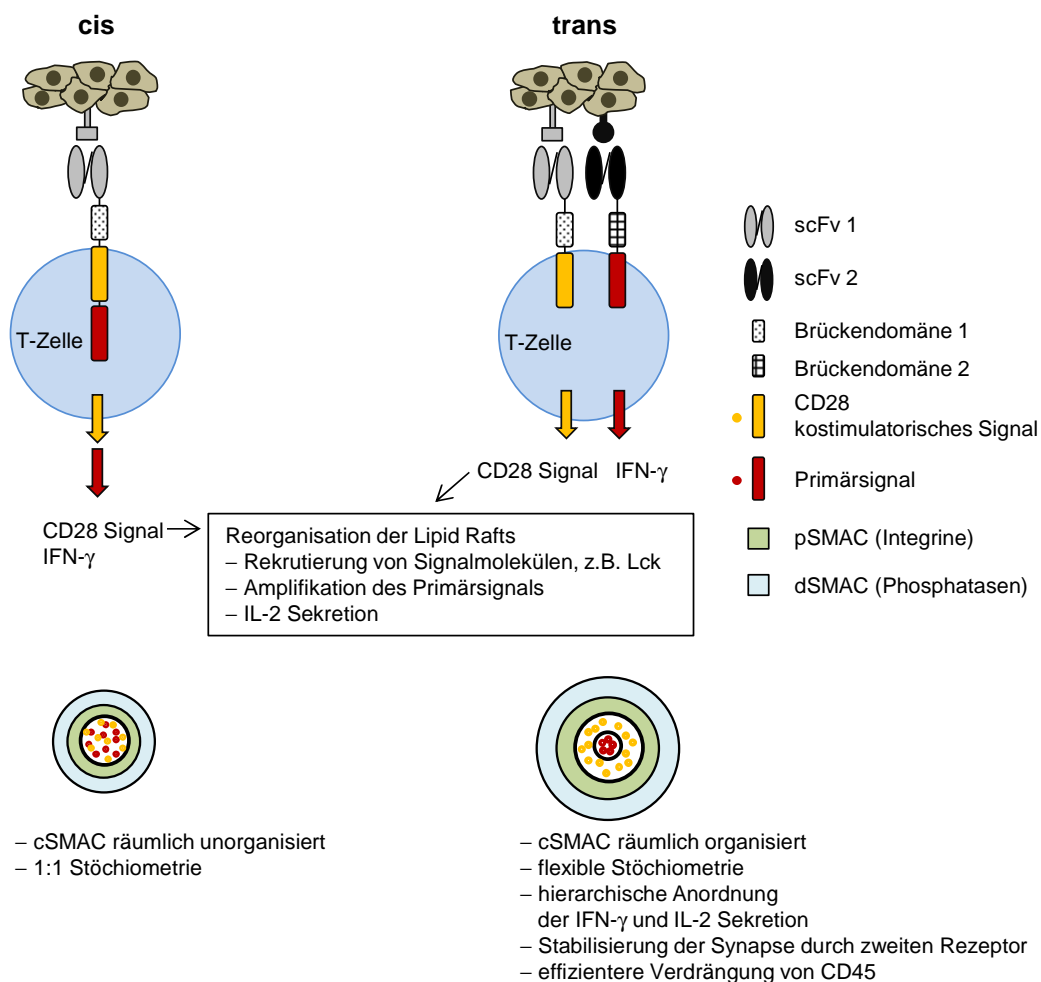


Abbildung 33: Modell der Synapsenbildung bei Kostimulation in cis und trans.

Die CD28 Kostimulation führt zur Rekrutierung der Lipid Rafts mit assoziierten Proteinen in die immunologische Synapse. Die lokale Anreicherung von Kinasen und Adaptoren führt zu einer

Signalamplifikation des Primärsignals. Der cSMAC hat bei der Kostimulation in cis durch einen CD28-Primärsignal CAR eine festgelegte 1:1 Stöchiometrie der Primärsignal-Moleküle und der CD28 Moleküle; die Signalkomplexe sind diffus verteilt. Hingegen organisiert sich der cSMAC bei der Kostimulation in trans durch einen Primärsignal CAR und durch einen CD28 CAR räumlich in einen inneren Bereich mit Primärsignal, der von einem CD28 Ring umgeben ist. Die Stöchiometrie der beiden Signale ist zugunsten des CD28 Signals verschoben und die Aktivierungsschwellen für IFN- γ und IL-2 sind verschieden. Die Expression des zweiten Rezeptors und Bindung an das respektive Antigen stabilisiert die Synapse und unterstützt die Verdrängung der CD45 Phosphatase.

Es sind zwei unabhängige Signalwege der CD28-vermittelten IL-2 Sekretion beschrieben (Sanchez-Lockhart et al., 2004; Sanchez-Lockhart und Miller, 2006). Der eine Signalweg ist PI3K-abhängig und erhöht durch die Rekrutierung der PKC θ in den cSMAC die nukleäre Translokation von NF- κ B (nukleärer Faktor- κ B) und infolgedessen die IL-2 Transkription. Der zweite, PI3K-unabhängige Signalweg führt zur Stabilisierung der IL-2 mRNA. Die Nutzung der verschiedenen Signalwege ist von den jeweiligen Bedingungen abhängig. CD28 Stimulation außerhalb der immunologischen Synapse, die in dem gewählten Modell durch B7 positive Zellen oder anti-CD28 Antikörper beschichtete Beads erreicht wurde, erhöht die Stabilität der IL-2 mRNA. Die Integration des CD28 Signals erfolgt demnach innerhalb des nachgeschalteten Signalweges. Dahingegen erfordert die Steigerung der IL-2 Transkription die Kolokalisierung des TCR und CD28 in der immunologischen Synapse auf der Zellmembran. Bei der CD28 Stimulation innerhalb der Synapse werden beide Wege bedient, so dass die IL-2 Sekretion höher ist als bei der Stimulation außerhalb der Synapse. Auch wenn in dem von uns vorgeschlagenen Modell die Signale in der immunologischen Synapse kolokalisiert sind, vermuten wir, dass die Regulation der IL-2 Sekretion durch eine CD28 Kostimulation in cis und in trans ebenfalls unterschiedlich erfolgt.

Neben der CD28 Kostimulation spielt die Tyrosinphosphatase CD45 bei der Regulation der T-Zell Aktivierung eine entscheidende Rolle. Die Lokalisation von CD45 in Lipid Rafts antagonisiert die IL-2 Produktion, indem CD45 der Phosphorylierung des TCR und der „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) Aktivierung entgegenwirkt (Zhang et al., 2005). Dahingegen fördert die CD45 Exklusion bei Aktivierung der T-Zelle die ERK-abhängige Rekrutierung der Rafts und IL-2 Produktion. Die TCR Aktivierung wird allerdings wieder supprimiert, wenn nur wenige CD45 Moleküle in die Synapse relokalisieren. Wir nehmen an, dass bei Expression eines zweiten CAR die Stabilität der gemeinsamen CAR Synapse erhöht wird und dadurch die CD45 Exklusion effektiver ist. Dieses beeinflusst die Schwelle der CAR-vermittelten T-Zell Aktivierung.

Die Phosphatase CD45 ist funktionell mit dem immun-inhibitorischen Plazentaprotein 14 (PP14) verknüpft (Rachmilewitz et al., 2003). Durch die Verknüpfung beider Moleküle wird CD45 in der immunologischen Synapse zurückgehalten, wodurch die TCR-induzierten Phosphoproteine dephosphoryliert werden. Die PP14-vermittelte Erhöhung der Aktivierungsschwelle steht im Gegensatz zu der CD28-vermittelten Erniedrigung der Aktivierungsschwelle. Das Gleichgewicht zwischen Tyrosinkinase und Phosphatasen, welches sowohl durch CD28 als auch PP14/CD45 verschoben werden kann, bestimmt die Aktivierungsschwelle der T-Zelle (Hermiston et al., 2003). Die IFN- γ und IL-2 Sekretion sind unterschiedlich sensitiv gegenüber der inhibitorischen Wirkung von PP14 (Rachmilewitz et al., 2001). Dieses kann ebenso zu den unterschiedlichen Aktivierungsschwellen beider Zytokine beitragen.

Insgesamt zeigen unsere Untersuchungen, dass die Stimulationssignale in trans im Hinblick auf eine Feinregulation der Immunantwort gegenüber Signalen in cis überlegen sind. Ein Trennen der beiden Signale ermöglicht eine hierarchische Freisetzung der Effektorfunktionen, wohingegen bei Signalen in cis eher eine „on/off“ Situation vorliegt. Für die physiologische T-Zell Aktivierung wurde gezeigt, dass im Ruhezustand der T-Zelle der TCR und LAT in getrennten Membrandomänen vorliegen, die bei Aktivierung der T-Zelle zusammenrücken (Lillemeier et al., 2010). Die γ Signalkette verhält sich in der Ausprägung einer Synapse ähnlich der CD3 ζ Kette, da eine Raft Rekrutierung und Signalamplifikation durch Kolokalisierung LAT-haltiger Membrandomänen nach Aktivierung erfolgt (Wilson et al., 2001). Die Kompartimentierung des γ Primärsignals und des CD28 Signals in der trans Situation ermöglicht ebenfalls eine Kontrolle des Signalprozesses, da erst bei Aktivierung der CAR T-Zelle durch Bindung beider Antigene die Membrandomänen zusammengezogen werden und beide Signale integriert werden. Diese Trennung ist in der cis Situation nicht gegeben und die Aktivierung der CAR T-Zelle resultiert in der Signal-Integration des Primärsignals und des CD28 Signals. Die Qualität der Immunantwort wird somit nicht nur durch die Antigen-Dosis, sondern auch durch die Signal-Anordnung moduliert.

Unser Modell der kombinatorischen Antigen-Erkennung erlaubt die Differenzierung zwischen Zielzellen mit nur einem Antigen und beiden Antigenen. Dies ist bei einer CAR T-Zelle mit Signalen in cis nicht möglich. Auch ein CAR mit zwei Bindedomänen („bi-spezifischer CAR“) könnte eine kooperative Bindung bewirken, führt aber durch Integration beider Signale in einer Kette sehr wahrscheinlich zu keiner selektiven T-Zell

Aktivierung durch Zielzellen mit beiden Antigenen. Die kombinatorische Antigen-Erkennung wurde in dieser Arbeit bei T-Zellen mit koexprimierten CARs deutlich, wobei eine selektive Aktivierung gegenüber Zielzellen mit beiden Antigenen im Vergleich zu Zielzellen mit nur einem der Antigene erfolgte. Diese Beobachtung wurde bei CAR T-Zellen, die nur den Primärsignalgeber exprimieren, nicht gemacht. Des Weiteren wurden CAR T-Zellen mit γ und CD28 CAR durch Zielzellen mit beiden Antigenen effizienter aktiviert als CAR T-Zellen mit γ CAR allein. Dieses ist in Übereinstimmung mit unserer Beobachtung, dass die T-Zelle mit γ und CD28 CAR bei Stimulation durch beide CAR Liganden eine niedrigere Aktivierungsschwelle zeigte als die T-Zelle mit γ CAR allein.

Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die klinische Anwendung unseres Modells. Wir nutzen hierbei die Tatsache, dass sich Tumorzellen von gesunden Zellen meist durch die Expression von Antigen-Mustern unterscheiden. Die funktionelle Komplementation des γ Primärsignals und der Kostimulation und die daraus resultierende vollständige T-Zell Aktivierung erfolgt in unserem System nach Erkennung des Antigen-Musters durch beide koexprimierten CARs. Für den modularen Aufbau beider CARs leitet sich aus unseren Daten ab, dass der CD28 CAR, der das kostimulatorische Signal liefert, gegen das höher exprimierte Tumorantigen gerichtet werden sollte. Alternativ besteht die Möglichkeit, den CAR gegen das Antigen, das auf gesundem Gewebe ubiquitär oder in variabler Dichte exprimiert wird, zu richten. Dieser CD28 CAR allein induziert nach Bindung keine T-Zell Aktivierung. Dagegen sollte das Primärsignal gegen das niedrig exprimierte Antigen gerichtet sein und eine möglichst ineffiziente T-Zell Aktivierung bewirken.

CAR T-Zellen, die sowohl das aktivierende als auch das kostimulatorische Signal erhalten haben, weisen vermutlich eine niedrigere Aktivierungsschwelle auf als CAR T-Zellen, die keinen Antigen-Kontakt hatten. Eine Folge könnte sein, dass diese CAR T-Zellen nach Auswanderung in das Gewebe und Wiedereintritt in die Blutzirkulation eine erhöhte Aktivität gegenüber gesunden Zielzellen mit Expression des aktivierenden Antigens aufweisen, auch wenn keine weitere Kostimulation erfolgt (Fedorov et al., 2014). Die Minderung der Aktivierungsschwelle nach erstem Antigen-Kontakt könnte erklären, warum in derzeitigen Studien eine Autoaggression erst Wochen nach der adoptiven T-Zell Therapie beobachtet wird (Maus et al., 2014). Wir verwendeten zur Schwächung des Primärsignals in unseren CAR Formaten die γ Signalkette mit nur einem Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotiv (ITAM) anstelle der CD3 ζ Signalkette mit drei ITAMs (Bridgeman et al., 2014). Zudem wurde das γ Signal

dadurch weiter vermindert, dass die CD8 Brückendomäne entfernt und dadurch die Anzahl der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche reduziert wurde. Allerdings geht hierbei die hierarchische Anordnung der IFN- γ und IL-2 Zytokin-Sekretion weitgehend verloren.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel der kombinatorischen Antigen-Erkennung zeigte die selektive Eliminierung von Tumorzellen mit beiden Antigenen in einem Mausmodell. Hierbei wurde die Affinität der Bindedomäne des CAR mit Primärsignal soweit herabgesetzt, dass dessen Stimulation zu einer suboptimalen Aktivierung führte (Kloss et al., 2013). Somit wurden Zielzellen mit Expression nur eines der Antigene nicht lysiert. Erst bei zusätzlicher Bindung des zweiten Antigens, welches den kostimulatorischen CAR stimulierte, wurde eine T-Zell Aktivierung und Elimination von Tumorzellen nachgewiesen. Allerdings lieferten die Autoren keine mechanistische Erklärung für ihre Beobachtungen. Wir vermuten, dass auch hier die unterschiedlichen Aktivierungsschwellen der CAR T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Aus den publizierten Daten ist ersichtlich, dass eine Reduktion der Affinität der Bindedomäne die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle erhöht. Bei Verwendung des niederaffinen CAR erfolgte somit bei der gegebenen Antigen-Dichte auf der Zielzelle keine Aktivierung. Unsere Daten zeigen, dass eine Kostimulation in trans die Aktivierungsschwelle reduziert. Wir nehmen daher an, dass bei Bindung des koexprimierten zweiten Antigens trotz suboptimaler Aktivierung des CAR mit niedriger Affinität die Schwelle zur T-Zell Aktivierung erreicht wird. Jedoch ist der Einfluss der Affinität auf die T-Zell Aktivierung von mehreren Faktoren abhängig, wie z. B. der Bindezeit des Rezeptors an das respektive Antigen (Valitutti et al., 1995). Der suboptimale Affinitätsbereich muss daher für jede Bindedomäne neu definiert werden und ist nicht für jede Spezifität verfügbar. Das Absenken der Affinität kann einen Wirkungsverlust zur Folge haben, der trotz zusätzlicher Kostimulation in trans nicht aufgehoben werden kann. Andererseits hat ein Absenken der Affinität keine Auswirkung auf die T-Zell Aktivierung, wenn die maximale T-Zell Aktivierung erreicht wurde (Chmielewski et al., 2004; Chmielewski et al., 2011).

Ein Problem in der Anwendung des Konzepts könnten Mechanismen sein, bei denen Tumorzellen die jeweilige Antigen-Expression reduzieren. Die Sensitivität der CAR T-Zell Therapie gegenüber den jeweiligen Zielzellen ist von der Höhe, in der das Antigen auf der Tumorzelle exprimiert wird, abhängig (Anurathapan et al., 2014). Wird die Aktivierungsschwelle nicht erreicht, besteht die Möglichkeit, die Tumorzelle zu re-sensitivieren, indem die Expression des Tumor-assoziierten Antigens durch

epigenetische Modulatoren hochreguliert wird. Alternativ kann die CAR T-Zelle gegen ein Zielantigen gerichtet werden, welches kausal mit der malignen Transformation verknüpft ist und daher die Herunterregulation der Tumorantigen-Expression zum Absterben der Tumorzelle führt.

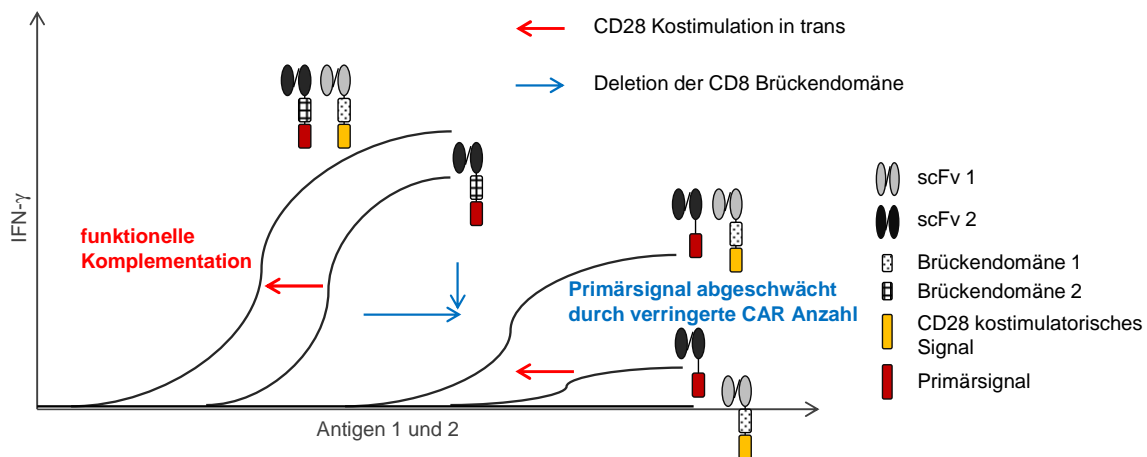


Abbildung 34: Bauplan für die kombinatorische Antigen-Erkennung.

Für die kombinatorische Antigen-Erkennung sollten die koexprimierten CARs verschiedene Brückendomänen und Transmembrandomänen aufweisen, so dass keine kovalenten Heterodimere gebildet werden. Eine CD28 Kostimulation in trans führt zu einer Reduktion der Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle bei Bindung beider Antigene. Die Abschwächung des Primärsignals kann durch eine verringerte Anzahl der CAR Moleküle auf der T-Zell Oberfläche erreicht werden. Daraus ergibt sich eine Erhöhung der Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle. Der Einfluss der Kostimulation in trans auf die Verschiebung der Aktivierungsschwelle bleibt erhalten.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die physiologische T-Zell Aktivierung im Vergleich zum rekombinanten CAR über eine sensibel gesteuerte Feinregulation der Immunantwort verfügt. Dieses wird u. a. dadurch gewährleistet, dass eine hierarchische Anordnung der Effektorfunktionen besteht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Hierarchie bei koexprimierten CARs mit Signalen in trans bewahrt wird, was weitgehend im Gegensatz zu der cis Anordnung der Signale steht. Die Kostimulation in trans reduziert die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle für die IFN- γ Sekretion und sensibilisiert die Zelle gegenüber Tumorzellen mit Expression beider Antigene. Durch die hohe Antigen-Expression auf Tumorzellen wird auch die höhere Aktivierungsschwelle für die IL-2 Sekretion erreicht und somit die T-Zell Antwort verstärkt und verlängert. Die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zelle gegenüber

Zielzellen mit nur einem Antigen ist hingegen erhöht. Dadurch werden Nebenwirkungen gegenüber gesundem Gewebe, welches das Antigen in niedrigerer Dichte exprimiert, erheblich reduziert oder idealerweise vermieden.

In dieser Arbeit wurden Stellgrößen ausfindig gemacht, die die Aktivierungsschwellen der CAR T-Zelle beeinflussen und Einfluss auf die Planung klinischer Studien haben. Damit wurden Parameter definiert, die dem Mechanismus der kombinatorischen Antigen-Erkennung zugrunde liegen. Der entworfene Bauplan ermöglicht Vorhersagen über die CAR-vermittelte T-Zell Aktivierung (Abb. 34). Dies erweitert den Anwendungsbereich der adoptiven T-Zell Therapie mit chimären Antigen-Rezeptoren erheblich.

6 Anhang

6.1 Expressionkassetten neu generierter CARs

6.1.1 pQCXIN-Lκ-C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1213 CAR, E-Fc-CD28)

```

                                kappa Leader
                                ~~~~~~
NotI
~~~~~
                                NcoI
                                ~~~~~~
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S .
1 ATCCGCGGCC GCCATGGATT TTCAGGTGCA GATTTTCAGC TTCCTGCTAA TCAGTGCCTC
  TAGGCGCCGG CCGTACCTAA AAGTCCACGT CTAAAAGTCG AAGGACGATT AGTCACGGAG

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
kappa Leader
~~~~~
                                XbaI
                                ~~~~~~
      · V I M S R P A M A Q V Q L V Q S G A E V ·
61 AGTCATAATG TCTAGACCGG CGATGGCCCA GGTGCAGCTG GTGCAGTCTG GGGCAGAGGT
  TCAGTATTAC AGATCTGGCC GCTACCGGGT CCACGTCGAC CACGTCAGAC CCCGTCTCCA

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
      · K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S ·
121 GAAAAAGCCC GGGGAGTCTC TGAAGATCTC CTGTAAGGGT TCTGGATACA GCTTTACCAG
  CTTTTTCGGG CCCCTCAGAG ACTTCTAGAG GACATTCCCA AGACCTATGT CGAAATGGTC

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
      · Y W I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I ·
181 CTA CTACTGGATC GCCTGGGTGC GCCAGATGCC CGGGAAAGGC CTGGAGTACA TGGGGCTCAT
  GATGACCTAG CGGACCCACG CGGTCTACGG GCCCTTTCCG GACCTCATGT ACCCCGAGTA

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
      · Y P G D S D T K Y S P S F Q G Q V T I S ·
241 CTATCCTGGT GACTCTGACA CCAAATACAG CCCGTCCTTC CAAGGCCAGG TCACCATCTC
  GATAGGACCA CTGAGACTGT GGTATTATGTC GGGCAGGAAG GTTCCGGTCC AGTGGTAGAG

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
      · V D K S V S T A Y L Q W S S L K P S D S ·
301 AGTCGACAAG TCCGTCAGCA CTGCCTACTT GCAATGGAGC AGTCTGAAGC CCTCGGACAG
  TCAGCTGTTC AGGCAGTCGT GACGGATGAA CGTTACCTCG TCAGACTTCG GGAGCCTGTC

                                C6-B1D2scFv
                                ~~~~~~
      · A V Y F C A R H D V G Y C T D R T C A K ·
361 CGCCGTGTAT TTTTGTGCGA GACATGACGT GGGATATTGC ACCGACCGGA CTTGCGCAAA
  GCGGCACATA AAAACACGCT CTGTACTGCA CCCTATAACG TGGCTGGCCT GAACGCGTTT

```


C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G •  
 421 GTGGCCTGAA TGGCTGGGCG TATGGGGCCA GGGCACCTG GTCACCGTCT CCTCAGGTGG  
 CACCGGACTT ACCGACCCGC ATACCCCGT CCCGTGGGAC CAGTGGCAGA GGAGTCCACC

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • G G S G G G G S G G G G S Q S V L T Q P •
 481 AGGCGGTTCA GGCGGAGGTG GCTCTGGCGG TGGCGGATCG CAGTCTGTGT TGACGCAACC
 TCCGCCAAGT CCGCCTCCAC CGAGACCGCC ACCGCCTAGC GTCAGACACA ACTGCGTTGG

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S •  
 541 GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAGCTC  
 CGGGAGTCAC AGACCCGGG GTCCTGTCTT CCAGTGGTAG AGGACGAGAC CTTCGTCGAG

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • N I G N N Y V S W Y Q Q L P G T A P K L •
 601 CAACATTGGG AATAATTATG TATCCTGGTA CCAGCAGCTC CCAGGAACAG CCCCCAAACT
 GTTGTAACCC TTATTAATAC ATAGGACCAT GGTCGTCGAG GGTCTTGTG GGGGTTTGA

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • L I Y D H T N R P A G V P D R F S G S K •  
 661 CCTCATCTAT GATCACACCA ATCGGCCCGC AGGGTCCCT GACCGATTCT CTGGCTCCAA  
 GGAGTAGATA CTAGTGTGGT TAGCCGGGCG TCCCAGGGA CTGGCTAAGA GACCGAGTT

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • S G T S A S L A I S G F R S E D E A D Y •
 721 GTCTGGCACC TCAGCCTCC TGGCCATCAG TGGGTTCCGG TCCGAGGATG AGGCTGATTA
 CAGACCGTGG AGTCGGAGGG ACCGGTAGTC ACCCAAGGCC AGGCTCTAC TCCGACTAAT

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 • Y C A S W D Y T L S G W V F G G G T K V •  
 781 TTACTGTGCC TCCTGGGACT ACACCCTCTC GGGCTGGGTG TTCGGCGGAG GGACCAAGGT  
 AATGACACGG AGGACCCTGA TGTGGGAGAG CCCGACCAC AAGCCGCTC CCTGGTTCCA

## C6-B1D2scFv

human IgG<sub>1</sub>-Fc

## BamHI

~~~~~  
 • T V L G A D P A E P K S P D K T H T C P •
 841 CACCGTCCTA GGTGCGGATC CCGCCGAGCC CAAATCTCCT GACAAAATC ACACATGCC
 GTGGCAGGAT CCACGCCTAG GCGGCTCGG GTTTAGAGGA CTGTTTTGAG TGTGTACGG

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 • P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P •  
 901 ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTCC CCCCAAAACC  
 TGGCACGGT CGTGGACTTG AGGACCCCC TGGCAGTCAG AAGGAGAAG GGGGTTTTGG

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 • K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S •
 961 CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGACCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 GTTCCTGTGG GAGTACTAGA GGGCCTGGG ACTCCAGTGT ACGCACCAC ACCTGCACT

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 • H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A •  
 1021 CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGTGGAGG TGCATAATGC  
 GGTGCTTCTG GGACTCCAGT TCAAGTTGAC CATGCACCTG CCGCACCTC ACGTATTACG

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T ·
1081 CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGGGTGGTCA GCGTCCCTCAC
GTTCTGTTTC GGCGCCCTCC TCGTCATGTT GTCGTGCATG GCCCACCAGT CGCAGGAGTG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A ·
1141 CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
GCAGGACGTG GTCCTGACCG ACTTACCGTT CCTCATGTTC ACGTTCCAGA GGTGTTTTCG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q ·
1201 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA
GGAGGGTCGG GGGTAGCTCT TTTGGTAGAG GTTTCGGTTT CCCGTCGGGG CTCTTGGTGT

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C ·
1261 GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG
CCACATGTGG GACGGGGGTA GGGCCCTACT CGACTGGTTC TTGGTCCAGT CGGACTGGAC

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P ·
1321 CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC
GGACCAGTTT CCGAAGATAG GGTGCTGTGA GCGGCACCTC ACCCTCTCGT TACCCGTCGG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y ·
1381 GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA
CCTCTTGTG ATGTTCTGGT GCGGAGGGCA CGACCTGAGG CTGCCGAGGA AGAAGGAGAT

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V ·
1441 CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT
GTCGTTTCGAG TGGCACCTGT TCTCGTCCAC CGTCGTCCCC TTGCAGAAGA GTACGAGGCA

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
· M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K ·
1501 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA
CTACGTACTC CGAGACGTGT TGGTGATGTG CGTCTTCTCG GAGAGGGACA GAGGCCCAT

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

## human CD28 TM

```

~
· K D P K F W V L V V V G G V L A C Y S L ·
1561 AAAAGATCCC AAATTTTGGG TGCTGGTGGT GGTGGTGGGA GTCCTGGCTT GCTATAGCTT
TTTTCTAGGG TTTAAAACCC ACGACCACCA CCAACCACCT CAGGACCGAA CGATATCGAA

```

## human CD28 Signaldomäne

## human CD28 TM

```

~~~~~
· L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H ·
1621 GCTAGTAACA GTGGCCTTTA TTATTTTCTG GGTGAGGAGT AAGAGGAGCA GGCTCCTGCA
CGATCATTTGT CACCGGAAAT AATAAAAGAC CCACTCCTCA TTCTCCTCGT CCGAGGACGT

```

## human CD28 Signaldomäne

```

~~~~~
· S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P ·
1681 CAGTGACTAC ATGAACATGA CTCCCCGCCG CCCCAGGGCC ACCCGCAAGC ATTACCAGCC
GTCACTGATG TACTTGTACT GAGGGCGGC GGGGCCCGGG TGGCGTTTCG TAATGGTCCG

```

## human CD28 Signaldomäne

```

~~~~~
EcoRI
~~~~~
· Y A P P R D F A A Y R S *
1741 CTATGCCCCC CCACGCGACT TGCAGCCTA TCGCTCCTGA TCGAATTCCG
GATACGGGGG GGTGCGCTGA AGCGTCGGAT AGCGAGGACT AGCTTAAGGC

```

## 6.1.2 pMP71-Lκ-BW431/26scFv-γ-P2A-Lκ-C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1246 CARs, C-γ-P2A-E-Fc-CD28)

```

kappa Leader
~~~~~
NotI
~~~~~
NcoI
~~~~~
M D F Q V Q I F S F L L I S ·
1 TCACTTACAG GCGGCCGCCA TGGATTTTCA GGTGCAGATT TTCAGCTTCC TGCTAATCAG
AGTGAATGTC CGCCGGCGGT ACCTAAAAGT CCACGTCTAA AAGTCGAAGG ACGATTAGTC

BW431/26scFv
~~~~~
kappa Leader
~~~~~
XbaI
~~~~~
· A S V I M S R G V H S Q V Q L Q E S G P ·
61 TGCCTCAGTC ATAATGTCTA GAGGTGTCCA CTCCCAGGTC CAACTGCAGG AGAGCGGTCC
ACGGAGTCAG TATTACAGAT CTCCACAGGT GAGGGTCCAG GTTGACGTCC TCTCGCCAGG

BW431/26scFv
~~~~~
· G L V R P S Q T L S L T C T V S G F T I ·
121 AGGTCTTGTG AGACCTAGCC AGACCCTGAG CCTGACCTGC ACCGTGTCTG GCTTCACCAT
TCCAGAACAC TCTGGATCGG TCTGGGACTC GGACTGGACG TGGCACAGAC CGAAGTGTA

BW431/26scFv
~~~~~
· S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E W I ·
181 CAGCAGTGGT TATAGCTGGC ACTGGGTGAG ACAGCCACCT GGACGAGGTC TTGAGTGGAT
GTCGTCACCA ATATCGACCG TGACCCACTC TGTCGGTGGA CCTGCTCCAG AACTCACCTA

BW431/26scFv
~~~~~
· G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T ·
241 TGGATACATA CAGTACAGTG GTATCACTAA CTACAACCCC TCTCTCAAAA GTAGAGTGAC
ACCTATGTAT GTCATGTCAC CATAGTGATT GATGTTGGGG AGAGAGTTTT CATCTCACTG

BW431/26scFv
~~~~~
· M L V D T S K N Q F S L R L S S V T A A ·
301 AATGCTGGTA GACACCAGCA AGAACCAGTT CAGCCTGAGA CTCAGCAGCG TGACAGCCGC
TTACGACCAT CTGTGGTCGT TCTTGGTCAA GTCGGACTCT GAGTCGTCGC ACTGTGGCGC

```

## BW431/26scFv

~~~~~  
 · D T A V Y Y C A R E D Y D Y H W Y F D V ·
 361 CGACACCGCG GTCTATTATT GTGCAAGAGA AGACTATGAT TACCACTGGT ACTTCGATGT
 GCTGTGGCGC CAGATAATAA CACGTTCTCT TCTGATACTA ATGGTGACCA TGAAGCTACA

BW431/26scFv

~~~~~  
 · W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G ·  
 421 CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGAGGC GGTGGATCGG GCGGTGGTGG  
 GACCCCGGTT CCCTGGTGCC AGTGGCAGAG GAGTCCTCCG CCACCTAGCC CGCCACCACC

## BW431/26scFv

~~~~~  
 · S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S A S ·
 481 GTCGGGTGGC GCGGATCTG ACATCCAGCT GACCCAGAGC CCAAGCAGCC TGAGCGCCAG
 CAGCCCACCG CCGCCTAGAC TGTAGGTCGA CTGGGTCTCG GGTTCGTCGG ACTCGCGGTC

BW431/26scFv

XhoI

~~~~~  
 · V G D R V T I T C S T S S S V S Y M H W ·  
 541 CGTGGGTGAC AGAGTGACCA TCACCTGTAG TACCAGCTCG AGTGTAAAGT ACATGCACTG  
 GCACCCACTG TCTCACTGGT AGTGGACATC ATGGTCGAGC TCACATTCAA TGTACGTGAC

## BW431/26scFv

~~~~~  
 · Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A ·
 601 GTACCAGCAG AAGCCAGGTA AGGCTCCAAA GCTGCTGATC TACAGCACAT CCAACCTGGC
 CATGGTCGTC TTCGGTCCAT TCCGAGGTTT CGACACTAG ATGTCGTGTA GGTGGACCG

BW431/26scFv

~~~~~  
 · S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I ·  
 661 TTCTGGTGTG CCAAGCAGAT TCAGCGGTAG CGGTAGCGGT ACCGACTTCA CCTTCACCAT  
 AAGACCACAC GGTTCGTCTA AGTCGCCATC GCCATCGCCA TGGCTGAAGT GGAAGTGGTA

## BW431/26scFv

~~~~~  
 · S S L Q P E D I A T Y Y C H Q W S S Y P ·
 721 CAGCAGCCTC CAGCCAGAGG ACATCGCCAC CTACTACTGC CATCAGTGGA GTAGTTATCC
 GTCGTGGGAG GTCGGTCTCC TGTAGCGGTG GATGATGACG GTAGTCACCT CATCAATAGG

BW431/26scFv

gamma TM

BamHI

~~~~~  
 · T F G Q G T K V E I K V D P Q L C Y I L ·  
 781 CACGTTCCGC CAAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAAGTGGAT CCTCAGCTCT GCTATATCCT  
 GTGCAAGCCG GTTCCCTGGT TCCACCTCTA GTTTCACCTA GGAGTCGAGA CGATATAGGA

## gamma TM

## gamma Signaldomäne

~~~~~  
 · D A I L F L Y G I V L T L L Y C R L K I ·
 841 GGATGCCATC CTGTTTCTGT ATGGAATTGT CCTCACCTC CTCTACTGTC GACTGAAGAT
 CCTACGGTAG GACAAAGACA TACCTTAACA GGAGTGGGAG GAGATGACAG CTGACTTCTA

gamma Signaldomäne

~~~~~  
 · Q V R K A A I T S Y E K S D G V Y T G L ·  
 901 CCAAGTGC GA AAGGCAGCTA TAACCAGCTA TGAGAAATCA GATGGTGT TT ACACGGGCT  
 GGTTCACGCT TTCCGTCGAT ATTGGTCGAT ACTCTTTAGT CTACCACAAA TGTGCCCGGA

## gamma Signaldomäne

P2A Peptid

```

          ~~~~~
 . S T R N Q E T Y E T L K H E K P P Q G S .
1961 GAGCACCAGG AACCAGGAGA CTTACGAGAC TCTGAAGCAT GAGAAACCAC CACAGGGAAG
 CTCTGTGGTCC TTGGTCTCT GAATGCTCTG AGACTTCGTA CTCTTTGGTG GTGTCCCTTC

```

P2A Peptid

```

          ~~~~~
          . G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P .
1021 CGGCGCCACG AACTTCTCTC TGTTAAAGCA AGCAGGAGAC GTGGAAGAAA ACCCCGGTCC
      GCCGCGGTGC TTGAAGAGAG ACAATTTCTG TCGTCTCTG CACCTTCTTT TGGGGCCAGG
          NcoI
          ~

```

kappa Leader

P2A Peptid

```

          ~
          NcoI
          ~~~~~
 . M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S .
1081 CATGGATTTT CAGGTGCAGA TTTTCAGCTT CCTGCTAATC AGTGCCTCAG TCATAATGTC
 GTACCTAAAA GTCCACGTCT AAAAGTCGAA GGACGATTAG TCACGGAGTC AGTATTACAG
 XbaI
 ~

```

C6-B1D2scFv

kappa Leader

```

          ~~~~~
          XbaI
          ~~~~~
 . R P A M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G .
1141 TAGACCGCGC ATGGCCAGG TGCAGCTGGT GCAGTCTGGG GCAGAGGTGA AAAAGCCCCG
 ATCTGGCCGC TACCGGGTCC ACGTCGACCA CGTCAGACCC CGTCTCCACT TTTTCGGGCC

```

C6-B1D2scFv

```

          ~~~~~
          . E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I A .
1201 GGAGTCTCTG AAGATCTCCT GTAAGGGTTC TGGATACAGC TTTACCAGCT ACTGGATCGC
      CCTCAGAGAC TTCTAGAGGA CATTCCAAG ACCTATGTCG AAATGGTCA TGACCTAGCG

```

C6-B1D2scFv

```

          ~~~~~
 . W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y P G D .
1261 CTGGGTGCGC CAGATGCCCG GGAAAGGCCT GGAGTACATG GGGCTCATCT ATCCTGGTGA
 GACCCACGCG GTCTACGGGC CCTTCCGGA CCTCATGTAC CCCGAGTAGA TAGGACCACT

```

C6-B1D2scFv

```

          ~~~~~
          . S D T K Y S P S F Q G Q V T I S V D K S .
1321 CTCTGACACC AAATACAGCC CGTCCTTCCA AGGCCAGGTC ACCATCTCAG TCGACAAGTC
      GAGACTGTGG TTTATGTCGG GCAGGAAGGT TCCGGTCCAG TGGTAGAGTC AGCTGTTTCA

```

C6-B1D2scFv

```

          ~~~~~
 . V S T A Y L Q W S S L K P S D S A V Y F .
1381 CGTCAGCACT GCCTACTTGC AATGGAGCAG TCTGAAGCCC TCGGACAGCG CCGTGTATTT
 GCAGTCTGTA CGGATGAACG TTACCTCGTC AGACTTCGGG AGCCTGTGCG GGCACATAAA

```

C6-B1D2scFv

```

          ~~~~~
          . C A R H D V G Y C T D R T C A K W P E W .
1441 TTGTGCGAGA CATGACGTGG GATATTGCAC CGACCGGACT TGCGCAAAGT GGCCTGAATG
      AACACGCTCT GTACTGCACC CTATAACGTG GCTGGCCTGA ACGCGTTTCA CCGGACTTAC

```

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · L G V W G Q G T L V T V S S G G G G S G ·
 1501 GCTGGGCGTA TGGGGCCAGG GCACCCTGGT CACCGTCTCC TCAGGTGGAG GCGGTTCCAGG
 CGACCCGCAT ACCCCGGTCC CGTGGGACCA GTGGCAGAGG AGTCCACCTC CGCCAAGTCC

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · G G G S G G G G S Q S V L T Q P P S V S ·  
 1561 CGGAGGTGGC TCTGGCGGTG GCGGATCGCA GTCTGTGTTG ACGCAACCGC CCTCAGTGTG  
 GCCTCCACCG AGACCGCCAC CGCCTAGCGT CAGACACAAC TGC GTTGGCG GGAGTCACAG

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G N ·
 1621 TGCGGCCCA GGACAGAAGG TCACCATCTC CTGCTCTGGA AGCAGCTCCA ACATTGGGAA
 ACGCCGGGGT CCTGTCTTCC AGTGGTAGAG GACGAGACCT TCGTCGAGGT TGTAACCCTT

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · N Y V S W Y Q Q L P G T A P K L L I Y D ·  
 1681 TAATTATGTA TCCTGGTACC AGCAGCTCCC AGGAACAGCC CCCAACTCC TCATCTATGA  
 ATTAATACAT AGGACCATGG TCGTCGAGGG TCCTTGTCGG GGGTTTGAGG AGTAGATACT

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · H T N R P A G V P D R F S G S K S G T S ·
 1741 TCACACCAAT CGGCCCGCAG GGGTCCCTGA CCGATTCTCT GGCTCCAAGT CTGGCACCTC
 AGTGTGGTTA GCCGGGCGTC CCCAGGGACT GGCTAAGAGA CCGAGGTTCA GACCGTGGAG

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · A S L A I S G F R S E D E A D Y Y C A S ·  
 1801 AGCCTCCCTG GCCATCAGTG GGTTCGGTTC CGAGGATGAG GCTGATTATT ACTGTGCCTC  
 TCGGAGGGAC CGGTAGTCAC CCAAGGCCAG GCTCCTACTC CGACTAATAA TGACACGGAG

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 · W D Y T L S G W V F G G G T K V T V L G ·
 1861 CTGGGACTAC ACCCTCTCGG GCTGGGTGTT CGGCGGAGGG ACCAAGGTCA CCGTCTTAGG
 GACCCTGATG TGGGAGAGCC CGACCCACAA GCCGCCTCCC TGTTCCAGT GGCAGGATCC

C6-B1D2scFv

human IgG₁-Fc

BamHI

~~~~~  
 · A D P A E P K S P D K T H T C P P C P A ·  
 1921 TGCGGATCCC GCCGAGCCCA AATCTCCTGA CAAAACCTCAC ACATGCCAC CGTGCCACG  
 ACGCCTAGGG CGGCTCGGGT TTAGAGGACT GTTTTGAGTG TGTACGGGTG GCACGGGTGCG

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 · P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L ·
 1981 ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCTT
 TGGACTTGAG GACCCCCCTG GCAGTCAGAA GGAGAAGGGG GGTTTTGGGT TCCTGTGGGA

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 · M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P ·  
 2041 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC  
 GTACTAGAGG GCCTGGGGAC TCCAGTGTAC GCACCACCAC CTGCCTCGG TGCTTCTGGG

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 · E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P ·
 2101 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC
 ACTCCAGTTC AAGTTGACCA TGCACCTGCC GCACCTCCAC GTATTACGGT TCTGTTTCCG

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q ·
2161 GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG GGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
CGCCCTCCTC GTCATGTTGT CGTGCATGGC CCACCAGTCG CAGGAGTGGC AGGACGTGGT

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P ·
2221 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC
CGTGACCGAC TTACCGTTCC TCATGTTTCC GTTCCAGAGG TTGTTTCGGG AGGGTCGGGG

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L ·
2281 CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT
GTAGCTCTTT TGGTAGAGGT TTCGGTTTCC CGTCGGGGCT CTTGGTGTCC ACATGTGGGA

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G ·
2341 GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG
CGGGGGTAGG GCCCTACTCG ACTGGTTCTT GGTCCAGTCG GACTGGACGG ACCAGTTTCC

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y ·
2401 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACCTA
GAAGATAGGG TCGCTGTAGC GGCACCTCAC CCTCTCGTTA CCCGTCGGCC TCTTGTGTGAT

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T ·
2461 CAAGACCACG CCTCCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC
GTTCTGGTGC GGAGGGCACG ACCTGAGGCT GCCGAGGAAG AAGGAGATGT CGTTCGAGTG

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A ·
2521 CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC
GCACCTGTTC TCGTCCACCG TCGTCCCCTT GCAGAAGAGT ACGAGGCACCT ACGTACTCCG

```

human IgG₁-Fc

```

~~~~~
· L H N H Y T Q K S L S L S P G K K D P K ·
2581 TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAA AAGATCCCAA
AGACGTGTTG GTGATGTGCG TCTTCTCGGA GAGGGACAGA GGCCATTTT TTCTAGGGTT

```

human CD28 TM

```

~~~~~
· F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V ·
2641 ATTTTGGGTG CTGGTGGTGG TTGGTGGAGT CCTGGCTTGC TATAGCTTGC TAGTAACAGT
TAAAACCCAC GACCACCACC AACCACCTCA GGACCGAACG ATATCGAACG ATCATTGTCA

```

human CD28 Signaldomäne

human CD28 TM

```

~~~~~
· A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M ·
2701 GGCCTTTAT TTTTCTGGG TGAGGAGTAA GAGGAGCAGG CTCCTGCACA GTGACTACAT
CCGGAAATAA TAAAAGACCC ACTCCTCATT CTCCTCGTCC GAGGACGTGT CACTGATGTA

```

human CD28 Signaldomäne

```

~~~~~
· N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P ·
2761 GAACATGACT CCCCCTGCC CCGGGCCCAC CCGCAAGCAT TACCAGCCCT ATGCCCCCCC
CTTGTACTGA GGGCGGGCGG GGCCCGGGTG GCGTTCGTA ATGGTCGGGA TACGGGGGGG

```

human CD28 Signaldomäne

```

~~~~~
                                EcoRI
                                ~~~~~
· R D F A A Y R S *
2821 ACGCGACTTC GCAGCCTATC GTCCTGAGA ATTTCGAGCAT
    TCGCGTGAAG CGTCGGATAG CGAGGACTCT TAAGCTCGTA

```

6.1.3 pBullet-Lκ-BW431/26scFv-CD8 hinge-CD8 TM-γ (#1331 CAR, C-CD8-γ)

```

                                kappa Leader
                                ~~~~~
                                XbaI      NcoI
                                ~~~~~
1      M D F Q V Q I F S F L L
      TCCTCTAGAC TGCCATGGAT TTTCAGGTGC AGATTTTCAG CTTCTGCTA
      AGGAGATCTG ACGGTACCTA AAAGTCCACG TCTAAAAGTC GAAGGACGAT

kappa Leader
~~~~~
                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
                                XbaI
                                ~~~~~
61   I S A S V I M S R G V H S Q V Q L Q E S
      ATCAGTGCCT CAGTCATAAT GTCTAGAGGT GTCCACTCCC AGGTCCAAC TGCAGGAGTCA
      TAGTCACGGA GTCAGTATTA CAGATCTCCA CAGGTGAGGG TCCAGGTTGA CGTCCTCAGT

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
121  G P G L V R P S Q T L S L T C T V S G F
      GGTCCAGGTC TTGTGAGACC TAGCCAGACC CTGAGCCTGA CCTGCACCGT GTCTGGCTTC
      CCAGGTCCAG AACACTCTGG ATCGGTCTGG GACTCGGACT GGACGTGGCA CAGACCGAAG

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
181  T I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E
      ACCATCAGCA GTGGTTATAG CTGGCACTGG GTGAGACAGC CACCTGGACG AGGTCTTGAG
      TGGTAGTCGT CACCAATATC GACCGTGACC CACTCTGTCG GTGGACCTGC TCCAGAACTC

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
241  W I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R
      TGGATTGGAT ACATACAGTA CAGTGGTATC ACTAACTACA ACCCTCTCT CAAAAGTAGA
      ACCTAACCTA TGTATGTCAT GTCACCATAG TGATTGATGT TGGGGAGAGA GTTTTTCATCT

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
301  V T M L V D T S K N Q F S L R L S S V T
      GTGACAATGC TGGTAGACAC CAGCAAGAAC CAGTTCAGCC TGAGACTCAG CAGCGTGACA
      CACTGTTACG ACCATCTGTG GTCGTTCTTG GTCAGTCCGG ACTCTGAGTC GTCGCACTGT

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
361  A A D T A V Y Y C A R E D Y D Y H W Y F
      GCCGCCGACA CCGCGGTCTA TTATTGTGCA AGAGAAGACT ATGATTACCA CTGGTACTTC
      CCGCGGCTGT GCGCCAGAT AATAACAGT TCTCTTCTGA TACTAATGGT GACCATGAAG

```


BW431/26scFv

~~~~~  
 D V W G Q G T T V T V S S G G G G S G G  
 421 GATGTCGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG GAGGTGGTGG ATCGGGCGGT  
 CTACAGACCC CGGTTCCCTG GTGCCAGTGG CAGAGGAGTC CTCCACCACC TAGCCCGCCA

## BW431/26scFv

~~~~~  
 G G S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S
 481 GGCGGGTCGG GTGGCGGCGG ATCTGACATC CAGCTGACCC AGAGCCCAAG CAGCCTGAGC
 CCGCCCAGCC CACCGCCGCC TAGACTGTAG GTCGACTGGG TCTCGGGTTC GTCGGACTCG

BW431/26scFv

~~~~~  
 XhoI  
 ~~~~~  
 A S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M
 541 GCCAGCGTGG GTGACAGAGT GACCATCACC TGTAAGTACCA GCTCGAGTGT AAGTTACATG
 CGGTCGCACC CACTGTCTCA CTGGTAGTGG ACATCATGGT CGAGCTCACA TTCATGTATC

BW431/26scFv

~~~~~  
 H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N  
 601 CACTGGTACC AGCAGAAGCC AGGTAAGGCT CCAAAGCTGC TGATCTACAG CACATCCAAC  
 GTGACCATGG TCGTCTTCGG TCCATTCCGA GGTTCGACG ACTAGATGTC GTGTAGGTTG

## BW431/26scFv

~~~~~  
 L A S G V P S R F S G S G S G T D F T F
 661 CTGGCTTCTG GTGTGCCAAG CAGATTCAGC GGTAGCGGTA GCGGTACCGA CTTCACCTTC
 GACCGAAGAC CACACGGTTC GTCTAAGTCG CCATCGCCAT CGCCATGGCT GAAGTGGAG

BW431/26scFv

~~~~~  
 T I S S L Q P E D I A T Y Y C H Q W S S  
 721 ACCATCAGCA GCCTCCAGCC AGAGGACATC GCCACCTACT ACTGCCATCA GTGGAGTAGT  
 TGGTAGTCGT CGGAGGTCGG TCTCCTGTAG CGGTGGATGA TGACGGTAGT CACCTCATCA

## human CD8 Brückendomäne

## BW431/26scFv

~~~~~  
 BamHI
 ~~~~~  
 Y P T F G Q G T K V E I K V D P L S N S  
 781 TATCCCACGT TCGGCCAAGG GACCAAGGTG GAGATCAAAG TGGATCCTCT GAGCAACTCC  
 ATAGGGTGCA AGCCGGTTC CTGGTCCAC CTCTAGTTTC ACCTAGGAGA CTCGTTGAGG

## human CD8 Brückendomäne

~~~~~  
 I M Y F S H F V P V F L P A K P T T T P
 841 ATCATGTACT TCAGCCACTT CGTGCCGGTC TTCCTGCCAG CGAAGCCCAC CACGACGCCA
 TAGTACATGA AGTCGGTGAA GCACGGCCAG AAGGACGGTC GCTTCGGGTG GTGCTGCGGT

human CD8 Brückendomäne

~~~~~  
 A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P  
 901 GCGCCGCGAC CACCAACACC GGCGCCACC ATCGCGTCGC AGCCCCTGTC CCTGCGCCCA  
 CGCGGCGCTG GTGGTTGTGG CCGCGGGTGG TAGCGCAGCG TCGGGGACAG GGACGCGGGT

## human CD8 Brückendomäne

~~~~~  
 E A C R P A A G G A V H T R G L D F A C
 961 GAGGCGTGCC GGCCAGCGC GGGGGGCGCA GTGCACACGA GGGGGCTGGA CTTCGCCTGT
 CTCCGCACGG CCGGTCCCG CCCCCGCGT CACGTGTGCT CCCCCGACCT GAAGCGGACA

```

                                human CD8 TM
                                ~~~~~
human CD8 Brückendomäne
~~~~~
  D I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V
1021 GATATCTACA TCTGGGCGCC CTTGGCCGGG ACTTGTGGGG TCCTTCTCCT GTCACTGGTT
    CTATAGATGT AGACCCGCGG GAACCGGCC TGAACACCCC AGGAAGAGGA CAGTGACCAA

                                gamma Signaldomäne
                                ~~~~~

                                human CD8 TM
                                ~~~~~
  I T L Y C N H R L K I Q V R K A A I T S
1081 ATCACCCCTT ACTGCAACCA CCGACTGAAG ATCCAAGTGC GAAAGGCAGC TATAACCAGC
    TAGTGGGAAA TGACGTTGGT GGCTGACTTC TAGGTTACAG CTTTCCGTCG ATATTGGTCG
                                gamma Signaldomäne
                                ~~~~~
  Y E K S D G V Y T G L S T R N Q E T Y E
1141 TATGAGAAAT CAGATGGTGT TTACACGGGC CTGAGCACCA GGAACCAGGA GACTTACGAG
    ATACTCTTTA GTCTACCACA AATGTGCCCG GACTCGTGGT CCTTGGTCCT CTGAATGCTC

                                gamma Signaldomäne
                                ~~~~~

                                XhoI
                                ~~~~~
  T L K H E K P P Q *
1201 ACTCTGAAGC ATGAGAAACC ACCACAGTAG CTCGAGAGAT
    TGAGACTTCG TACTCTTTGG TGGTGTCACT GAGCTCTCTA

```

6.1.4 pMP71-L κ -BW431/26scFv-CD8- γ -P2A-L κ -C6-B1D2scFv-Fc-CD28 (#1344 CARs, C-CD8- γ -P2A-E-Fc-CD28)

```

                                kappa Leader
                                ~~~~~
                                NcoI
                                ~~~~~
  M D F Q V Q I F S F L L I S
1  AT GGATTTTCAG GTGCAGATTT TCAGCTTCCT GCTAATCAGT
    TA CCTAAAAGTC CACGTCTAAA AGTCGAAGGA CGATTAGTCA

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~

                                kappa Leader
                                ~~~~~
                                XbaI
                                ~~~~~
  A S V I M S R G V H S Q V Q L Q E S G P
61 GCCTCAGTCA TAATGTCTAG AGGTGTCCAC TCCCAGGTCC AACTGCAGGA GTCAGGTCCA
    CGGAGTCAGT ATTACAGATC TCCACAGGTG AGGTCCAGG TTGACGTCCT CAGTCCAGGT

                                BW431/26scFv
                                ~~~~~
  G L V R P S Q T L S L T C T V S G F T I
121 GGTCTTGTGA GACCTAGCCA GACCCTGAGC CTGACCTGCA CCGTGTCTGG CTTACCATC
    CCAGAACACT CTGGATCGGT CTGGGACTCG GACTGGACGT GGCACAGACC GAAGTGGTAG

```

BW431/26scFv

~~~~~  
 S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E W I  
 181 AGCAGTGGTT ATAGCTGGCA CTGGGTGAGA CAGCCACCTG GACGAGGTCT TGAGTGGATT  
 TCGTCACCAA TATCGACCGT GACCACTCT GTCGGTGGAC CTGCTCCAGA ACTCACCTAA

## BW431/26scFv

~~~~~  
 G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V T
 241 GGATACATAC AGTACAGTGG TATCACTAAC TACAACCCT CTCTCAAAAG TAGAGTGACA
 CCTATGTATG TCATGTCACC ATAGTGATTG ATGTTGGGGA GAGAGTTTTC ATCTCACTGT

BW431/26scFv

~~~~~  
 M L V D T S K N Q F S L R L S S V T A A  
 301 ATGCTGGTAG ACACCAGCAA GAACCAGTTC AGCCTGAGAC TCAGCAGCGT GACAGCCGCC  
 TACGACCATC TGTGGTCGTT CTTGGTCAAG TCGGACTCTG AGTCGTCGCA CTGTCGGCGG

## BW431/26scFv

~~~~~  
 D T A V Y Y C A R E D Y D Y H W Y F D V
 361 GACACCGCGG TCTATTATTG TGCAAGAGAA GACTATGATT ACCACTGGTA CTTTCGATGC
 CTGTGGCGCC AGATAATAAC ACGTTCTCTT CTGATACTAA TGGTGACCAT GAAGCTACAG

BW431/26scFv

~~~~~  
 W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G  
 421 TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGGAGGTG GTGGATCGGG CGGTGGCGGG  
 ACCCCGGTTC CCTGGTGCCA GTGGCAGAGG AGTCCTCCAC CACCTAGCCC GCCACCGCCC

## BW431/26scFv

~~~~~  
 S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S A S
 481 TCGGGTGGCG GCGGATCTGA CATCCAGCTG ACCCAGAGCC CAAGCAGCCT GAGCGCCAGC
 AGCCACCGC CGCCTAGACT GTAGGTCGAC TGGGTCTCGG GTTCGTCGGA CTCGCGGTCC

BW431/26scFv

XhoI

~~~~~  
 V G D R V T I T C S T S S S V S Y M H W  
 541 GTGGGTGACA GAGTGACCAT CACCTGTAGT ACCAGCTCGA GTGTAAGTTA CATGCACTGG  
 CACCCACTGT CTCACTGGTA GTGGACATCA TGGTCGAGCT CACATTCAAT GTACGTGACC

## BW431/26scFv

~~~~~  
 Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L A
 601 TACCAGCAGA AGCCAGGTAA GGCTCAAAG CTGCTGATCT ACAGCACATC CAACCTGGCT
 ATGGTCGTCT TCGGTCCATT CCGAGGTTTC GACGACTAGA TGTCGTGTAG GTTGACCGA

BW431/26scFv

~~~~~  
 S G V P S R F S G S G S G T D F T F T I  
 661 TCTGGTGTGC CAAGCAGATT CAGCGGTAGC GGTAGCGGTA CCGACTTAC CTTACCATC  
 AGACCACACG GTTCGTCTAA GTCGCCATCG CCATCGCCAT GGCTGAAGTG GAAGTGGTAG

## BW431/26scFv

~~~~~  
 S S L Q P E D I A T Y Y C H Q W S S Y P
 721 AGCAGCCTCC AGCCAGAGGA CATCGCCACC TACTACTGCC ATCAGTGGAG TAGTTATCCC
 TCGTCGGAGG TCGGTCTCCT GTAGCGGTGG ATGATGACGG TAGTCACCTC ATCAATAGGG

```

          BW431/26scFv                                human CD8 Brückendomäne
~~~~~
                                     BamHI
                                     ~~~~~
      T F G Q G T K V E I K V D P L S N S I M
781 ACGTTTCGGCC AAGGGACCAA GGTGGAGATC AAAGTGGATC CTCTGAGCAA CTCCATCATG
    TGCAAGCCGG TTCCCTGGTT CCACCTCTAG TTTCACCTAG GAGACTCGTT GAGGTAGTAC

          human CD8 Brückendomäne
~~~~~
      Y F S H F V P V F L P A K P T T T P A P
841 TACTTCAGCC ACTTCGTGCC GGTCTTCCTG CCAGCGAAGC CCACCACGAC GCCAGCGCCG
    ATGAAGTCGG TGAAGCACGG CCAGAAGGAC GGTGCTTCG GGTGGTGTG CCGTCGCGCG

          human CD8 Brückendomäne
~~~~~
      R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A
901 CGACCACCAA CACCGGCGCC CACCATCGCG TCGCAGCCCC TGTCCTTCG CCCAGAGGCG
    GCTGGTGGTT GTGGCCGCGG GTGGTAGCGC AGCGTCGGGG ACAGGGACGC GGGTCTCCGC

                                                     human CD8 TM
                                                     ~~~~

          human CD8 Brückendomäne
~~~~~
      C R P A A G G A V H T R G L D F A C D I
961 TGCCGGCCAG CGGCGGGGGG CGCAGTGCAC ACGAGGGGGC TGGACTTCGC CTGTGATATC
    ACGGCCGGTC GCCGCCCCC GCGTCACGTG TGCTCCCCCG ACCTGAAGCG GACACTATAG

          human CD8 TM
~~~~~
      Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T
1021 TACATCTGGG CGCCCTTGGC CGGGACTTGT GGGGTCCTTC TCCTGTCACT GGTTATCACC
    ATGTAGACC GCGGGAACCG GCCCTGAACA CCCCAGGAAG AGGACAGTGA CCAATAGTGG

          human CD8 TM
~~~~~

          gamma Signaldomäne
~~~~~
      L Y C N H R L K I Q V R K A A I T S Y E
1081 CTTTACTGCA ACCACCGACT GAAGATCCAA GTGCGAAAGG CAGCTATAAC CAGCTATGAG
    GAAATGACGT TGGTGGCTGA CTTCTAGGTT CACGCTTTC GTCGATATTG GTCGATACTC

          gamma Signaldomäne
~~~~~
      K S D G V Y T G L S T R N Q E T Y E T L
1141 AAATCAGATG GTGTTTACAC GGGCCTGAGC ACCAGGAACC AGGAGACTTA CGAGACTCTG
    TTTAGTCTAC CACAAATGTG CCCGACTCG TGTCCTTGG TCCTCTGAAT GCTCTGAGAC

          gamma Signaldomäne
~~~~~

          P2A Peptid
~~~~~
      K H E K P P Q G S G A T N F S L L K Q A
1201 AAGCATGAGA AACCACCACA GGGAAGCGGC GCCACGAACT TCTCTCTGTT AAAGCAAGCA
    TTCGTACTCT TTGGTGGTGT CCCTTCGCCG CGGTGCTTGA AGAGAGACAA TTTCGTTTCGT

          kappa Leader
~~~~~

          P2A Peptid
~~~~~

          NcoI
          ~~~~~
      G D V E E N P G P M D F Q V Q I F S F L
1261 GGAGACGTGG AAGAAAACCC CGGTCCCATG GATTTTCAGG TGCAGATTTT CAGCTTCCTG
    CCTCTGCACC TTCTTTTGGG GCCAGGGTAC CTAAAAGTCC ACGTCTAAAA GTCGAAGGAC

```

C6-B1D2scFv

kappa Leader

XbaI

1321 L I S A S V I M S R P A M A Q V Q L V Q
 CTAATCAGTG CCTCAGTCAT AATGTCTAGA CCGGCGATGG CCCAGGTGCA GCTGGTGCAG
 GATTAGTCAC GGAGTCAGTA TTACAGATCT GGCCGCTACC GGGTCCACGT CGACCACGTC

C6-B1D2scFv

1381 S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G
 TCTGGGGCAG AGGTGAAAAA GCCCGGGGAG TCTCTGAAGA TCTCCTGTAA GGGTTC2GGA
 AGACCCCGTC TCCACTTTTT CGGGCCCTC AGAGACTTCT AGAGGACATT CCAAGACCT

C6-B1D2scFv

1441 Y S F T S Y W I A W V R Q M P G K G L E
 TACAGCTTTA CCAGCTACTG GATCGCCTGG GTGCGCCAGA TGCCCGGGAA AGGCCTGGAG
 ATGTCGAAAT GGTTCGATGAC CTAGCGGACC CACGCGGTCT ACGGGCCCTT TCCGGACCTC

C6-B1D2scFv

1501 Y M G L I Y P G D S D T K Y S P S F Q G
 TACATGGGGC TCATCTATCC TGGTACTCT GACACCAAAT ACAGCCCGTC CTTCCAAGGC
 ATGTACCCCG AGTAGATAGG ACCACTGAGA CTGTGGTTTA TGTGCGGCAG GAAGGTTCCG

C6-B1D2scFv

1561 Q V T I S V D K S V S T A Y L Q W S S L
 CAGGTCACCA TCTCAGTCGA CAAGTCCGTC AGCACTGCCT ACTTGCAATG GAGCAGTCTG
 GTCCAGTGGT AGAGTCAGCT GTTCAGGCAG TCGTGACGGA TGAACGTAC CTCGTCAGAC

C6-B1D2scFv

1621 K P S D S A V Y F C A R H D V G Y C T D
 AAGCCCTCGG ACAGCGCCGT GTATTTTTGT GCGAGACATG ACGTGGGATA TTGCACCGAC
 TTCGGGAGCC TGTCGCGGCA CATAAAAACA CGCTCTGTAC TGCACCCTAT AACGTGGCTG

C6-B1D2scFv

1681 R T C A K W P E W L G V W G Q G T L V T
 CGGACTTGCG CAAAGTGGCC TGAATGGCTG GCGTATGGG GCCAGGGCAC CCTGGTCACC
 GCCTGAACGC GTTTCACCGG ACTTACCGAC CCGCATACCC CGGTCCCGTG GGACCAGTGG

C6-B1D2scFv

1741 V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q S
 GTCTCCTCAG GTGGAGGCGG TTCAGGCGGA GGTGGCTCTG GCGGTGGCGG ATCGCAGTCT
 CAGAGGAGTC CACCTCCGCC AAGTCCGCCT CCACCGAGAC CGCCACCGCC TAGCGTCAGA

C6-B1D2scFv

1801 V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C
 GTGTTGACGC AACCGCCCTC AGTGTCTGCG GCCCAGGAC AGAAGGTCAC CATCTCCTGC
 CACAAC2GCG TTGGCGGGAG TCACAGACGC CGGGTCTCTG TCTTCCAGTG GTAGAGGACG

C6-B1D2scFv

1861 S G S S S N I G N N Y V S W Y Q Q L P G
 TCTGGAAGCA GCTCCAACAT TGGGAATAAT TATGTATCCT GGTACCAGCA GCTCCCAGGA
 AGACCTTCGT CGAGGTTGTA ACCCTTATTA ATACATAGGA CCATGGTCTG CGAGGGTCTC

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 T A P K L L I Y D H T N R P A G V P D R  
 1921 ACAGCCCCCA AACTCCTCAT CTATGATCAC ACCAATCGGC CCGCAGGGGT CCCTGACCGA  
 TGTCGGGGGT TTGAGGAGTA GATACTAGTG TGTTAGCCG GCGTCCCCA GGGACTGGT

## C6-B1D2scFv

~~~~~  
 F S G S K S G T S A S L A I S G F R S E
 1981 TTCTCTGGCT CCAAGTCTGG CACCTCAGCC TCCCTGGCCA TCAGTGGGTT CCGGTCCGAG
 AAGAGACCGA GGTTCAGACC GTGGAGTCGG AGGGACCGGT AGTCACCCAA GGCCAGGCTC

C6-B1D2scFv

~~~~~  
 D E A D Y Y C A S W D Y T L S G W V F G  
 2041 GATGAGGCTG ATTATTACTG TGCCTCCTGG GACTACACCC TCTCGGGCTG GGTGTTCCGGC  
 CTACTCCGAC TAATAATGAC ACGGAGGACC CTGATGTGGG AGAGCCCGAC CCACAAGCCG

## C6-B1D2scFv

human IgG<sub>1</sub>-Fc

## BamHI

~~~~~  
 G G T K V T V L G A D P A E P K S P D K
 2101 GGAGGGACCA AGGTCACCGT CCTAGGTGCG GATCCCGCCG AGCCCAAATC TCCTGACAAA
 CCTCCCTGGT TCCAGTGGCA GGATCCACGC CTAGGGCGGC TCGGGTTTAG AGGACTGTTT

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L  
 2161 ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCACCT GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC  
 TGAGTGTGTA CGGGTGGCAC GGGTCGTGGA CTTGAGGACC CCCCTGGCAG TCAGAAGGAG

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V
 2221 TTCCCCCAA AACCCAAGGA CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG
 AAGGGGGGTT TTGGGTTTCT GTGGGAGTAC TAGAGGGCCT GGGGACTCCA GTGTACGCAC

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V  
 2281 GTGGTGGACG TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG  
 CACCACCTGC ACTCGGTGCT TCTGGGACTC CAGTTCAAGT TGACCATGCA CCTGCCGCAC

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
 2341 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACCGGGTG
 CTCCACGTAT TACGGTTCTG TTTCGGCGCC CTCCTCGTCA TGTTGTCGTG CATGGCCCAC

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K  
 2401 GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG  
 CAGTCGCAGG AGTGGCAGGA CGTGGTCTCT ACCGACTTAC CGTTCCTCAT GTTCACGTTC

human IgG<sub>1</sub>-Fc

~~~~~  
 V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q
 2461 GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG
 CAGAGGTTGT TTCGGGAGGG TCGGGGGTAG CTCTTTTGGT AGAGGTTTCG GTTTCCTGTC

human IgG₁-Fc

~~~~~  
 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q  
 2521 CCCCAGAAC CACAGGTGTA CACCCTGCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG  
 GGGGCTCTTG GTGTCCACAT GTGGGACGGG GGTAGGGCCC TACTCGACTG GTTCTTGCTC

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
2581 GTCAGCCTGA CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
CAGTCGGACT GGACGGACCA GTTTCCGAAG ATAGGGTCGC TGTAGCGGCA CCTCACCTC

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
2641 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCGACGGC
TCGTTACCCG TCGGCCTCTT GTTGATGTTT TGGTGCGGAG GGCACGACCT GAGGCTGCCG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
2701 TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC
AGGAAGAAGG AGATGTCGTT CGAGTGGCAC CTGTTCTCGT CCACCGTCGT CCCCTTGCGAG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

```

~~~~~
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
2761 TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC
AAGAGTACGA GGCACACTCGT ACTCCGAGAC GTGTTGGTGA TGTGCGTCTT CTCGGAGAGG

```

human IgG<sub>1</sub>-Fc

## human CD28 TM

```

~~~~~
L S P G K K D P K F W V L V V V G G V L
2821 CTGTCTCCGG GTAAAAAAGA TCCCAAATTT TGGGTGCTGG TGGTGGTTGG TGGAGTCCTG
GACAGAGGCC CATTTTTTCT AGGGTTTAAA ACCCACGACC ACCACCAACC ACCTCAGGAC

```

## human CD28 Signaldomäne

## human CD28 TM

```

~~~~~
A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R
2881 GCTTGCTATA GCTTGCTAGT AACAGTGGCC TTTATTATTT TCTGGGTGAG GAGTAAGAGG
CGAACGATAT CGAACGATCA TTGTCACCGG AAATAATAAA AGACCCACTC CTCATTCTCC

```

## human CD28 Signaldomäne

```

~~~~~
S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R
2941 AGCAGGCTCC TGCACAGTGA CTACATGAAC ATGACTCCCC GCCGCCCCGG GCCCACCCGC
TCGTCCGAGG ACGTGTCACT GATGTACTTG TACTGAGGGG CCGCGGGGCC CGGGTGGGCG

```

## human CD28 Signaldomäne

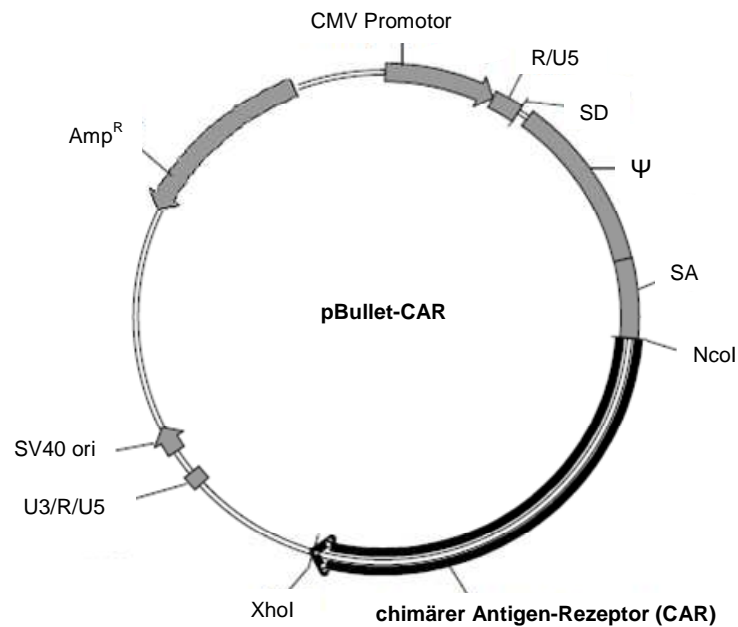
```

~~~~~
K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S *
3001 AAGCATTACC AGCCCTATGC CCCCCACGC GACTTCGCAG CCTATCGCTC CTGA
TTCGTAATGG TCGGGATACG GGGGGGTGCG CTGAAGCGTC GGATAGCGAG GACT

```

## 6.2 Retrovirale Expressionsvektoren

### 6.2.1 pBullet

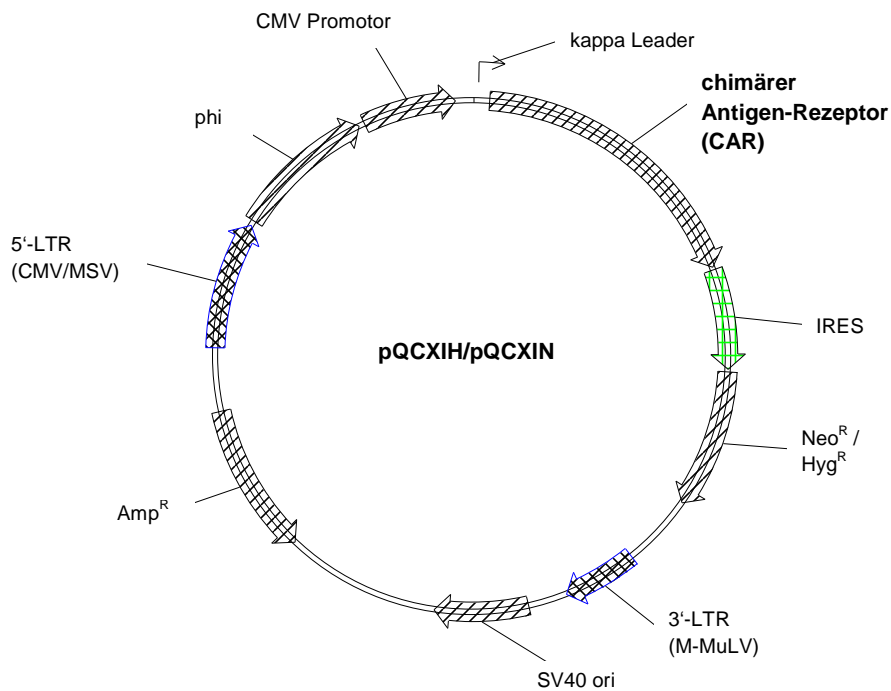


**Abbildung 35: Chimärer Antigen-Rezeptor im Vektor pBullet.**

Der Vektor pBullet leitet sich von dem retroviralen Vektor pSTITCH ab (Weijtens et al., 1998) und enthält das regulatorische Element SV40 ori sowie das Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>). Die Gesamtgröße des Vektors ohne CAR beträgt ~5,4 kb. Die Expressionskassette des chimären Antigen-Rezeptors wird in die Multiple Klonierungsstelle zwischen den Restriktionsschnittstellen NcoI und XhoI eingefügt und steht unter der Kontrolle des CMV Promotors.



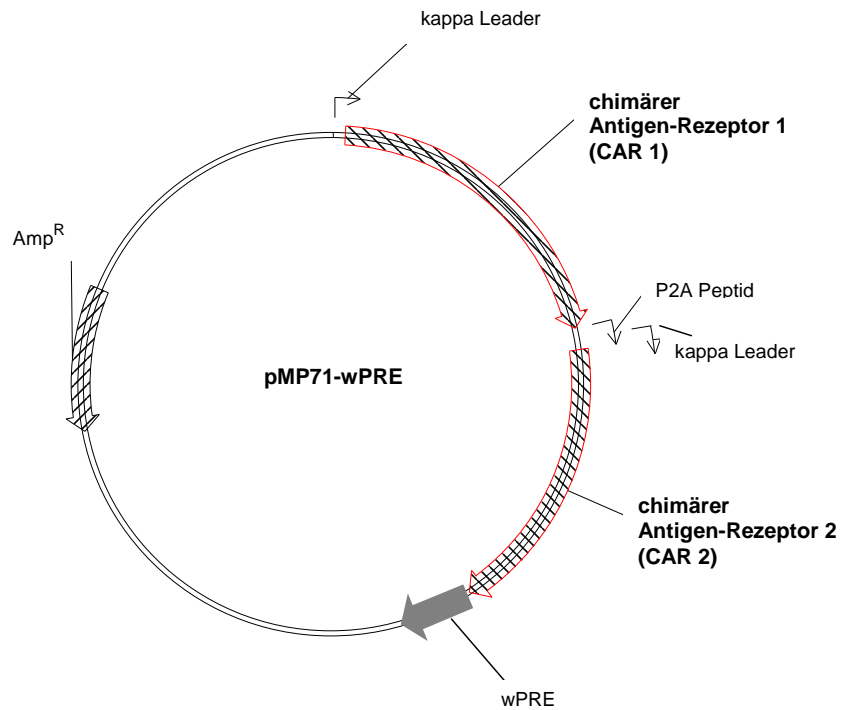
## 6.2.2 pQCXIH/N



**Abbildung 36: Chimärer Antigen-Rezeptor im Vektor pQCXIH/pQCXIN.**

Die Vektoren pQCXIH und pQCXIN (Takara Bio Europe/Iontech, Saint-Germain-en-Laye, F) enthalten das regulatorische Element SV40 ori sowie das Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>). Die Gesamtgröße des Vektors ohne CAR beträgt ~7,8 kb (pQCXIH) und ~7,4 kb (pQCXIN). Die Expressionskassette des chimären Antigen-Rezeptors ist über eine intraribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit einem Hygromycin B-Resistenzgen (Hyg<sup>R</sup> bei pQCXIH) oder mit einem Neomycin Resistenzgen (Neo<sup>R</sup> bei pQCXIN) verknüpft und steht unter der Kontrolle des CMV/MSV Promotors. LTR, long terminal repeat

## 6.2.3 pMP71-wPRE



**Abbildung 37: Chimäre Antigen-Rezeptoren im Vektor pMP71-wPRE.**

Der Vektor pMP71-wPRE enthält das Ampicillin-Resistenzgen ( $Amp^R$ ) sowie das posttranskriptionale regulatorische Element des Murmeltier Hepatitis Virus (wPRE), welches als 3'-Enhancer dient (Engels et al., 2003). Die Gesamtgröße des Vektors ohne CARs beträgt ~ 6,2 kb. Die bicistronische Expressionskassette verknüpft die beiden chimären Antigen-Rezeptoren über ein P2A Peptid.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alvarez-Vallina L and Hawkins RE. Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur J Immunol* 26: 2304–2309 (1996).
- Anurathapan U, Chan RC, Hindi HF, Mucharla R, Bajgain P, Hayes BC, Fisher WE, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK, Leen AM and Vera JF. Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells. *Mol Ther* 22: 623–633 (2014).
- Bosslet K, Lüben G, Schwarz A, Hundt E, Harthus HP, Seiler FR, Muhrer C, Klöppel G, Kayser K and Sedlacek HH. Immunohistochemical localization and molecular characteristics of three monoclonal antibody-defined epitopes detectable on carcinoembryonic antigen (CEA). *Int J Cancer* 36: 75–84 (1985).
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77–89 (1968).
- Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M and Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118: 4817–4828 (2011).
- Brentjens R, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblatt T, Maslak P, Frattini M and Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5: 177ra38 (2013).
- Bridgeman JS, Ladell K, Sheard VE, Miners K, Hawkins RE, Price DA and Gilham DE. CD3 $\zeta$ -based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy. *Clin Exp Immunol* 175: 258–267 (2014).
- Brockner T and Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med* 181: 1653–1659 (1995).
- Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, Drago J, Noguchi M, Grinberg A and Bloom ET. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2: 223–238 (1995).

- Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP and Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol* 173: 7647–7653 (2004).
- Chmielewski M, Hombach AA and Abken H. CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T-cell attack. *Gene Ther* 18: 62–72 (2011).
- Chmielewski M, Hombach AA and Abken H. Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirectioned T Cells. *Front Immunol* 4: 371 (2013).
- Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, Chung SS, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, He Q, Fink M, Shinglot H, Youssif M, Satter M, Wang Y, Hosey J, Quintanilla H, Halton E, Bernal Y, Bouhassira DC, Arcila ME, Gonen M, Roboz GJ, Maslak P, Douer D, Frattini MG, Giralto S, Sadelain M and Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 6: 224ra25 (2014).
- Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR and Brown PO. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11796–11801 (2002).
- Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop AE, Spencer DM, Rooney CM and Brenner MK. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 365: 1673–1683 (2011).
- Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B and Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev* 257: 107–126 (2014).
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE and Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26: 5233–5239 (2008).
- Dustin ML and Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283: 649–650 (1999).
- Engels B, Cam H, Schüler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T and Uckert W. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14: 1155–1168 (2003).
- Fedorov VD, Sadelain M and Kloss CC. Novel approaches to enhance the specificity and safety of engineered T cells. *Cancer J* 20: 160–165 (2014).

- Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR and Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 161: 2791–2797 (1998).
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F and Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14: 491–499 (1993).
- Garrity PA, Chen D, Rothenberg EV and Wold BJ. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 14: 2159–2169 (1994).
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL and June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368: 1509–1518 (2013).
- Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, Irlam J, Chester KA, Kemshead JT, Shaw DM, Embleton MJ, Stern PL and Gilham DE. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother* 28: 203–211 (2005).
- Hanada K and Restifo NP. Double or nothing on cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 31: 33–34 (2013).
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580 (1983).
- Hemmer B, Stefanova I, Vergelli M, Germain RN and Martin R. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* 160: 5807–5814 (1998).
- Hermiston ML, Xu Z and Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107–137 (2003).
- Holmes DS and Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193–197 (1981).
- Hombach A and Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 56: 731–737 (2007).
- Hombach A, Pohl C, Heuser C, Sircar R, Koch D, Diehl V and Abken H. Generation of the single chain antibody fragment conserves the idiotypic profile of the anti-CD30 monoclonal antibody HRS3. *Scand J Immunol* 48: 497–501 (1998).
- Hombach A, Schneider C, Sent D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, Kruis W, Bolhuis RL, Pohl C and Abken H. An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood T cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer* 88: 115–120 (2000).

- Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, Seliger B and Abken H. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167: 6123–6131 (2001).
- Huppa JB and Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3: 973–983 (2003).
- Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui C-H, Geiger TL and Campana D. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 676–684 (2004).
- Inman BA, Frigola X, Dong H and Kwon ED. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 15–30 (2007).
- Itoh Y and Germain RN. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J Exp Med* 186: 757–766 (1997).
- Jost LM, Kirkwood JM and Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods* 147: 153–165 (1992).
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A and June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3: 95ra73 (2011).
- Kaulen H, Seemann G, Bosslet K, Schwaeble W and Dippold W. Humanized anti-carcinoembryonic antigen antibody: strategies to enhance human tumor cell killing. *Year Immunol* 7: 106–109 (1993).
- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, White DE, Wunderlich JR, Canevari S, Rogers-Freezer L, Chen CC, Yang JC, Rosenberg SA and Hwu P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12: 6106–6115 (2006).
- Khong HT and Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3: 999–1005 (2002).
- Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M and Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* 31: 71–75 (2013).
- Kochenderfer JN and Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol* 10: 267–276 (2013).
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan D-AN, Morgan RA, Laurencot C and Rosenberg SA. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 119: 2709–2720 (2012).

- Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan DA, Morton KE, Toomey MA and Rosenberg SA. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 33: 540–549 (2015).
- Kumari S, Curado S, Mayya V and Dustin ML. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim Biophys Acta* 1838: 546–556 (2014).
- Kung P, Goldstein G, Reinherz EL and Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 206: 347–349 (1979).
- Lafreniere R and Rosenberg SA. A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. *J Natl Cancer Inst* 76: 309–322 (1986).
- Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, Gratama JW, Stoter G and Oosterwijk E. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *JCO* 24: e20–e22 (2006).
- Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, Song D, Sandaltzopoulos R, June CH and Powell DJ. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res* 1: 43–53 (2013).
- Lanzavecchia A and Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2: 487–492 (2001).
- Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, Fry TJ, Orentas R, Sabatino M, Shah NN, Steinberg SM, Stroncek D, Tschernia N, Yuan C, Zhang H, Zhang L, Rosenberg SA, Wayne AS and Mackall CL. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385: 517–528 (2015).
- Lillemeier BF, Mörtelmaier MA, Forstner MB, Huppa JB, Groves JT and Davis MM. TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. *Nat Immunol* 11: 90–96 (2010).
- Mañes S and Viola A. Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol* 23: 59–69 (2006).
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL and Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 371: 1507–1517 (2014).
- Maus MV, Grupp SA, Porter DL and June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 123: 2625–2635 (2014).

- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N and Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82–86 (1998).
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM and Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 18: 843–851 (2010).
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263–273 (1986).
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML and Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392–8396 (1993).
- Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, Quezada SA, Peggs KS and Pule M. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood* 124: 1277–1287 (2014).
- Pohl C, Renner C, Schwonzen M, Sieber M, Lorenz P, Pfreundschuh M and Diehl V. Anti-idiotypic vaccine against Hodgkin's lymphoma: induction of B- and T-cell immunity across species barriers against CD30 antigen by murine monoclonal internal image antibodies. *Int J Cancer* 50: 958–967 (1992).
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A and June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365: 725–733 (2011).
- Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM and Brenner MK. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 12: 933–941 (2005).
- Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, Yvon E, Weiss HL, Liu H, Rooney CM, Heslop HE and Brenner MK. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14: 1264–1270 (2008).
- Rachmilewitz J, Riely GJ, Huang JH, Chen A and Tykocinski ML. A rheostatic mechanism for T-cell inhibition based on elevation of activation thresholds. *Blood* 98: 3727–3732 (2001).
- Rachmilewitz J, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R and Tykocinski ML. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J Biol Chem* 278: 14059–14065 (2003).
- Ramos CA, Savoldo B and Dotti G. CD19-CAR trials. *Cancer J* 20: 112–118 (2014).
- Riët T. Erhöhung der Antigen-Selektivität von T-Zellen durch Koexpression chimärer Antigen-Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität. Dissertation Universität zu Köln (2010).



- Robbins PF, Kantor JA, Salgaller M, Hand PH, Fernsten PD and Schlom J. Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 51: 3657–3662 (1991).
- Sadelain M, Brentjens R and Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 3: 388–398 (2013).
- Sanchez-Lockhart M and Miller J. Engagement of CD28 outside of the immunological synapse results in up-regulation of IL-2 mRNA stability but not IL-2 transcription. *J Immunol* 176: 4778–4784 (2006).
- Sanchez-Lockhart M, Marin E, Graf B, Abe R, Harada Y, Sedwick CE and Miller J. Cutting edge: CD28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression are controlled through different signaling pathways. *J Immunol* 173: 7120–7124 (2004).
- Sanger F. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 191: 317–333 (1975).
- Schumacher TN. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2: 512–519 (2002).
- Shaw AS and Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6: 361–369 (1997).
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F and Stall AM. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855–867 (1992).
- Song D-G, Ye Q, Poussin M, Harms GM, Figini M and Powell DJ. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood* 119: 696–706 (2012).
- Tavano R, Gri G, Molon B, Marinari B, Rudd CE, Tuosto L and Viola A. CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. *J Immunol* 173: 5392–5397 (2004).
- Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S and Viola A. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8: 1270–1276 (2006).
- Textor A, Listopad JJ, Wührmann LL, Perez C, Kruschinski A, Chmielewski M, Abken H, Blankenstein T and Charo J. Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFN $\gamma$ . *Cancer Res* 74: 6796–6805 (2014).
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, Qian X, James SE, Raubitschek A, Forman SJ, Gopal AK, Pagel JM, Lindgren CG, Greenberg PD, Riddell SR and Press OW. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 112: 2261–2271 (2008).
- Trapani JA and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735–747 (2002).

- Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E and Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375: 148–151 (1995).
- Valitutti S, Müller S, Dessing M and Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 183: 1917–1921 (1996).
- Van Lier RA, Brouwer M and Aarden LA. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 18: 167–172 (1988).
- Viola A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol* 22: 322–327 (2001).
- Viola A and Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273: 104–106 (1996).
- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y and Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283: 680–682 (1999).
- Weijtens ME, Willemsen RA, Hart EH and Bolhuis RL. A retroviral vector system “STITCH” in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Ther* 5: 1195–1203 (1998).
- Wetzel S A, McKeithan TW and Parker DC. Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* 169: 6092–6101 (2002).
- Wilson BS, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Gaudet EA and Oliver JM. High resolution mapping of mast cell membranes reveals primary and secondary domains of Fc(epsilon)RI and LAT. *J Cell Biol* 154: 645–658 (2001).
- Winn HJ. Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J Immunol* 86: 228–239 (1961).
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ and Graham MW. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469–3478 (1989).
- Wülfing C and Davis mM. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282: 2266–2269 (1998).
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C and Seed B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8: 723–732 (1998).
- Yokosuka T and Saito T. Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol Rev* 229: 27–40 (2009).

Zhang M, Moran M, Round J, Low TA, Patel VP, Tomassian T, Hernandez JD and Miceli MC. CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J Immunol* 174: 1479–1490 (2005).

Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos CM, Liu X, Brennan AL, Chew A, Carroll RG, Scholler J, Levine BL, Albelda SM and June CH. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* 70: 9053–9061 (2010).

Die klinischen Studien sind zu finden bei:

<https://clinicaltrials.gov>

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Univ.-Professor Dr. Hinrich Abken, der mich mit Hilfsbereitschaft und großem persönlichem Verständnis in jeder Phase dieser Arbeit begleitet hat. Darüber hinaus hat er die Freiheit zu selbstständigem Arbeiten stets zugelassen und gefördert. Unsere vielen wertvollen, zielführenden und auch lehrreichen Diskussionen haben meine Freude an unserem Forschungsgebiet immer wieder gestärkt und die Weiterentwicklung der Arbeit entscheidend vorangetrieben. Außerdem danke ich ihm für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die Erstellung des Gutachtens.

Frau Univ.-Professorin Dr. Gabriele M. König danke ich aufrichtig für ihre verständnisvolle und unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens und für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Univ.-Professor Dr. Gerd Bendas und Herrn Univ.-Professor Dr. Norbert Koch danke ich für Ihre Bereitschaft, in der Promotionskommission mitzuwirken.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Martin Hellmich für seine freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse. Bei Dr. Gunter Rappl und Petra Hofmann bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung des Multiplex Assays sowie bei Judith Horváth für die Unterstützung bei der Klonierung des #1331 CAR.

## Zum guten Schluss ...

An dieser Stelle danke ich allen, auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe. Vielen Dank für das gute Arbeitsklima, eure Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Dr. Tobias Riët danke ich von Herzen für seine unermüdliche und hervorragende Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Seine Hilfe und Erfahrung haben maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Danke lieber T2! Auch bedanke ich mich bei ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein großer Dank gilt Nicole Hoffmann für ihre professionelle und ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung der Mausversuche. Jennifer Makalowski danke ich herzlich für ihren tollen persönlichen Beistand vor allem in der letzten Phase meiner Arbeit. Ein riesiges Dankeschön geht an Danuta Chrobok, die mir mit ihrer Warmherzigkeit in all den Jahren freundschaftlich zur Seite stand.

Unvergesslich ist für mich die gemeinsame Doktorandenzeit mit Dr. Valérie Liebrecht; ich danke ihr für ihre uneingeschränkte Hilfe, ihre liebevolle Unterstützung in jeder Lebenslage, den Spaß und unsere wunderbare Freundschaft.

Ein ganz persönlicher Dank geht an Angela Wülfing-Kanold, Jürgen Krause und Clemens Unger, ohne deren unschätzbaren Einsatz die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Fredi von ganzem Herzen, ohne den ich es nicht bis hierhin geschafft hätte.

Ganz großer Dank geht an meinen Bruder und seine Familie, die jederzeit vorbehaltlos für mich da sind. Seine brüderliche Freundschaft ist für uns einzigartig. Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die immer das Beste für meinen Bruder und mich geben und uns selbstlos mit vollem Einsatz unterstützen. Danke für alles!

Nicht zuletzt sei derer gedacht, denen es nicht vergönnt war, ihre Krankheit zu besiegen.

## Eigene Publikationen

Hombach AA, Holzinger A and Abken H. The weal and woe of costimulation in the adoptive therapy of cancer with chimeric antigen receptor (CAR)-redirected T cells. *Curr Mol Med* 13: 1079–1088 (2013).

Riët T, Holzinger A, Dörrie J, Schaft N, Schuler G and Abken H. Nonviral RNA transfection to transiently modify T cells with chimeric antigen receptors for adoptive therapy. *Methods Mol Biol* 969: 187–201 (2013).

Holzinger A, Riët T and Abken H. Complementary signaling by two CARs tunes the activation threshold for combinatorial antigen recognition. (Manuskript)

Riët T, Holzinger A, Weber U, Hombach AA and Abken H. Chimeric antigen receptor (CAR) redirected T cell therapy with a higher therapeutic index: molecular basis of combinatorial antigen recognition. (Manuskript)