

**Der chimäre Antigen Rezeptor (CAR)
mit Spezifität für das
Tumorstammzell-Antigen NY-Eso-1
hat eine höhere Aktivierungsschwelle für
T-Zellen als der T-Zell Rezeptor (TCR)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jennifer Makalowski

aus

Wuppertal

Bonn, 2017

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. Norbert Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2017
Erscheinungsjahr: 2017

Zusammenfassung

In der adoptiven Immuntherapie von Tumorerkrankungen wird T-Zellen eine definierte Spezifität durch die Expression eines Antigen-spezifischen rekombinanten T-Zell Rezeptors (TCR) oder eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR) verliehen. Die adoptive Zelltherapie mit CAR und TCR modifizierten T-Zellen erzielte Tumorremissionen, beispielsweise CAR T-Zellen bei der Therapie leukämischer Erkrankungen und TCR T-Zellen in der Behandlung solider Tumore und Myelomen. Die Bindedomäne der CARs zur Erkennung der Tumorzellen ist von einem Antikörper abgeleitet, der TCR erkennt MHC präsentiertes Antigen durch die variable TCR α - und β -Kette.

In dieser Arbeit wurde ein Vergleich der T-Zell Aktivierung durch CAR und TCR durchgeführt. Als Modell Antigen wurde NY-Eso-1 verwendet, da NY-Eso-1 von Tumorzellen vieler solider und hämatologischer Erkrankungen exprimiert wird. Um bei der unterschiedlichen Struktur des CAR und TCR eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden CARs verwendet, deren Antikörper-abgeleitete Bindedomäne wie der verwendete TCR das HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen erkennt. CAR und TCR erkennen spezifisch das Antigen, jedoch mit unterschiedlicher Affinität; die CARs binden mit einer etwa 30fach oder 350fach höheren Affinität als der TCR. Sowohl der CAR als auch der TCR induzieren eine Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung, erkenntlich an der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der zytolytischen Aktivität der modifizierten T-Zellen. Trotz höherer Affinität ist die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen höher als die der TCR T-Zellen. Die CD28 Kostimulation im CD28CD3 ζ CAR verändert nicht die Aktivierungsschwelle, auch eine Steigerung der Affinität der CAR Bindedomäne verändert nicht die Aktivierungsschwelle. Jedoch verstärken sowohl die CD28 Kostimulation als auch die höhere Affinität die Effektorfunktionen der T-Zelle. Eine Trennung des ζ Primärsignals und der CD28 Kostimulation auf zwei koexprimierte CAR Moleküle verringert die T-Zell Aktivierung im Vergleich zum CAR mit kombinierter CD28CD3 ζ Signaldomäne.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen gegen intrazelluläre Antigene sowohl durch einen TCR als auch einen CAR gerichtet werden können, jedoch sind CAR T-Zellen trotz höherer Affinität weniger sensitiv in der Erkennung geringer Antigenmengen als TCR modifizierte T-Zellen und bieten dadurch eine höhere Selektivität für Zielzellen mit hoher Antigendichte. Bei geringer Antigenexpression, wie sie auf NY-Eso-1 exprimierenden Tumorzellen vorkommen kann, ist jedoch eine TCR gerichtete T-Zell Therapie gegenüber CAR T-Zellen zu bevorzugen.

Abstract

The chimeric antigen receptor (CAR) with specificity for the tumor stem cell associated antigen NY-Eso-1 has a higher activation threshold than the NY-Eso-1 specific T cell receptor (TCR)

In adoptive immunotherapy T cells are engineered to express an antigen-specific receptor with defined specificity for a tumor-associated antigen (TAA). T cells can be modified with a recombinant T cell receptor (TCR) or a chimeric antigen receptor (CAR). Current studies with either CAR or TCR modified T cells showed lasting and complete tumor regression; CAR redirected T cells exhibited success in the therapy of leukemia, for example, and TCR redirected T cells showed efficacy in the therapy of solid tumors or myeloma. The CAR recognizes the respective antigen by an antibody derived binding domain while the TCR recognizes the antigen by the variable regions of the α and β chains. In contrast to the TCR, the CAR recognizes the antigen in a MHC independent manner and is restricted to the recognition of cell surface antigens. We here compared CAR and TCR driven T cell activation.

For a site-by-site comparison, we engineered a “TCR-like” CAR which recognizes the same MHC presented peptide as the recombinant TCR. As model antigen we used the tumor-associated antigen NY-Eso-1 which is presented by the HLA-A2 on solid and hematologic tumor cells. Both the anti-NY-Eso-1 TCR and anti-NY-Eso-1 CAR induced antigen-dependent T cell activation indicated by secretion of proinflammatory cytokines and cytotoxicity. The binding affinity of the two used CARs is 30-fold and 350-fold higher than the affinity of the TCR. Although the CAR has a higher binding affinity, the CAR modified T cells showed a higher activation threshold than the TCR redirected T cells. The integration of the costimulatory domain CD28 into the CAR and the increase of binding affinity had no impact on the activation threshold of CAR modified T cells; albeit, both CD28 costimulatory domain and improved affinity increased the magnitude in T cell effector functions. Splitting the primary ζ signal and the CD28 costimulatory domain onto two receptors lowered the T cell activation against target cells compared to the CD28CD3 ζ CAR with one polypeptide chain.

Our data show that both TCR and CAR redirect a T cell response towards intracellular antigens presented in the MHC context. Despite higher binding affinity, CAR T cells are less sensitive in recognizing the antigen than TCR modified T cells. Therefore CAR modified T cells are more selective in recognizing target cells with high antigen density levels while TCR redirected T cells are more effective in targeting tumor cells with low antigen amounts, like NY-Eso-1 positive tumors.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Adoptive Immuntherapie	1
1.2 Aufbau der Rezeptoren	3
1.3 T-Zell Aktivierung	7
1.4 NY-Eso-1 präsentiertes Antigen als Zielstruktur	9
1.5 Zielsetzung	10
2 Material	12
2.1 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer	12
2.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	12
2.3 Medien und Medienzusätze	13
2.3.1 Bakterienkultur	13
2.3.2 Zellkultur	13
2.4 Bakterienstämme	15
2.5 Primäre Zellen und Zelllinien	15
2.5.1 Primäre Zellen	15
2.5.2 Humane Zelllinien	15
2.5.3 Maus Zelllinien	16
2.6 Restriktions-Endonukleasen und Puffer	17
2.7 Oligonukleotide	17
2.8 Vektoren	19
2.8.1 Retrovirale CAR Expressionsvektoren	19
2.8.2 pJetX Klonierungsvektoren	22
2.8.3 Sonstige Expressionsvektoren	23
2.9 Antikörper und Proteine	24
2.9.1 Antikörper	24
2.9.2 Proteine und Fusionsproteine	27
3 Methoden	28
3.1 Bakterienkultur	28
3.1.1 E.coli <i>DH5α</i> Bakterien Kultivierung und Lagerung	28
3.1.2 Herstellung chemokompetenter E.coli <i>DH5α</i> Bakterien	28
3.1.3 Transformation kompetenter E.coli <i>DH5α</i>	29

3.2	Isolation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli DH5α</i>	29
3.2.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNS nach der Koch-(boiling)-Methode	29
3.2.2	Plasmidpräparation durch Bindung an eine AnionenAustauschersäule..	30
3.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.4	Restriktionsspaltung von DNS-Doppelsträngen	31
3.5	DNS-Fragment Isolierung aus Agarose.....	31
3.6	Ligation von DNS-Doppelsträngen	31
3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.8	Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	33
3.9	Zellkultur	33
3.9.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
3.9.2	Passagieren adhärenter Zellen	34
3.9.3	Nachweis und Eliminierung von Mykoplasmen	34
3.9.4	Zellzählung und Viabilitätsbestimmung	35
3.9.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	36
3.9.6	Gewinnung humaner T-Lymphozyten	37
3.9.7	Transfektion von 293T HEK Zellen	37
3.9.8	Retrovirale Transduktion von T-Zellen als Kokultivierung	38
3.9.9	Retrovirale Transduktion von T-Zellen mittels Virus-enthaltendem Überstand	39
3.10	Serumgewinnung aus Vollblut.....	39
3.11	Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analyse.....	40
3.12	„Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)	40
3.13	Produktion und Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	41
3.14	Kultivierung auf beschichteten Oberflächen	41
3.15	Kokultivierung der T-Zellen mit Multimer-Bead-Komplexen.....	42
3.16	Kokultivierung der T-Zellen mit Tumorzellen	42
3.17	Pulsen von Tumorzellen.....	43
3.18	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	43
3.19	Multiplex-Immunoassay	45
3.20	XTT-basierter Viabilitätstest	45
3.21	Tumorinduktion in der Maus.....	46
3.22	Substanzapplikation bei der Maus	47
3.23	Präparation muriner T-Zellen aus dem Blut für die durchflusszytometrische Analyse	48
4	Ergebnisse	49

4.1	Die rekombinanten Rezeptoren werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert.....	49
4.2	Die rekombinanten Rezeptoren binden an das HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid.....	51
4.3	Die rekombinanten Rezeptoren vermitteln eine Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zelle.....	53
4.4	Der CD3 ζ CAR und der TCR vermitteln eine spezifische NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Antigen-abhängige zytotoxische T-Zell Aktivierung.....	54
4.5	Die B7-CD28 Kostimulation erhöht die CD3 ζ und TCR vermittelte T-Zell Aktivierung.....	58
4.6	Die Tumorzelleliminierung ist effektiver durch T-Zellen mit rekombinanten TCR als durch CD3 ζ CAR T-Zellen.....	61
4.7	Die CD28 Kostimulation im CAR hat Einfluss auf die Stärke der T-Zell Aktivierung.....	63
4.8	Die Persistenz der CD28CD3 ζ CAR T-Zellen in vivo ist höher als die der TCR T-Zellen.....	65
4.9	Die T-Zellen mit rekombinanten Rezeptoren lassen sich spezifisch durch das NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid reaktivieren.....	67
4.10	CAR und TCR modifizierte T-Zellen unterscheiden sich in der Antigen-spezifischen Aktivierungsschwelle.....	68
4.11	Die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren ist unterschiedlich bei Zielzellen unterschiedlicher Antigendichte.....	72
4.12	Die Affinität des CAR hat keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle.....	74
4.13	Die Affinität des CAR hat keinen Einfluss auf die T-Zell aktivierende Effektorzellzahl bei gegebener Antigendichte.....	76
4.14	T-Zellen sezernieren mehrere proinflammatorische Zytokine nach CAR oder TCR Stimulation.....	78
4.15	TCR und CAR T-Zellen sezernieren dieselben Zytokine nach NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängiger Aktivierung.....	79
4.16	CD28CD3 ζ CAR T-Zellen proliferieren stärker als TCR und CD3 ζ CAR T-Zellen.....	80
4.17	Die rekombinanten Rezeptoren induzieren unterschiedliche T-Zell Phänotypen.....	81
4.18	Die CAR induzierte T-Zell Antwort nimmt mit der Zeit ab, wohingegen die TCR induzierte T-Zell Antwort zunimmt.....	85
4.19	Generierung neuer anti-NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten.....	86

4.19.1	Klonierung des Plasmids pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3 ζ -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666 CAR, CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR).....	88
4.19.2	Klonierung des Plasmids pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667 CAR, CD28 CAR)	90
4.19.3	Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -anti-NY-Eso-1 (3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1678 TCR, 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR).....	91
4.19.4	Klonierung des Plasmids pMP71-L κ -anti-CEA(BW431/26) scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1679 TCR, 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR).....	93
4.20	Die anti-NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert.....	95
4.21	Die Expressionsdichte des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR ist niedriger im Vergleich zum Einketten CAR CD3 ζ und CD28CD3 ζ	97
4.22	Der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 vermittelt eine NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ abhängige Aktivierung der T-Zelle.....	98
4.23	Die T-Zell Aktivierung des anti-NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Zweiketten CAR und des 2xscFvTCR nach Antigenerkennung ist geringer als die der anderen anti-NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren.....	100
5	Diskussion	102
6	Anhang	112
6.1	Expressionkassetten neu generierter CARs.....	112
6.1.1	pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3 ζ -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28(#1666 Zweiketten CAR).....	112
6.1.2	pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667).....	116
6.1.3	pMP71-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1678 scFvTCR).....	117
6.1.4	pMP71-L κ -anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1679 scFvTCR).....	121
6.2	Retrovirale Expressionsvektoren.....	125
6.2.1	pBullet.....	125
6.2.2	pMP71-wPRE	126
7	Literaturverzeichnis.....	127
	Danksagung	134
	Eigene Publikationen.....	136

Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen sowie SI-Basiseinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ACT	adoptive Zell Therapie
Amp^R	Ampicillin-Resistenzgen
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
BB	blocking buffer
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cα/β	konstante Region α/β des TCR
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
CEA	carcinoembryonales Antigen
CH2-CH3	konstante Domänen der schweren Kette (human IgG ₁)
CMV	Cytomegalie Virus
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
ED50	Effektivdosis 50 %
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas Ligand (CD95L)
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallisable
FcϵRI	Fc ϵ Rezeptor I
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fv	variables Fragment
g	Erdbeschleunigung
GvHD	graft versus host disease
h	Stunde

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
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
kb	Kilo-Basenpaar
K_{Ass}	Assoziationsraten Konstante
K_D	Dissoziationskonstante
K_{Diss}	Dissoziationsraten Konstante
LAT	linker for activation of T cells
LB	Luria broth
Lck	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
Lκ	κ Leader
LTR	long terminal repeat
MCS	multiple Klonierungsstelle
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
min	Minunte
M-MuLV	murines Moloney Leukämie Virus
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
POD	Peroxidase
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
scFv	single chain fragment of variable region
SEM	standard error of the mean
SMAC	supra-molecular activation complex
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
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
ü. N.	über Nacht
Vα/β	variable Region α/β des TCR
V_{H/L}	variable region of heavy/light chain
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
#	interne Plasmidnummer

1 Einleitung

Die malignen Neoplasien sind weltweit eine der häufigsten Todesursachen mit steigender Inzidenz (WHO, 2015). Zur Bekämpfung der neoplastischen Erkrankung werden konventionelle Therapieformen eingesetzt, zu denen die operative Tumorentfernung, die lokale Bestrahlung, sowie die systemischen Chemo- und Hormonbehandlungen zählen. Diese Standardtherapien sind nicht spezifisch gegen die Tumorzellen gerichtet, sondern zeigen auch Toxizität gegen gesundes Gewebe. Daher besteht die Notwendigkeit, weitere Strategien zu etablieren, die eine höhere Spezifität gegen Tumorzellen aufweisen. Eine dieser Behandlungsmethoden beruht auf dem Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die in Signalwege eingreifen (Gutierrez et al., 2009). Des Weiteren gibt es immunologische Ansätze, zu denen die monoklonalen Antikörper zählen, die beispielsweise als Kontrollpunkt-Inhibitoren Signalwege blockieren oder als bispezifische Antikörper T-Zellen aktivieren (Batlevi et al., 2016). Eine weitere Erfolg versprechende Therapieform ist die adoptive Immuntherapie, die Immunzellen derart modifiziert, dass sie spezifisch Tumorzellen erkennen und eliminieren.

1.1 Adoptive Immuntherapie

Die adoptive Immuntherapie setzt Immunzellen als Therapeutikum ein mit dem Ziel, eine spezifische zelluläre Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren. Werden T-Zellen eingesetzt, führt die Aktivierung nach Antigenerkennung zu einem breiten Spektrum an Effektorfunktionen, wie der T-Zell Proliferation, der Freisetzung zytotoxischer Granula, proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Haynes et al., 2002; Redmond et al., 2009). Dies führt zu einer Amplifikation der anti-Tumor Antwort. Die Antigen spezifische Zytolyse wird durch Perforin und Granzyme B vermittelt sowie durch den TRAIL/FasL Signalweg eingeleitet (Trapani und Smyth, 2002). Die Chemokine ermöglichen die lokale Infiltration weiterer Immunzellen sowohl des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems. Die sezernierten proinflammatorischen Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-2 erhöhen die Wirksamkeit der T-Zell Antwort im Tumorgewebe und unterstützen die Eliminierung des Tumorstromas (Hehlgans und Pfeffer, 2005; Textor et al., 2014). T-Zellen haben somit den Vorteil, dass sie das Tumorgewebe aktiv penetrieren und durch lokale Akkumulation die systemische Toxizität verringert wird.

Eine Möglichkeit der zellulären T-Zell Therapie bieten die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs). Hierbei werden die Immunzellen aus der Tumorerkrankung gewonnen, ex vivo expandiert und dem Patienten reinfundiert. Die therapeutische Effizienz der TILs bei metastasierendem Melanom, meist in Kombination mit einer Zytokintherapie, liegt bei bis zu 50 % Remissionen, wobei auch Hirnmetastasen erfolgreich eradiziert werden (Hong et al., 2010; Itzhaki et al., 2011; Radvanyi et al., 2012). Die Beschränkung der adoptiven TIL Immuntherapie ist dadurch bestimmt, dass nur eine geringe Anzahl von Tumorentitäten die Möglichkeit der Isolierung von TILs bietet. Des Weiteren befinden sich die T-Zellen häufig in einem anergischen Funktionsstatus, was die Expansion zu einer therapeutisch wirksamen Zellzahl erschwert.

Die Kenntnis, dass Tumorzellen Tumor-assoziierte-Antigene (TAAs) exprimieren und Immunzellen Spezifitäten gegen diese TAAs ausprägen, führte zum Konzept der Rezeptor-modifizierten T-Zell Therapie. Ziel hierbei ist es, autologe Lymphozyten aus dem peripheren Blut zu gewinnen und spezifisch gegen ein definiertes TAA mit rekombinanten Rezeptoren zu richten (Abbildung 1). Diese Antigen spezifischen T-Zellen werden unter Zytokinzugabe ex vivo expandiert und dem Patienten anschließend reinfundiert. In den Fällen, in denen keine autologe T-Zell Gewinnung möglich ist, werden allogene T-Zellen mit den Rezeptoren modifiziert und expandiert. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass HLA-alloreaktive Zellen im Empfänger eine „Graft versus Host Reaktion“ (GvHD) induzieren können.

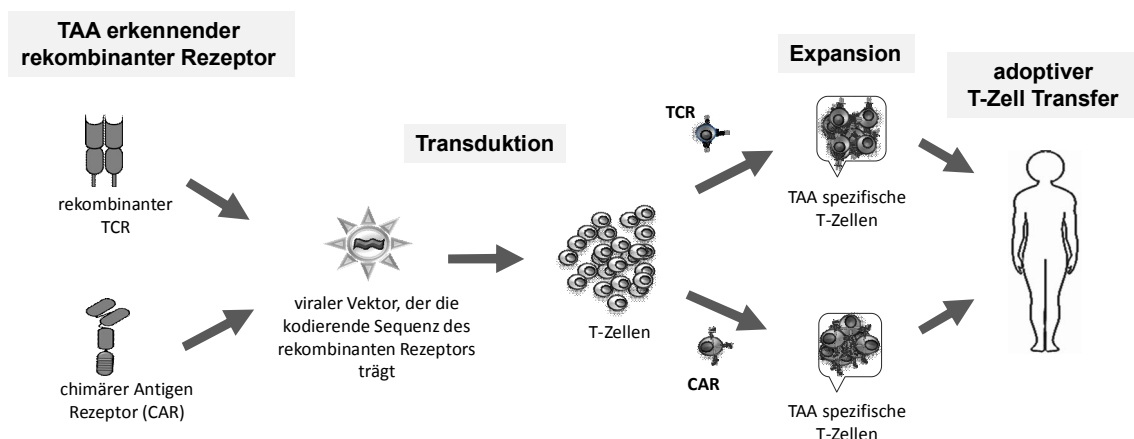


Abbildung 1 Die adoptive Immuntherapie mittels Rezeptor-modifizierter T-Zellen (modifiziert aus Makalowski und Abken, 2013). Die adoptive Zell Therapie (ACT) mit Rezeptor-modifizierten T-Zellen basiert auf dem Erkennen eines spezifischen Antigens. Die verwendeten Rezeptorformate sind entweder rekombinante T-Zell-Rezeptoren (TCRs) oder chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs). Die kodierenden Sequenzen für TCR oder CAR werden in virale Vektoren verpackt und T-Zellen transduziert. Die TCR-modifizierten T-Zellen oder CAR-modifizierten T-Zellen werden expandiert und dem Patienten reinfundiert.

Das Konzept der adoptiven Immuntherapie mit rekombinanten Rezeptor modifizierten T-Zellen wird mit zwei unterschiedlichen Rezeptorformaten umgesetzt. Ein Ansatz ist die Modifikation der T-Zellen mit rekombinanten T-Zell Rezeptoren (TCRs), während ein anderer Ansatz auf der Modifikation der T-Zellen mit chimären Antigen Rezeptoren (CARs) beruht. Die TCR basierte T-Zell Therapie zeigt Erfolge bei der Behandlung solider und hämatologischer Tumore, wie z. B. dem Melanom oder Myelom (Makalowski und Abken, 2015; Fesnak et al., 2016). Die Studie bei Multiplen Myelom mit TCR modifizierten T-Zellen verzeichnet eine über 2 Jahre andauernde Remission bei der Hälfte der behandelten Patienten und bei Melanom Patienten zeigten 33 % eine Überlebensrate von 5 Jahren (Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2015). Die CAR gerichtete Immuntherapie weist klinische Erfolge bei den B-Zell Lymphomen auf (Fesnak et al., 2016; Holzinger et al., 2016). Patienten mit akut lymphoblastischer Leukämie (ALL) zeigten nach Behandlung mit CAR T-Zellen in 90 % der Fälle eine Remission über 2 Jahre (Maude et al., 2014). Bei Behandlung der lymphatischen Leukämie (CLL) zeigten 57 % der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie, wobei die Hälfte eine komplette Remission aufwies (Singh et al., 2016).

1.2 Aufbau der Rezeptoren

Der T-Zell Rezeptor (TCR) ist ein Proteinkomplex auf der Oberfläche reifer T-Zellen, der kurze Peptidsequenzen im MHC Kontext erkennt. Diese Peptidsequenzen werden aus intrazellulär prozessierten Proteinen generiert. Die α und β Untereinheit des TCR Heterodimers besteht aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Kette (Abbildung 2). An die jeweilige konstante Domäne schließt sich die Transmembrandomäne des TCR an. Die variablen Domänen des TCR bestehen jeweils aus den drei Schleifen der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR1, CDR2, CDR3), mit denen die MHC präsentierten Peptide interagieren. Das $\alpha\beta$ Heterodimer des TCR besitzt keine intrazellulären Domänen und muss zur Signalinitiierung mit dem CD3 Komplex assoziieren. Der zytoplasmatische Teil der CD3 ϵ , CD3 γ und CD3 δ Ketten besitzt jeweils ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM), wohingegen die CD3 ζ Kette drei ITAMs aufweist (Kersh et al., 1998). Der CD3 Komplex besteht aus den Dimeren CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ sowie CD3 $\zeta\zeta$ und weist 10 ITAMs auf. Nach Aktivierung des TCR durch Bindung des Antigens wird eine Signalkaskade induziert, welche die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege einleitet (siehe 1.3). Das TCR Signal wird durch die simultane Bindung des CD8 Korezeptors an die invariante Kette des MHC I verstärkt (Artyomov et al., 2010). Für eine langanhaltende,

vollständige T-Zell Aktivierung sind zwei Signale nötig. Das erste Signal erfolgt durch die Bindung des TCR an das MHC-präsentierte Antigen. Das zweite kostimulatorische Signal wird durch die Bindung des CD28 Rezeptors an die B7 Moleküle CD80 oder CD86 eingeleitet. Dies verstärkt das Signal der T-Zell Aktivierung und führt zur Proliferation und Persistenz der T-Zelle (Mueller et al., 1989).

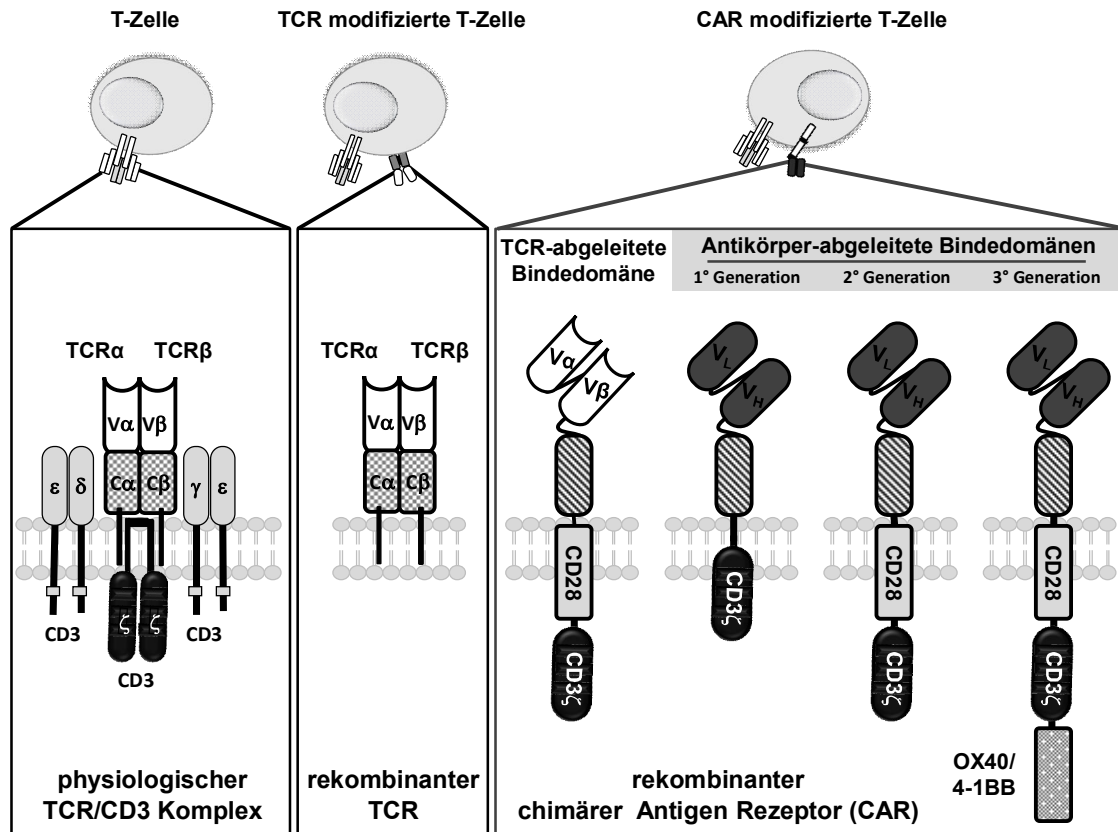


Abbildung 2 Die Rezeptor modifizierten T-Zellen (modifiziert aus Makalowski und Abken, 2015). Links ist der physiologische TCR/CD3 Multiprotein Komplex dargestellt, der aus den CD3 Komponenten CD3εγ, CD3εδ und CD3ζζ sowie der α- und β-Kette des TCR besteht. Das TCR αβ Heterodimer besteht jeweils aus einer variablen (Vα und Vβ) und einer konstanten (Cα und Cβ) Domäne. An die Cα und Cβ des TCR schließt sich die Transmembrandomäne an. Die variablen Domänen (VαVβ) sind für die Antigenerkennung verantwortlich. In der Mitte ist der rekombinante TCR schematisch dargestellt, der aus den variablen (VαVβ) und konstanten (CαCβ) Domänen der α- und β-Kette besteht und mit den endogenen CD3 Domänen der T-Zelle assoziiert. An die konstanten Domänen des rekombinanten TCR schließt sich die Transmembrandomäne an. Rechts ist der chimäre Antigen Rezeptor (CAR) dargestellt, der entweder mit einer TCR-abgeleiteten Bindestruktur (VαVβ) oder einer Antikörper-abgeleiteten Einzelketten (scFv) Bindedomäne (V_HV_L) konstruiert wird. Der CAR ist ein Polypeptid, das zumeist aus einer Antikörper-abgeleiteten Bindedomäne und Brückendomäne, einer kurzen Transmembrandomänen und einer intrazellulären CD3ζ (1° Generation), einer CD28-CD3ζ (2° Generation) oder einer CD28-CD3ζ-OX40/4-1BB (3° Generation) Signaldomäne besteht. Die Bindedomäne ermöglicht die Antigenerkennung, die Brückendomäne verleiht Flexibilität und Stabilität und die Signaldomänen induzieren die T-Zell Aktivierung.

Der rekombinante TCR besteht wie der physiologische TCR aus einem αβ Heterodimer. Der rekombinante TCR erkennt MHC präsentierte Peptide, wie es auch bei der physiologischen Antigenerkennung der Fall ist. Ebenso verläuft die T-Zell Aktivierung

durch den TCR-CD3 Komplex und wird durch Korezeptoren wie CD8 und CD28 verstärkt. Ein Nachteil dieser Strategie ist das „Mispairing“. Hierbei paart eine Untereinheit des transgenen TCR mit einer Untereinheit des endogenen TCR, wodurch die Rezeptor modifizierte T-Zelle eine neue Spezifität erhält, die Autoreaktivität induzieren kann (Schumacher, 2002). Für eine spezifische T-Zell Aktivierung durch rekombinante TCRs werden meistens Affinitäten von 10^{-4} bis 10^{-6} M verwendet (Tabelle 1). Ein Problem stellen hoch affine TCR Bindedomänen dar. Diese haben nicht die negative Selektion im Thymus durchlaufen, was das Risiko der „off-target“ Reaktivität erhöht und somit zur Autoreaktivität gegen Selbst-Antigene führen kann. Des Weiteren führt eine starke MHC Rückgrat Bindung zu einer Antigen unabhängigen T-Zell Aktivierung (Holler et al., 2002).

Im Vergleich zum TCR-Komplex stellt der chimäre Antigen-Rezeptor (CAR) ein Einzelkettenmolekül dar (Tabelle 1). Erste chimäre Immunrezeptoren wurden Mitte der 80er Jahre konstruiert, indem man die variablen Antikörper-abgeleiteten Domänen V_H oder V_L mit den Konstanten TCR Domänen $C\alpha$ oder $C\beta$ fusionierte (Kuwana et al., 1987; Gross et al., 1989). Eshhar et al. konstruierten 1993 erste Antikörper-abgeleitete Einzelkettenfragment (scFv) CARs. Der CAR ist ein artifizielles Konstrukt, das im extrazellulären Teil aus einer Binde- und Brückendomäne besteht sowie eine Transmembrandomäne besitzt, an die sich eine oder mehrere intrazelluläre TCR assoziierte Signaldomänen anschließen. Die extrazelluläre Bindedomäne des CAR besteht aus schwerer (V_H) und leichter Kette (V_L) der variablen Region eines monoklonalen Antikörpers, die zu einem Einzelkettenfragment (scFv) fusioniert wurden. Die Antikörper-abgeleitete Bindedomäne ermöglicht dem CAR eine MHC-unabhängige Erkennung von Oberflächenproteinen oder anderen Antigenstrukturen, wie z. B. Carboanhydrate oder Glykolipidproteine. Die MHC-unabhängige Antigenerkennung hat den Vorteil, dass die CARs nicht HLA Typ restringiert sind und somit bei Patienten jeden HLA Typs anwendbar sind. Ein weiteres CAR Rezeptorformat hat die variable α - und β -Kette des TCR ($V\alpha V\beta$) als Bindedomäne (Aggen et al., 2012; Stone et al., 2014). Dies ermöglicht die Antigenerkennung von MHC präsentierten Peptiden. Die Brückendomäne des CAR besteht typischerweise aus der CH2-CH3 Domäne des IgG oder aus einem extrazellulären Teil des CD4 oder CD8 Korezeptors und kann dem Rezeptor Stabilität und Flexibilität verleihen (Hombach et al., 2010). Einige Membran-distale Antigene erfordern für die optimale Bindung und Signalweiterleitung eine größere Brückendomäne als Membran-proximale Antigene (Guest et al., 2005; Hombach et al., 2007). Die Transmembranregion des CAR kann aus unterschiedlichen

Signalstrukturen, wie z. B. CD28, CD3, OX40 oder CD8, gewählt werden. Die CD28 Transmembrandomäne stabilisiert hierbei den CAR besser, was meist mit einer höheren CAR Expression einhergeht (Savoldo et al., 2011; Dotti et al., 2014). Die CD3 ζ Transmembrandomäne induziert hingegen ein robusteres Signal, da sie mit der endogenen CD3 ζ Kette heterodimerisiert und somit in den endogenen TCR/CD3 Komplex integriert (Bridgeman et al., 2010).

Die CARs der ersten Generation (1°) bestehen nur aus der Signaldomäne der CD3 ζ Kette des TCR/CD3 Signalkomplexes oder der Fc ϵ R1 γ Kette der Mastzellen. Die intrazelluläre CD3 ζ Kette enthält wie beim TCR drei ITAMs, wohingegen die Fc ϵ R1 γ Kette nur ein ITAM aufweist, was zu einer schwächeren T-Zell Aktivierung als bei CARs mit der CD3 ζ Kette führt. Diese 1° CARs zeigen in vivo eine schlechte Persistenz und niedrige therapeutische Effizienz (Kershaw et al., 2006; Till et al., 2008). CARs der zweiten Generation (2°) enthalten zusätzlich zu der CD3 ζ Kette oder Fc ϵ R1 γ Kette eine kostimulatorische Domäne, wie z. B. CD28, 4-1BB oder OX-40. Durch die Integration der kostimulatorischen Domäne erhält die T-Zelle das zweite Signal, das für eine vollständige und langanhaltende Aktivierung nötig ist. Diese 2° Generationen CARs weisen gegenüber den 1° Generationen CARs einen höheren anti-Tumor Effekt auf und zeigen eine verbesserte Persistenz sowie höhere Amplifikation (Savoldo et al., 2011; Song et al., 2011; Brentjens et al., 2007). Durch die kostimulatorische CD28 Domäne des CAR wird z. B. die Apoptose herabgesetzt, da der anti-apoptotische Bcl-X $_L$ Faktor hochreguliert wird (Kowolik et al., 2006; Emtage et al., 2008). Die CARs der dritten Generation (3°) tragen zwei kostimulatorische Domänen in Kombination mit der CD3 ζ Kette. Dadurch wird die T-Zell Funktion und Persistenz weiterhin gesteigert.

Es gibt weitere CAR Rezeptorformate, bei denen bispezifische Bindedomänen verwendet werden (Zah et al., 2016). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der kombinatorischen Antigenerkennung, um die Selektivität der CAR T-Zellen zu erhöhen. Hierbei werden zwei CARs unterschiedlicher Spezifität in derselben T-Zelle exprimiert, wobei der eine Rezeptor das primäre Signal und der andere CAR das kostimulatorische Signal enthält (Kloss et al., 2013).

Trotz des CAR-Prototyps erfordert der modulare Aufbau eine Optimierung für jeden CAR, da jedes Antigen unterschiedliche Anforderungen an die Affinität, Brückendomäne und Signaldomänen des CAR zur T-Zell Aktivierung stellt. Der CAR ermöglicht zwischen hoher und niedriger Antigendichte zu differenzieren und erst ab hoher Antigendichte eine T-Zell Aktivierung zu induzieren. Dadurch wird normales

Gewebe mit niedriger Antigendichte nicht attackiert. Durch die Antikörper-abgeleitete Bindedomäne haben die CARs eine höhere Affinität als TCRs. Eine zu hohe Affinität der CAR Bindedomäne kann jedoch mit einem Verlust der Selektivität einhergehen. Dies kann außerdem zur Autoreaktivität führen, da Normalzellen mit niedriger Antigen Expression zu einer T-Zell Aktivierung führen (Chmielewski et al., 2004). Ein Vorteil der CARs ist, dass sie in CD4 und CD8 T-Zellen funktional sind. Der CAR liegt als Homodimer vor oder kann als Heterodimer mit der endogenen CD3 ζ Kette assoziieren und in den TCR/CD3 Komplex integrieren (Bridgeman et al., 2010). Ein Nachteil der MHC-unabhängigen Antigenerkennung ist zum einen, dass intrazelluläre TAAs nicht erkannt werden, zum anderen, dass die Interaktion mit dem CD8 Rezeptor fehlt, der die Lck Tyrosinkinase in räumliche Nähe zum CD3 Komplex bringt und somit die T-Zell Aktivierung verstärkt.

Tabelle 1 Gegenüberstellung der TCR und CAR Eigenschaften (modifiziert aus Harris und Kranz, 2016)

Eigenschaft	TCR	CAR
Affinität	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹ M
Antigenerkennung	MHC präsentierte intrazelluläre Antigene	MHC unabhängig, Oberflächenstrukturen
Ko-Rezeptor; Ko-Stimulation	CD4/CD8; CD28	nicht bekannt
Anzahl der Untereinheiten des Rezeptor Komplexes	TCR/CD3 (8 Untereinheiten) mit CD8 (10 Untereinheiten)	Dimer (2 Untereinheiten)
Anzahl der ITAMs	10	2 (Fc ϵ R1 γ Kette) 6 (CD3 ζ Kette)
Kostimulatorische Domänen des Rezeptors	keine	1-3
Anzahl Rezeptormoleküle pro T-Zelle	≤ 50.000	> 50.000
Minimale Anzahl gebundener Antigene	1 ≥ 30 (ohne Ko-Rezeptor)*	~ 200 (Lyse)** ~ 2000 (Zytokin Produktion)**

*Irvine et al., 2002; **Watanabe et al., 2015

1.3 T-Zell Aktivierung

Die Aktivierung von T-Zellen nach Antigenerkennung beruht auf einem komplexen Signalnetzwerk. In diesem Zusammenhang ist die Ausbildung einer „Synapse“ erforderlich. Dadurch werden die Moleküle der T-Zelle, die für die Aktivierung notwendig sind, organisiert. Diese immunologische Synapse weist nach TCR Antigen/MHC Interaktion eine typische „bull’s eye“ Formierung in drei charakteristische supra-molekulare Aktivierungs-Komplexe (SMAC) auf. Den inneren Kreis bildet der

zentrale supra-molekulare Aktivierungs-Komplex (cSMAC), in dem die TCR und CD28 Moleküle konzentriert sind. Die TCRs liegen in Microclustern vor und sind mit intrazellulären Signalmolekülen, wie Zap70, Lck, LAT und Protein Kinase C θ (PKC θ) sowie den Korezeptoren CD8 und CD28 assoziiert. Nach Antigen/MHC Interaktion bewegen sich die Microcluster in den cSMAC (Campi et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). Der periphere SMAC (pSMAC) wird vor allem durch Integrine gebildet. Der pSMAC verhindert die Diffusion von Perforin und Granzym aus dem cSMAC Bereich der immunologischen Synapse. Somit werden Zellen, die nicht das Zielantigen präsentieren, vor dem Angriff durch zytotoxische Granular geschützt (Jenkins und Griffiths, 2010). In dem äußeren Ring, dem distalen SMAC (dSMAC), sind Moleküle mit großen Ektodomänen konzentriert, wie die Tyrosinphosphatase CD45. Bei der Annäherung zwischen TCR und Zielzelle werden die dephosphorylierenden Phosphatasen aus der zentralen immunologischen Synapse verdrängt (Irls et al., 2003; Cordoba et al., 2013).

Zur vollständigen T-Zell Aktivierung sind 2 Signale notwendig, wobei das erste Signal durch den TCR/CD3 Komplex vermittelt wird und das zweite durch Stimulation des kostimulatorischen Rezeptors. Die TCR Antigen Interaktion induziert eine Konformationsänderung in den CD3 Untereinheiten, was die ITAMs für die Phosphorylierung zugänglich macht (Gil et al., 2002; Beddoe et al., 2009). Die Phosphorylierung der CD3 ITAMs erfolgt durch Lck oder Fyn Tyrosinkinase und durch die CD8 Korezeptor assoziierte Lck Kinase (Ehrlich et al., 2002; Casas et al., 2014). Anschließend bindet Zap70 an die phosphorylierten Tyrosinreste. Die folgende Signalkaskade resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und AP-1, die die Effektorfunktionen wie Proliferation und Differenzierung der T-Zelle induzieren. Das zweite Signal wird durch die CD28-B7 Interaktion bestimmt, wobei die intrazelluläre Domäne des CD28 Rezeptors die Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K), Protein Kinase C θ und RAS rekrutiert, was die T-Zell Aktivierung unterhält (Boomer und Green, 2010; Janardhan et al., 2011).

Bei Antigenbindung kommt es zur Aggregation von CARs und vermutlich werden freie zytosolische oder Plasmamembran gekoppelte Lck Tyrosinkinasen rekrutiert, die die ITAMs der Signaldomänen phosphorylieren (Ehrlich et al., 2002). Diese Phosphorylierung ermöglicht die Bindung von Zap70, das katalytisch aktiv wird und mit der Aktivierung der TCR Signalkaskade einhergeht. Durch Ausbildung einer immunologischen Synapse des CAR wird die Tyrosinphosphatase CD45 durch ihre große Ektodomäne aus der Synapse ausgeschlossen. Der Mechanismus der Signalweiter-

leitung der CAR T-Zellen nach Antigenerkennung ist bisher wenig untersucht. Es ist unklar, ob oder in welcher Form der CAR in den physiologischen TCR Komplex integriert. Es zeigte sich, dass bei der Interaktion des CAR mit Antigen die räumliche Anordnung entscheidend für eine effiziente T-Zell Aktivierung ist, denn ein Membran-proximales Epitop induzierte eine bessere T-Zell Aktivierung als das gleiche Epitop in Membran-distaler Anordnung (Hombach et al., 2007).

1.4 NY-Eso-1 präsentiertes Antigen als Zielstruktur

Normalzellen und Tumorzellen unterscheiden sich in der Expression ihrer Antigene. Tumorzellen exprimieren das Antigen meist in höherer Dichte. Das Expressionsmuster einiger Antigene auf malignen Zellen kommt in dieser Form bei normalen Zellen nicht oder nur kurzfristig in der Embryonalentwicklung vor. Es gibt beispielsweise Zelltyp-spezifische Antigene, welche in B-Zell Tumoren vorkommen, wie die Antigene CD19 und CD20. Diese Moleküle werden ebenfalls auf normalen B-Zellen exprimiert. Eine weitere Klasse der TAAs bilden die "Cancer Testis" (CT) Antigene, zu denen unser Modell-Antigen NY-Eso-1 (New York oesophageal squamous cell carcinoma 1) zählt (Old und Chen, 1998). Das Zielantigen NY-Eso-1 ist ein 180 Aminosäuren großes und ca. 18 kDa schweres Antigen, das im gesunden Gewebe ausschließlich im Zytoplasma von MHC-defizienten testikulären Zellen oder Ovarialzellen exprimiert wird (Simpson et al., 2005, Gnjatic et al., 2006). Viele Tumore zeigen eine NY-Eso-1 Expression, wie beispielsweise Melanome, Multiple Myelome, Mamma-, Blasen-, Prostata-, Lungen- und Hepatozelluläre Karzinome (Chen et al., 1997). Das NY-Eso-1 wird nach proteasomaler Prozessierung im HLA Komplex als Peptidsequenz auf Tumorzellen verschiedener Entitäten präsentiert. Die NY-Eso-1/HLA Präsentation kann, in Abhängigkeit der Prozessierung und MHC Expression, auf den Tumorentitäten homogen oder extrem heterogen exprimiert werden (Jungbluth et al., 2001). NY-Eso-1 ist vor allem bei Rezidiven exprimiert und korreliert mit schlechter Prognose (van Rhee et al., 2005). Das NY-Eso-1 besitzt einen immunogenen Charakter, da eine zelluläre Immunantwort gegen HLA präsentiertes NY-Eso-1 nachgewiesen wurde (Jäger et al., 1998). Somit stellt das NY-Eso-1 Antigen für die spezifische zelluläre Immuntherapie eine interessante Zielstruktur dar und wurde in ersten klinischen Studien erfolgreich als Zielstruktur verwendet (Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2015).

1.5 Zielsetzung

Bei der adoptiven Immuntherapie gilt die T-Zell Therapie mit rekombinanten Rezeptoren als Erfolg bringende Strategie zur selektiven Erkennung Tumor-assoziiertes Antigene (TAAs), die in ersten klinischen Studien vollständige Tumorremissionen erzielt hat (Maude et al., 2014; Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2015; Singh et al., 2016). Bei der Immunrezeptor basierten T-Zell Therapie werden TCR oder CAR modifizierte T-Zellen verwendet, um die T-Zell Aktivierung nach Antigenerkennung zu induzieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede der CAR- im Vergleich zu der TCR-vermittelten T-Zell Aktivierung auf Basis der gleichen Antigenerkennung im gleichen molekularen Kontext zu definieren. Besonderer Schwerpunkt war dabei zu untersuchen, welchen Einfluss das kostimulatorische CD28 Signal und die Affinität auf die MHC-abhängige CAR vermittelte T-Zell Aktivierung haben.

In dem von uns verwendeten Modell wurde als Zielantigen NY-Eso-1 gewählt. Dieses Antigen wird bei zahlreichen soliden und hämatologischen Tumoren exprimiert (Chen et al., 1997). Zur Erkennung des HLA-A2 präsentierten Zielantigens NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ wurden der TCR 1G4 und der CAR mit der Antikörper-abgeleiteten Bindedomäne 3M4E5 oder FabT1 verwendet.

Die Organisation des TCR unterscheidet sich von der des CAR, da die TCR $\alpha\beta$ Ketten durch die Assoziation mit den getrennt liegenden CD3 Signalmolekülen und dem Korezeptor CD8 eine Integration der Aktivierungssignale erfahren. Der CAR induziert durch die in Reihe geschalteten Signalketten eine T-Zell Aktivierung.

Es ist von besonderem Interesse, die T-Zell Aktivierung durch CAR und TCR Rezeptorformate zu vergleichen. Wir haben den 1G4 TCR verwendet, der im Vergleich zu den hoch affinen anti-NY-Eso-1 TCRs besser für Peptid beladene MHC Moleküle diskriminiert und weniger das MHC Rückgrat bindet. Durch die Antikörper-abgeleitete Bindedomäne haben die CARs eine höhere Affinität als der 1G4 TCR. Die MHC-abhängigen rekombinanten Rezeptoren TCR und CAR sollen in T-Zellen exprimiert und hinsichtlich ihrer Expression und Bindungseigenschaften untersucht werden, um uns einen Aufschluss über die funktionale Avidität der Rezeptorformate zu vermitteln. Es wurde verglichen, welche Antigen-abhängigen Aktivierungsschwellen CAR modifizierte T-Zellen im Vergleich zu TCR modifizierten T-Zellen aufweisen und welchen Einfluss die CD28 Kostimulation und die Bindeaffinität des CAR auf die T-Zell Effektorfunktionen haben.

Wir versuchen, durch Kompartimentierung der Signale CD3 ζ und der kostimulatorischen CD28 Domäne auf zwei CAR Moleküle mit gleicher Antigenerkennung dem physiologischen Aufbau des TCR näher zu kommen.

Dieser Vergleich des TCR mit dem CAR soll ermöglichen, eine optimierte Rezeptorstrategie zu finden, um eine effiziente und spezifische zelluläre Aktivierung gegen HLA-präsentierte Antigene durch genetisch modifizierte T-Zellen zu erreichen. Dieses wird die therapeutischen Möglichkeiten der adoptiven Immuntherapie erweitern.

2 Material

2.1 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer

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

BB („blocking buffer“)

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

BB/T

BB, 0,05 % (v/v) „Tween 20“

1x PBS

8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄; eingestellt mit 37 %-igen HCl-Säure auf pH 7,4

10x PBS

1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 1 M Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, eingestellt mit 37 %-igen 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 Gebrauch autoklaviert. Da das Antibiotikum Ampicillin thermolabile ist, wurde es sterilfiltriert und erst dem autoklavierten Medium zugesetzt, sobald es 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

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

Blasticidin S

Stammlösung 10mg/ml (Thermo Fisher Scientific, Dreieich), 10 µg/ml im Kulturmedium zur Selektion der SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen eingesetzt.

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

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 3.9.6) aus „buffy coats“ (Leukozytenkonzentraten) isoliert. Die „buffy coats“ stammten 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 #443	Derivat von HEK 293T, sezerniert das Fusionsprotein #443 anti-CEA-hFc	(Heuser, 1998)
HEK 293T #1283	Derivat von HEK 293T, sezerniert das Fusionsprotein #1283 anti-NY-Eso-1-hFc	(Makalowski, 2011)

HEK 293T #1369	Derivat von HEK 293T, sezerniert das Fusionsprotein #1369 anti-CD20-hFc	(Martyniszyn, 2012)
T2	Humanes Derivat von CEM Lymphom Zellen, TAP-defizient, MHC I Expression des Typs HLA-A2	„CRL-1992“, ATCC
T21B	Derivat der T2 Zellen, präsentieren das NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid im HLA-A2 (MHC I)	
T21C	Derivat von T2, präsentieren das NY-Eso-1 ₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid im HLA-A2 (MHC I)	
SK-MEL-37	kutanes Melanom, niedrige Expression des NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid im HLA-A2	“MS-KCC”
SK-MEL-37 NY-Eso-1	SK-MEL-37 Transfektante, exprimiert das Minigen NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎	IMMUNOCORE (Biocair)

ATCC, Manassas, VA, USA; Biocair, Oxon, UK; “MS-KCC” Memorial Sloan-Kettering Cancer Center NY, US

2.5.3 Maus Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz/Hersteller
OKT3	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert OKT3, monoklonaler mIgG _{2a} Antikörper, Spezifität für humanes CD3	(Kung et al., 1979); „CRL-8001“, ATCC
15E8	Hybridoma-Zelllinie, sezerniert 15E8, monoklonaler mIgG ₁ Antikörper, Spezifität für humanes CD28	(Van Lier et al., 1988)

9G10 Hybridoma-Zelllinie, sezerniert 9G10, (Pohl et al., 1992)
monoklonaler mIgG₁ Antikörper,
Spezifität für die Bindedomäne des
CD30

ATCC, Manassas, VA, USA

2.6 Restriktions-Endonukleasen und Puffer

Nachfolgende Restriktionsenzyme wurden zu analytischen und präparativen Zwecken eingesetzt:

EcoRI, EcoRV, NcoI, NotI, XhoI (alle von Roche Diagnostics, Mannheim)

AarI, BsrGI (Bsp14071), KsaI (SspDI) (alle von Thermo Fisher Scientific, Dreieich)

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

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

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

Die folgenden Puffer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) wurden für die Restriktionsanalysen verwendet:

Puffer BamHI (x10): 100 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 50 mM MgCl₂, 1 M KCl, 0,2 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA.

Puffer Tango (10x): 330 mM Tris-Acetat (pH 7.9 at 37°C), 100 mM Mg(CH₃COO)₂, 660 mM CH₃CO₂K, 1 mg/ml BSA.

2.7 Oligonukleotide

(Eurofins Genomics/MWG-Biotech AG, Ebersberg)

Sequenzierungsprimer

Nr.*	Primer	Primersequenz (5'-3')
78	IgGSE5	TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
135	pBullet5' seqneu	GGACCTTACACAGTCCTGCTGACC
136	pBullet3' seqneu	CGTACTATAGGCTTCAGCTGGTGATATTG
282	Seq-pMP71-cloningsit e l sense	GTGTTGTCTCCTGTCTGACTGTGTTTCT
289	S-CD28-DPI3K	AGGCTCCTGCACAGTGACTTCATGAACATGACTCCCC GCCGCCCC
663	scFv3M4E5 (NY-Eso-1) AS	TCTGCACTCTGGCCTCGCTGAACTCGCCCTCCT
664	scFv3M4E5 (NY-Eso-1) S	AGGAGGGCGAGTTCAGCGAGGCCAGAGTGCAGA
670	S-1G4beta S57	AATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCTGCACAGAC
671	AS-1G4beta S57	CTGCTCCTTGAGGGGCTGCGGGTCTGTGCAGACCCC
707	Zeta-P2A AS	GGGGGTTTTCTTCCACGTCTCCTGCTTGCTTTAACAGA GAGAAGTTCGTGGCGCCGCTTCCGCGAGGGGGCAGG GCCTGCATGTG
809	P2A-as-NcoI	ATATCCATGGGACCGGGTTTTCTTCCACGTCTCCTGC TTGCTT
901	5' Myco Test	CACCATCTGTCACTCTGTTAACC
902	3' Myco Test	GGAGCAAACAGGATTAGATACCC
954	#1444 1320 for	AGCTTCCTGCTGATCAGTGCCTCA
958	BW 431-se	TTGTGAGACCTAGCCAGAC
1086	#1486 for CD20	AGTACGTCTAGAATGGCCCAGGTCAAACACTACAGGAGT
1112	#1502-rev	CTCCTCCCGCGGCTTTGTCTTG

1127	EGFR-Seq5-AS	AGGCACTGATTAGCAGGAAG
1146	#1500 seq for	AGCTTGGATACACGCCGCCAC
1149	#1505 seq rev	GGGAATAAATGGCGGTAAGATGCTCG
1152	#1520 seq for	TCGGCCAAGGGACCAAGG
1166	MutDeltaLck for	AAGCATTACCAGGCCTATGCCGCCGCACGCGACTTCG CAGCCTAT
1167	MutDeltaLck rev	ATAGGCTGCGAAGTCGCGTGCGGCGGCATAGGCCTG GTAATGCTT
1238	pJet forward	AACTTGGAGCAGGTTCCATTC
1239	pJet reverse	CCTGATGAGGTGGTTAGCATAG
1270	rt PCR for1	AAACTCACACATGCC

* interne Labornummer

2.8 Vektoren

2.8.1 Retrovirale CAR Expressionsvektoren

pBullet-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc-CD3 ζ (#1044, CD3 ζ CAR)

(Stewart-Jones et al., 2009)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über eine Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den chimären Antigen Rezeptor (CAR), mit der 3M4E5 Einzelkettenbindedomäne (scFv) gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2, der humanen IgG₁-Fc (CH2-CH3) Brückendomäne und der N-terminalen humanen CD3 ζ Transmembran- und Signaldomäne. Die Expressionskassette wurde in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) integriert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

pBullet-L_K- anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv -hFc-CD28-CD3 ζ (#1046, CD28CD3 ζ CAR)

(Stewart-Jones et al., 2009)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über eine Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS

für den chimären Antigen Rezeptor (CAR), mit der 3M4E5 Einzelkettenbindedomäne (scFv) gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2, der humanen IgG₁-Fc (CH2-CH3) Brückendomäne, der humanen CD28 Transmembran- und Signaldomäne, sowie der N-terminalen humanen CD3 ζ Signaldomäne. Die Expressionskassette wurde in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) integriert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

pMP71-anti-NY-ESO1-1G4-TCR (#1178)

(Engels et al., 2003)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pMP71 enthält die bicistronische Expressionskassette der α - und β -Kette des NY-Eso-1/HLA-A2 spezifischen 1G4 TCR. Zur äquimolaren Translation sind die α - und β -Kette durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) verbunden. Die Expressionskassetten der einzelnen Ketten ($\alpha\&\beta$) bestehen jeweils aus einer variablen (V α oder V β) und einer konstanten (C α oder C β) Domäne. An die bicistronische Expressionskassette schließt sich das posttranskriptionale regulatorische Element (PRE) des Murmeltier Hepatitis Virus an.

pBullet-L_k-anti-NY-Eso-1(FabT1)scFv-hFc-CD3 ζ (#1189, aff. CD3 ζ CAR)

(Stewart-Jones et al., 2009)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über eine Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den chimären Antigen Rezeptor (CAR) mit der hoch affinen FabT1 Einzelkettenbindedomäne (scFv) gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2, der humanen IgG₁-Fc (CH2-CH3) Brückendomäne und der N-terminalen humanen CD3 ζ Transmembran- und Signaldomäne. Die Expressionskassette wurde in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) integriert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

pBullet-L_k- anti-NY-Eso-1(FabT1)scFv-hFc-CD28-CD3 ζ (#1190, aff. CD28CD3 ζ CAR)

(Stewart-Jones et al., 2009)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über eine Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den chimären Antigen Rezeptor (CAR) mit der hoch affinen FabT1 Einzelkettenbindedomäne (scFv) gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2, der humanen IgG₁-Fc (CH2-CH3) Brückendomäne, der humanen CD28 Transmembran- und Signaldomäne, sowie der N-terminalen humanen CD3 ζ Signaldomäne. Die Expressionskassette wurde

in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) integriert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

pBullet-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc-CD3 ζ -P2A-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666, CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR)

(in dieser Arbeit generiert)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über die bicistronische Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die bicistronische Expressionskassette verknüpft mittels P2A Peptid den CAR L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc-CD3 ζ (#1044 CAR) und den CAR L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667 CAR). Der MycTag zwischen Binde- und Brückendomäne dient zur Detektion des CAR.

pBullet-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667, CD28 CAR)

(in dieser Arbeit generiert)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pBullet verfügt über eine Expressionskassette und das Resistenzgen Amp_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den chimären Antigen Rezeptor (CAR) mit der 3M4E5 Einzelkettenbindedomäne (scFv) gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2, der humanen CD8 Brücken- und Transmembrandomäne, sowie der humanen CD28 Signaldomäne. Der MycTag zwischen Binde- und Brückendomäne dient zur Detektion des CAR.

pMP71-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag- C α 1G4TCR (#1678, 2x anti-NY-Eso-1scFv TCR)

(in dieser Arbeit generiert)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pMP71 enthält eine bicistronische Expressionskassette der mittels P2A Peptid die NY-Eso-1/HLA-A2 spezifischen scFvTCR L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-1G4TCRC α Kette und die NY-Eso-1/HLA-A2 spezifischen scFvTCR L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-1G4TCRC β Kette verbindet. Der MycTag oder FlagTag zwischen scFv und konstanter Domäne dient zur Detektion der jeweiligen Rezeptorkette. An die bicistronische Expressionskassette schließt sich das posttranskriptionale regulatorische Element (PRE) des Murmeltier Hepatitis Virus an.

pMP71-L_K-anti-CEAscFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1679, 1x anti-NY-Eso-1scFv TCR)

(in dieser Arbeit generiert)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pMP71 enthält eine bicistronische Expressionskassette der mittels P2A Peptid die NY-Eso-1/HLA-A2 spezifischen scFvTCR L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-1G4TCRC α Kette und die CEA spezifischen scFvTCR L_K-anti-CEAscFv-MycTag-1G4TCRC β Kette verbindet. Der MycTag oder FlagTag zwischen scFv und konstanter Domäne dient zur Detektion der jeweiligen Rezeptorkette. An die bicistronische Expressionskassette schließt sich das posttranskriptionale regulatorische Element (PRE) des Murmeltier Hepatitis Virus an.

2.8.2 pJetX Klonierungsvektoren

pJetX (#1610)

Ausgangsplasmid des pJetX Klonierungsvektors

pJetX- anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc (#1657)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pBullet-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc-CD3 ζ -P2A-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666), welches die DNS anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc enthält. Der humanen IgG₁-Fc (CH2CH3) ist nur eine Teilsequenz des hFc.

pJetX- CD3 ζ -P2A-NY-Eso-1scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1658)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pBullet-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc-CD3 ζ -P2A-L_K-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666), welches die DNS CD3 ζ -P2A-NY-Eso-1scFv-MycTag-CD8-CD28 enthält. Vor der CD3 ζ Sequenz ist die Rest hFc (CH2CH3) Teilsequenz des hFc die an die Sequenz anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-hFc (#1657) anschließt.

pJetX- L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4 TCR (#1662)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-1G4TCRC β -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-1G4TCRC α (#1678), welches die DNS für die scFvTCR Kette L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR enthält.

pJetX- P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4 TCR (#1663)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-1G4TCR C β -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-1G4TCRC α (#1678), welches die DNS für die scFvTCR Kette L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR enthält. Es verknüpft mit der DNS für das P2A Peptid die scFvTCR C β Kette von L κ -anti-CEAscFv-MycTag-C β 1G4TCR (#1664) oder L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4 TCR (#1662).

pJetX- L κ -anti-CEAscFv- MycTag-C β 1G4 TCR (#1664)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-L κ -anti-CEAscFv-MycTag-1G4TCRC β -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag1G4TCRC α (#1679), welches die DNS für die scFvTCR Kette L κ -anti-CEAscFv-MycTag-C β 1G4TCR enthält.

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 und pol (Reverse Transkriptase Polymerase)

pBullet (#422)

Ausgangsplasmid zur Isolation des pBullet Vektors

pRSV-anti-CEA-hFc (#443)

(Eshhar et al., 1993)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pRSV verfügt über eine Expressionskassette und die Resistenzgene Amp_R und NEO_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den humanen Antikörper, mit der Einzelkettenbindedomäne gegen das humane CEA und der humanen IgG₁-Fc (CH₂-CH₃)Domäne und steht unter der Kontrolle der RSV LTR.

pRSV-Lk-FabT1scFv-hFc (#1283, anti-NY-Eso-1-hFc)

(Stewart-Jones et al., 2009)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pRSV verfügt über eine Expressionskassette und die Resistenzgene Amp_R und NEO_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den humanen Antikörper, mit der hoch affinen Einzelkettenbindedomäne gegen das humane NY-Eso-1/HLA-A2 und der humanen IgG₁-Fc (CH₂-CH₃) Domäne und steht unter der Kontrolle der RSV LTR.

pRSV-Lk-anti-CD20scFv-hFc (#1369)

Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pRSV verfügt über eine Expressionskassette und die Resistenzgene Amp_R und NEO_R. Die Expressionskassette besteht aus der DNS für den humanen Antikörper, mit der Einzelkettenbindedomäne gegen das humane CD20 und der humanen IgG₁-Fc (CH₂-CH₃) Domäne und steht unter der Kontrolle der RSV LTR.

2.9 Antikörper und Proteine

2.9.1 Antikörper

Antikörper-spezifität	Konjugat	Spezies (Isotyp)	Klon	Hersteller
human IgG	-	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
HRS3	-	Maus (IgG ₁)	9G10	Hybridoma-Zelllinie
human CD28	-	Maus (IgG ₁)	15E8	Hybridoma-Zelllinie
human CD3	-	Maus (IgG _{2a})	OKT3	Hybridoma-Zelllinie
human IFN- γ	-	Maus (IgG ₁ , κ)	NIB42	BD Biosciences
human IL-2	-	Maus (IgG ₁ , κ)	5344.111	BD Biosciences
	FITC	Maus (IgG₁)	IS5-21F5	Miltenyi Biotec
	APC	Maus (IgG₁)	PPV-06	Immuno Tools
	FITC	Maus (IgG_{2a})	S43.10	Miltenyi Biotec
	PerCP	Maus (IgG_{2a})	S43.10	Miltenyi Biotec
	APC	Maus (IgG_{2a})	S43.10	Miltenyi Biotec
	PE	Maus (IgG_{2b})	IS6-11E5.11	Miltenyi Biotec
	PE	Ziege F(ab')₂	polyklonal	Southern Biotech

c-Myc	FITC	Maus (IgG ₁)	SH1-26E7.1. 3	Miltenyi Biotec
Flag Tag (DYKDDDDK)	PE			Miltenyi Biotec
human CD3	APC	Maus (IgG _{2a})	BW264/56	Miltenyi Biotec
human CD3	PerCP	Maus (IgG _{2a})	BW264/56	Miltenyi Biotec
human CD4	FITC	Maus (IgG ₁ , κ)	MT310	DAKO
human CD45 RO	FITC	Maus (IgG _{2a})	UCHL1	Immuno Tools
human CD62L	APC	Maus (IgG ₁)	LT-TD180	Immuno Tools
human CD8	APC	Maus (IgG _{2a})	BW135/80	Miltenyi Biotec
human CD80	FITC	Maus (IgG ₁)	MAB104	Beckman Coulter
human CD86	PE	Maus (IgG _{2b})	HA5.2B7	Beckman Coulter
human IFN-γ	Biotin	Maus (IgG ₁ , κ)	4S.B3	BD Biosciences
human IgG, F(ab')₂	PE	Ziege	polyklonal	Southern Biotech
human IL-2	Biotin	Maus (IgG ₁ , κ)	B33-2	BD Biosciences
human Vβ13.1 TCR	PE	Maus (IgG _{2b})	IMMU 222	Beckman Coulter

Beckman Coulter, Krefeld; BD Biosciences, Heidelberg; DAKO, Hamburg; Hybridoma-Zelllinien, siehe 2.5.3; Immuno Tools, Friesoythe; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; 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
anti-NY-Eso-1 Fc (#1283)	Fusionsprotein aus FabT1 scFv Antikörper Binde-domäne und humaner IgG ₁ Fc Domäne	HEK 293T #1283 Zellen, siehe 2.5.2
anti-CEA-hFc (#443)	Fusionsprotein aus anti-CEA scFv Antikörper Bindedomäne und humaner IgG ₁ Fc Domäne	HEK 293T #443 Zellen, siehe 2.5.2
Anti-CD20-hFc#1369	Fusionsprotein aus anti-CD20 scFv Antikörper Bindedomäne und humaner IgG ₁ Fc Domäne	HEK 293T #1369 Zellen, siehe 2.5.2
NY-Eso-1 ₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Multimer	[(SLLMWITQC)NY-Eso-1 Peptid/ HLA-A*0201] _{N_{term}}	A.Wadle, Zürich, CH
anti-PE MicroBeads	Magnetische MicroBeads gegen PE-Konjugate	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Streptavidin-POD conjugate	Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin aus <i>Streptomyces avidinii</i> , bindet Biotin	Roche Diagnostics, Mannheim
Albumin from bovine serum (BSA)	lyophilisiert, \geq 96 % Reinheit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3 Methoden

Alle Arbeiten wurden den Anforderungen entsprechend in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe S1 oder S2 durchgeführt.

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 E.coli *DH5α* Bakterien Kultivierung und Lagerung

Die Kultivierung der E.coli *DH5α* Bakterien erfolgte in LB Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler („Infors HT Multitron Standard“, Bottmingen, CH). Die Selektion rekombinanter Bakterien erfolgte aufgrund bestehender Ampicillin Resistenz mittels Ampicillin (150–200 µg/ml) Zugabe. Zur Lagerung der rekombinanten Bakterien wurden 700 µl Bakterienkultur mit 300 µl 87 % (v/v) Glycerin vermischt und bei -80 °C eingefroren.

3.1.2 Herstellung chemokompetenter E.coli *DH5α* Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter *DH5α* Bakterien wurde frisches, antibiotikafreies LB-Medium (200ml) mit 2 ml einer Übernachtskultur des E.coli *DH5α*-Stammes inokuliert und bis zu einer OD_{590nm} von 0,5 in einem Schüttler („Infors HT Multitron Standard“, Bottmingen, CH) bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Nach Erreichen dieser OD wurden die Kulturen mindestens 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in einer vorgekühlten Zentrifuge 10 min bei 4 °C und 1600 x g sedimentiert. Die Beschleunigungs- und Bremswerte der Zentrifuge wurden zuvor herabgesetzt, zur Vermeidung hoher Beschleunigungsbelastungen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand der Bakterienkultur wurde verworfen und das Sediment aus *DH5α* Bakterien mit 10 ml eiskaltem, CaCl₂-Puffer vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine Zugabe weiterer 10 ml CaCl₂-Puffer, wonach die Bakterien-Puffer-Lösung 7 min bei 4 °C und 1100 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die oben beschriebene Resuspension in CaCl₂-Puffer wiederholt. Diese Bakteriensuspension wurde auf Eis für 30 min inkubiert und anschließend für 7 min bei 4 °C und 1100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Sediment aus *DH5α* Bakterien in 4 ml

CaCl₂-Puffer resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in jeweils 100 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der chemokompetenten *DH5α* Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Kompetenz der Bakterien wurde durch Transformation mit 10 pg und 100 pg des Plasmids pUC19 (Life Technologies, Darmstadt) und anschließender Auszählung der Kolonien bestimmt. Die Kompetenz der Bakterien lag zwischen 10⁶ und 10⁷ cfu/µg DNS (colony-forming units pro µg DNS).

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

3.1.3 Transformation kompetenter E.coli *DH5α*

(Hanahan, 1983)

Die -80°C gelagerten kompetenten *DH5α* Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 90 s bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 min auf Eis runtergekühlt. Zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz wurde dem Bakterienansatz 600 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler („Infors HT Multitron Standard“, Bottmingen, CH) kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert. Zum Auswachsen der Bakterienklone wurde die Agarplatte über Nacht bei 37 °C („BD115“, Binder, Tuttlingen) inkubiert.

3.2 Isolation von Plasmid-DNS aus E.coli *DH5α*

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

(Holmes und Quigley, 1981)

Diese Schnellpräparations-Methode wurde unter Verwendung von RNase zur Restriktionsanalyse von Klonen eingesetzt. Die RNase Zugabe dient zur Minimierung der RNS und bakterieller Endotoxine, die in der gewonnenen DNS enthalten sind.

Die auf den LB-Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden in 5 ml Ampicillin-haltiges (150–200 µg/ml) LB-Medium überführt, wo sie über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler („Infors HT Multitron Standard“, Bottmingen, CH) kultiviert wurden. Es wurden 1,5 ml der Übernachtskultur bei 10.000 x g für 60 s sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Bakterien Sediment wurde in 400 µl STET-Lösung resuspendiert, anschließend mit 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) gemischt und für 30 s in Wasser gekocht. Nach diesem Aufkochen wurde die Bakterienlösung 10 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Das Bakterien-Zelltrümmer Sediment wurde behutsam mit einer Pipettenspitze entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS wurde durch Zugabe von 420 µl Isopropanol und 40 µl 3 M NaAc pH 5,0 präzipitiert und anschließend für mindestens 30 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 500 µl 70 % (v/v) EtOH gewaschen, indem es für 10 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut verworfen und die DNS an der Luft oder in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet und anschließend in 40 µl ddH₂O aufgenommen.

STET-Lösung: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Triton-X-100, 0,1 M NaCl

3.2.2 Plasmidpräparation durch Bindung an eine Anionen-Austauschersäule

Die Präparation der Plasmid-DNS für den Zweck der Klonierungen, Sequenzierungen, Transfektionen und Kotransfektionen erfolgte durch die Bindung an eine Anionen-austauschersäule.

Zur Plasmid-DNS Isolierung wurde das „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 die „Mini“ Präparationen wurden 5 ml und für die „Midi“ Präparationen 200 ml Ampicillin-haltiges (150-200 µg/ml) LB-Medium mit Bakterien aus Glycerol Stocklösung oder Kolonien von LB-Agarplatten angeimpft. Die gewonnene Plasmid-DNS wurde in ddH₂O gelöst und die DNS-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die Plasmid-DNS Konzentration wurde auf 0,5 µg/µl oder 1 µg/µl eingestellt, aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen DNS (Fragment) Auftrennung verwendet. Hierzu wurden die DNS-Proben mit 6 x Beladungspuffer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) gemischt und auf ein horizontales Agarosegel („UltraPure Agarose“, Life Technologies, Darmstadt) aufgetragen. Im TAE-Puffersystem erfolgte die Auftrennung bei 8–12 V pro cm Gelbreite und die Zeit sowie eingesetzten DNS-Proben Volumina wurden je nach Verwendungszweck gewählt. Zum Nachweis der DNS wurden 2 µl des DNS interkalierenden Ethidiumbromids (10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories, München) pro 100 ml 1 %-iger (w/v) Agaroselösung zugesetzt. Die Analyse erfolgte bei UV-Licht (254 nm) unter Verwendung von Größenstandards (siehe 2.2).

3.4 Restriktionsspaltung von DNS-Doppelsträngen

Die Restriktion von Plasmid-DNS wurde unter Beachtung der Herstellerangaben bezüglich Verwendung von Restriktions-Endonukleasen und Puffersystemen durchgeführt (siehe 2.6). Es wurden jeweils 2 Units Restriktionsenzym pro µg DNS bei der Restriktionsspaltung eingesetzt. Dem Restriktionsansatz wurde 0,5 µg RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) beigefügt, wenn die DNS Präparation mit der „boiling-Methode“ (siehe 3.2.1) durchgeführt wurde.

3.5 DNS-Fragment Isolierung aus Agarose

DNS-Fragmente wurden nach Restriktionsspaltung (siehe 3.4) mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.3), die entsprechende Bande unter UV-Licht bei 254 nm identifiziert und mittels Skalpell aus dem Agarosegel isoliert. Die Isolation des DNS-Fragments aus dem Agarosegel durch DNS-Bindung an eine Silica Membran erfolgte nach Angaben des Herstellers („QIAquick Gel Extraction Kit“, Qiagen, Hilden).

3.6 Ligation von DNS-Doppelsträngen

Die aus Agarose isolierten (siehe 3.5) oder synthetisierten DNS-Fragmente wurden in entsprechenden linearisierten Vektor ligiert. Die Insert-DNS wurde im dreifach molaren Überschuss zu 100 ng Plasmid DNS eingesetzt. Dieser Insert-Vektor 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. Am Folgetag wurde der Ligationsansatz zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet (siehe 3.1.3).

3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis et al., 1986)

Die präparative PCR wurde mit der Polymerase PWO (Roche Diagnostics, Mannheim) in einem programmierbaren Heizblock („T3000 Thermocycler“, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Unter der Verwendung 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 zur Hybridisierung der eingesetzten DNS-Oligonukleotide (siehe 2.7) wurde mittels Temperaturgradienten bestimmt („Mastercycler gradient“, Eppendorf, Hamburg).

Es wurde folgender Standardansatz 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
MgCl ₂	1,5	µl
10x Polymerase Puffer	5	µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	1	µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	ad 50	µl

Es wurde folgendes Standard PCR Programm verwendet:

PCR Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1. Hitzedenaturierung	94	03:00
2. Hitzedenaturierung	94	00:45
3. Anlagerung der Oligonukleotide	50–65	00:30–01:00
4. Polymerisation (je nach Länge; ~1.000 bp/min)	72	01:00–02:30
35 Reaktionszyklen (2.–4.)		
5. Einmalige Endpolymerisation	72	10:00
6. Kühlung	4	

3.8 Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(Sanger, 1975)

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

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung wurde wie folgt 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

Die Reaktion wurde unter folgendem PCR Programm durchgeführt:

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	60	04:00
32 Reaktionszyklen (2.–4.)		
5. Kühlung	4	

Die Kapillar-Elektrophorese sowie die Fluoreszenzanalysen zur Auswertung der Proben erfolgte durch das Cologne Center of Genomics (Universität zu Köln). Die digitalisierten Sequenzierungsdateien wurden mit dem Programm „ContigExpress“ („Vector NTI Advance“, Life Technologies, Darmstadt) ausgewertet.

3.9 Zellkultur

3.9.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 2 (S2) unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II (Kojair Tech Oy, Vilppula, FIN) durchgeführt.

Die verwendeten Medien, Zusätze oder Puffer wurden bedarfsweise autoklaviert oder steril filtriert und anschließend steril eingesetzt. Vor Benutzung wurden die Medien oder Lösungen auf die entsprechende Temperatur gebracht. Die anschließende Lagerung der verwendeten Medien erfolgte bei 4 °C.

Die Kultivierung der HEK 293T Zellen erfolgte in DMEM Medium. Zur Kultivierung aller weiteren Tumorzelllinien, Hybridomzellen oder peripheren Blutlymphozyten wurde RPMI 1640 Medium verwendet. Vor Gebrauch des DMEM oder des RPMI 1640 wurden die Medien mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) „PenStrep“ versetzt. Im Folgenden steht die Bezeichnung „Kulturmedium“ oder „Medium“ für das Kulturmedium inklusive dieser Zusätze. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken („MCO-20AIC CO₂ Incubator“, Sanyo/Panasonic, Kadoma, Japan) unter 10 %-iger (v/v) (DMEM Medium) oder 5 %-iger (v/v) (RPMI 1640 Medium) CO₂-Versorgung bei 37 °C mit 95 % bis 100 % relativer Luftfeuchtigkeit. Zur Prävention von Mykoplasmen wurden die Zellen bedarfsweise in Ciprofloxacin (10 µg/ml) haltigem Medium kultiviert.

3.9.2 Passagieren adhärenter Zellen

Adhärente Zellen mussten von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst werden. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS Lösung gewaschen. Zur Ablösung vom Zellkulturgefäß wurde die gesamte Zellschicht mit 1–3 ml einer 1 x Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Das Zellkulturgefäß wurde bis zur Zellenablösung in den 37 °C warmen Inkubator gestellt, dies gewährleistete eine optimale Enzymaktivität des Trypsins. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurden diese sofort im Medium resuspendiert, wobei das Serum im Medium die Trypsin-Aktivität irreversibel blockiert. Die Zell-Medium Suspension wurde für 3 min bei 300 x g zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Zellsediment in entsprechendem Medium resuspendiert. Diese Zellesuspension fand Einsatz in einem Versuch oder wurde weiter kultiviert. Für die Kultivierung wurde ein Teil der Zellen in das Zellkulturgefäß zurückgegeben und mit frischem Medium versetzt.

3.9.3 Nachweis und Eliminierung von Mykoplasmen

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmenbefall getestet. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen bis zu einer Konfluenz von 50–70 % kultiviert und anschließend 0,1–1 ml Kulturüberstand gewonnen. Der Überstand

wurde anschließend bei 10.000 x g für 2 min sedimentiert und 50 µl des Überstandes abgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Es folgte eine PCR wie in Abschnitt 3.7 beschrieben.

Es wurde folgender Mykoplasmen Standardansatz für die PCR verwendet:

Kulturüberstand	3,6 µl
Primer #901 (10 µM)	1,25 µl
Primer #902 (10 µM)	1,25 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
10x Polymerase Puffer	2,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	1 µl
steriles ddH ₂ O, PCR-geeignet	15 µl

Desweiteren wurde das in Abschnitt 3.7 beschriebene Standard PCR Programm verwendet. Zur Identifizierung Mykoplasmen kontaminierter Zellen/Überstände wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen (Siehe 3.3).

Bei Mykoplasmenkontamination wurden die Zellen entsorgt oder einer Mykoplasmen-Kur unterzogen. Beim Kuren wurden die Zellen erst 3 Tage in Tiamulin-haltigem (10 µg/ml) Medium kultiviert. Anschließend fand eine Kultivierung über 4 Tage in Medium mit Minocyclin (10 µg/ml) statt. Dieses gesamte Vorgehen mit Tiamolin und Minocyclin wurde 3–4 Mal durchgeführt. Nach Abschluss der Prozedur wurden die gekurten Zellen ein weiteres Mal auf Mykoplasmenbefall getestet.

3.9.4 Zellzählung und Viabilitätsbestimmung

Die Anzahl von Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde durch Anhauchen der Zählkammer ein Deckglas parallel zur Oberfläche mit leichtem Druck aufgelegt. Der Raum zwischen Glasplatte und Unterseite des Deckglases stellt die Zählkammer dar. Das Volumen der Zählkammer ist durch die markierte Grundfläche und Kammerhöhe bestimmt. Es wurde eine 1:1 Lösung aus 10 µl der zu zählenden Zellsuspension und 10 µl Trypanblau angesetzt. Von dieser 1:1 Zellen-Trypanblau Suspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Es folgte eine mikroskopische Zellauszählung zweier schräg gegenüberliegender Großquadrate, von denen jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt war. Diese gezählten Zellen ergab die Zellzahl x 10⁴/ml. Die durch Trypanblau kenntlich gemachten toten Zellen wurden nicht mitgezählt.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Anzahl und Viabilität der Zellen bot der „ViCell XR Cell Viability Analyzer“ (Beckman Coulter, Krefeld). Hierbei wurde die Zell-Medium Suspension in ein Geräte-spezifisches Zählgefäß gegeben. Die toten Zellen wurden ebenfalls mittels Trypanblau angefärbt und die Anzahl der viablen Zellen/ml sowie die Viabilität der Zellen in % angezeigt. Zur Bestimmung der Anzahl und Viabilität machte das Gerät 50 Bildaufnahmen von der Zellsuspension.

3.9.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Langzeit-Lagerung von Zelllinien wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen sedimentiert und in 900 μ l Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μ l DMSO wurde die Suspension durchgemischt. Danach wurde die Suspension schnellst möglich in Gefrier-Ampullen überführt. Die Gefrier-Ampullen wurden mit einem $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlten Einfrierbehälter („Mr. Frosty Cryo $1\text{ }^\circ\text{C}$ Freezing Container“ Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit einer Abkühlung von $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ weggefroren. Nach Runterkühlung der Zellen auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen in eine $-150\text{ }^\circ\text{C}$ Tiefgefriertruhe oder flüssigen Stickstoff zur Langzeit-Lagerung überführt.

Zur Langzeit-Lagerung primärer Zellen wurden 1×10^7 bis $2,5 \times 10^7$ PBL sedimentiert und in 500 μ l 20 % (w/v) „human serum albumin“ (Gibco/Life Technologies, Darmstadt) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l der $4\text{ }^\circ\text{C}$ kalten „Cryopreservation Solution“ tropfenweise zugegeben. Mit dieser Zellsuspension wurde 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 zügig aufgetaut, um das zelltoxische DMSO schnell zu verdünnen und zu entfernen. Dafür wurden die Zellen sofort in 10 ml des $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Kulturmediums resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 3 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde im Medium resuspendiert und unter Zelllinien entsprechenden Bedingungen kultiviert.

3.9.6 Gewinnung humaner T-Lymphozyten

Zur Gewinnung periphere Blutlymphozyten (PBLs) wurden Leukozytenkonzentrate, sogenannte „buffy coats“, verwendet. Die Isolation der PBLs erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (Böyum, 1968) mittels „Lymphoprep“ (Axis-Shield, Oslo, N). Dafür wurde das Leukozytenkonzentrat im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und jeweils 25 ml dieser Leukozyten-PBS Suspension vorsichtig auf 15 ml „Lymphoprep“ geschichtet. Diese geschichtete Lösung wurde zur Dichtegradientenzentrifugation für 30 min bei RT und 800 x g zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge musste ausgestellt sein, um den Gradienten nicht zu zerstören. Ein Großteil der oberen Phase des Gradienten wurde abgenommen und verworfen. Die PBLs, die sich zwischen oberer Phase und „Lymphoprep“ in der Interphase befanden, wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurden die Lymphozyten mit jeweils 30 ml PBS durch Zentrifugation für 10 min bei RT und 250 x g drei Mal gewaschen. Das Lymphozytensediment wurde in RPMI 1640 Medium resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml). Zur Stimulation wurden die PBLs mit 1.000 U/ml IL-2, 200 ng/ml anti-human CD3 Antikörper OKT3 und 50 ng/ml anti-human CD28 Antikörper 15E8 versetzt. Die verbliebenen adhärenen Zellen der Suspension setzten sich wegen ihrer Plastikadhärenz über Nacht an der Oberfläche der Zellkulturflasche ab. Die nicht adhärenen Lymphozyten wurden nach 12h bis 24h in einer neuen Zellkulturflasche kultiviert. Nach dreitägiger Aktivierung wurden die PBLs in Kulturmedium ausschließlich mit IL-2 (200–500 U/ml) weiter kultiviert. Bei dieser Form der Aktivierung wurden bevorzugt T-Zellen amplifiziert, da andere mononukleäre Zellen des Blutes aufgrund ihrer fehlenden Stimulation sterben.

3.9.7 Transfektion von 293T HEK Zellen

Die Transfektion der HEK 293T Linie erfolgte mit Hilfe des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes „jetPRIME“ (Polyplus-transfection, Illkirch, F) oder „PEIpro“ (Polypus Transfection, Illkirch, F). Die HEK 293T Zellen wurden 48-72 h vor Transfektion in 10 ml DMEM Medium auf einer 10 cm Zellkulturplatte („Cell Cultur Dish, PS, 100 x 20 mm“, Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät, so dass die HEK 293T Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine 60–70 % Konfluenz aufwiesen.

Für die Transfektion mit „jetPRIME“ Reagenz wurden 500 μ l „jetPRIME“ Puffer mit 10 μ g Plasmid-DNS versetzt und für 10 s mit Hilfe des Vortex (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) gemischt. Anschließend wurden 20 μ l „jetPRIME“ Transfektions-

reagenz zugegeben und erneut für 10 s zum Mischen gevortex. Dieser Transfektionsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert.

Für die Transfektion mit „PEIpro“ Reagenz wurden 20 µg Plasmid-DNS in 250 µl FCS freies DMEM Medium gegeben und für 10 s zum Mischen gevortex. Anschließend wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß 250 µl FCS freies DMEM mit 20 µl „PEIpro“ Transfektionsreagenz versetzt und ebenfalls für 10 s gevortex. Daraufhin wurde die „PEIpro“-haltige Lösung auf die Plasmid-DNS Lösung gegeben, mittels Vortex 10 s gemischt und für 15 min bei RT inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellkulturplatte(n) abgenommen und erneuert. Nach Inkubation wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Medium der Zellkulturplatten gegeben und durch vorsichtiges hin- und herschwenken auf der Platte verteilt. Nach 24–48 h Kultivierung unter 10 %-igem (v/v) CO₂ bei 37 °C mit 95-100 % relativer Luftfeuchtigkeit wurden die transfizierten HEK 293T Zellen für Analysen verwendet.

3.9.8 Retrovirale Transduktion von T-Zellen als Kokultivierung

Für die retrovirale Transduktion wurde als erstes die retrovirale Vektor-DNS in Kombination mit der retroviralen Helferplasmid-DNS pCOLT-gALV (#392) und pHIT60 (#393) in die HEK 293T Zellen eingebracht (siehe 3.9.7). Für den Kotransfektionsansatz wurden jeweils 3 µg der Helferplasmid-DNS (#392 und #393) sowie 4 µg der Vektor-DNS eingesetzt. Nach 24 h wurde der DMEM Überstand von der 10 cm Zellkulturplatte entfernt. Es wurden 5×10^6 vorstimulierte (4–8 Tage) T-Lymphozyten in 25–30 ml RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 1.000 U/ml IL-2 und 10 mM HEPES resuspendiert und auf die kotransfizierten HEK 293T Zellen gegeben. Die Voraktivierung der T-Zellen war essentiell für die Infektion der T-Zelle, da die Integration der Vektor-DNS ins Wirtsgenom vorzugsweise in proliferierenden Zellen erfolgte. Nach 24-48 h der Kokultivierung wurden die transduzierten T-Zellen langsam von den adhärenen HEK 293T Zellen abgenommen. Die Transduktionsrate der T-Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe 3.13) bestimmt. Die transduzierten T-Zellen wurden anschließende für einen Testansatz in RPMI 1640 Medium 24–48 h ohne IL-2 kultiviert oder bei > 48 h Kultur unter Depravation von 20-100 U/ml IL-2 inkubiert. Die IL-2 Reduktion erfolgte um die Aktivierung des endogenen TCR zu reduzieren und die Zellen in einen Ruhezustand zu

versetzen. Vor dem Einsatz in einen Test wurden die transduzierten Zellen erneut mit Medium gewaschen.

3.9.9 Retrovirale Transduktion von T-Zellen mittels Virus-enthaltendem Überstand

Für die Überstandstransduktion wurden kleine Kunststoff-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit jeweils 2 ml Poly-D-Lysin-(PDL)-Lösung beschichtet. Hierfür wurde PDL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) auf eine Konzentration von 10 mg/ml in ddH₂O verdünnt. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler („CERTOMAT MO II“, Sartorius, Göttingen) bei 4 °C und 50 rpm für mindestens 16 h. Anschließend wurde die PDL-Lösung entfernt. Zur retroviralen Überstandstransduktion humaner T-Zellen wurde Virus-enthaltender Überstand von transfizierten HEK 293T Zellen verwendet (siehe 3.9.7). Es wurden 6 ml des Virus-enthaltenden Überstandes in die PDL beschichtete Zellkulturflasche gegeben und bei 3000 x g RT für 30 min zentrifugiert. Während der Zentrifugationszeit wurden pro Transduktionsansatz 5 x 10⁶ vorstimulierte (4–8 Tage) PBLs abzentrifugiert und in 4 ml Virus-enthaltenden Überstand resuspendiert. Dieser Suspension wurden 2 ml frisches RPMI 1640 Medium mit 300 U/ml IL-2 zugegeben. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der Zellkulturflaschen verworfen und die Überstand-T-Zell-Suspension in die Zellkulturflasche gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen in einer 32 °C vorgewärmten Zentrifuge bei 1600 x g für 90 min zentrifugiert. Danach wurden die T-Zellen in der beschichteten Zellkulturflasche ü.N. bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ mit 95-100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Dieses Verfahren wurde am folgenden Tag mit den transduzierten T-Zellen und frischem Virus-enthaltendem Überstand wiederholt. Anschließend wurden die transduzierten T-Zellen in IL-2-haltigem (300 U/ml) RPMI 1640 Medium kultiviert.

3.10 Serumgewinnung aus Vollblut

Das Blut wurde für 2 min bei 1500-2000 x g zentrifugiert. Das Serum als Überstand wurde in ein frisches Tube überführt und die Serumproben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.11 Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden in ein 5 ml Polystyrol Röhrchen 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen gegeben und zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Die jeweilige Zentrifugation der Waschschrirte erfolgte für 3 min bei RT und $400 \times g$ und der Überstand wurde verworfen. Der Fluorochrom-gekoppelte Detektionsantikörper oder ungekoppelte Antikörper wurde in das Restvolumen von ca. 100 μ l gegeben und die Probe für 30 min auf Eis oder bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, da die Fluorochrome der Antikörper lichtempfindlich sind. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und für die Analyse in 400 μ l PBS aufgenommen. Bei primär ungekoppelten Antikörpern wurde eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis oder bei 4 °C mit einem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper durchgeführt und die Zellen danach wieder zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in 400 μ l PBS resuspendiert. Die Analyse der Fluoreszenzen erfolgte mit dem Durchflusszytometer „FACSCanto“ oder „FACSCanto II“ unter Verwendung der „FACSDiva“ Software (Becton Dickinson, Heidelberg).

3.12 „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)

Die Fluoreszenz-basierte durchflusszytometrische Zellsortierung „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) von Tumorzellen wurde zur Gewinnung von Zellen unterschiedlicher Expressionsdichten durchgeführt. Die Tumorzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die jeweilige Zentrifugation der Waschschrirte erfolgte für 3 min bei RT und $300 \times g$ und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Antikörper anti-NY-Eso-1 #1283 für 30 min auf Eis oder bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis oder bei 4 °C mit dem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper. Danach wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen und anschließend je nach Zellzahl in 1-10 ml PBS resuspendiert. Die Sortierung der Zellpopulationen erfolgte durch die Fluoreszenz Signalintensität (MFI) mit Hilfe des Durchfluss-Sortierer „FACSAria III“ unter Verwendung der „FACSDiva“ Software (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Reinheit der angereicherten Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Vor dem Einsatz in einem Test wurden die Zellen sedimentiert und in entsprechender Menge Medium aufgenommen.

3.13 Produktion und Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die Gewinnung monoklonaler Maus IgG₁ Antikörper 15E8, 9G10 sowie des monoklonalen Maus IgG_{2a} Antikörpers OKT3 erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter Gebrauch von Ziege anti-Maus IgG₁ Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Ziege anti-Maus IgG_{2a} Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gekoppelter Agarose. Für die Sekretion des gewünschten monoklonalen Antikörpers wurden die entsprechenden Hybridomzellen kultiviert und der antikörperhaltige Kulturüberstand bei -20 °C gelagert. Ab einer Menge von ca. einem Liter Kulturüberstand wurde dieser aufgetaut, zentrifugiert und filtriert (Ausschlussgröße 0,45 µm). Dieser Kulturüberstand wurde mittels einer Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min über eine Antikörper-beladene „C 10/10 Agarosesäule“ (Amersham/GE Healthcare Europe, Freiburg) gegeben. Anschließend wurden mit PBS nicht gebundene Antikörper ausgewaschen. Die einzelnen Fraktionen des gebundenen Antikörpers wurden mit 0,1 M Glycin Puffer pH 3,0 unter Verwendung der Flüssigchromatographie („ÄKTaprime“, Amersham/GE Healthcare Europe, Freiburg) gemäß Herstellerangaben eluiert. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch („NanoDrop 1000“, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Nach Abschluss der Elution wurden die Antikörper Fraktionen vereint und unter Rühren in zwei Liter PBS in einem Dialyseschlauch („Spectra/Por“, Roth, Karlsruhe) der Ausschlussgröße 12.000–14.000 Molecular Weight Cut Off (MWCO) über Nacht bei 4 °C umgepuffert. Die Antikörper-Konzentration wurde spektro-photometrisch bestimmt, Aliquots erstellt und bei -20 °C gelagert.

3.14 Kultivierung auf beschichteten Oberflächen

Für die Beschichtung einer Oberfläche wurden die Antikörper in PBS verdünnt und es wurde auf eine „F96 Polysorp Nunc-Immuno“ Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) pro Vertiefung 50 µl der Antikörper-Lösung aufgetragen. Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte bei 4 °C über Nacht oder bei 37 °C für 3–4 h. Die Antikörper-Lösung der Platte wurde anschließend verworfen und die Mikrotiterplatte pro Vertiefung mit 200 µl PBS gewaschen. Die entsprechende Anzahl geruher oder minimal IL-2 stimulierter T-Zellen (siehe 3.9.8 oder 3.9.9) wurden in 200 µl Medium pro Vertiefung zugegeben. Hierzu wurde zuvor die Rezeptor-Expression der modifizierten T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.11) und die Anzahl der jeweiligen T-Zellen normiert auf die Transduktionsrate der T-Zellen. Für den Versuch wurden $0,25\text{--}4 \times 10^4$ CAR transduzierte oder TCR transduzierte T-Zellen pro Vertiefung

ausplattiert und 48–72 h unter entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Der Kontrollansatz der nicht-transduzierten (nt) T-Zellen verwendete die gleiche Anzahl T-Zellen wie der Ansatz der Rezeptor modifizierten T-Zellen mit geringster Transduktionsrate. So wurden alle im Test eingesetzten Zellen auf die gleiche Anzahl T-Zellen normiert. Für die Analyse wurden 150 µl Zellkulturüberstand pro Vertiefung vorsichtig abgenommen und 50 µl davon für den Zytokin-ELISA (siehe 3.18) verwendet. Eine kurzfristige Lagerung der Überstände erfolgte bei 4 °C und zur Langzeit-Lagerung wurden die Zellkulturüberstände bei -20 °C aufbewahrt.

3.15 Kokultivierung der T-Zellen mit Multimer-Bead-Komplexen

Die Multimer-Bead-Komplexe wurden durch Inkubation der PE-gekoppelten Multimere (HLA-A*0201/SLLMWITQC, A.Wadle, Zürich, CH) mit anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gewonnen. Zuvor wurde berechnet wie viel Multimere und Beads für den Testansatz notwendig sind. Für die PE-gekoppelten Multimere wurden pro 1×10^6 3 µl Multimer Lösung eingesetzt und bei den anti-PE MicroBeads pro 1×10^6 20 µl verwendet. Um das für T-Zell schädigende Azid der Bead-Lösung zu entfernen wurden diese zweimal bei $18.000 \times g$ für 5 min mit 2 ml PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der PE-Multimere mit den anti-PE Beads in 50 µl X-Vivo 15 Medium zur Komplexbildung für 1 h auf Eis. Alle 10 min wurden die Multimer-Bead-Lösung 3-4 x angeschnipst und schließlich angefügt. Während der Inkubation wurden pro Vertiefung $2,5 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen auf die Rundbodenplatten („Zellkulturtestplatte 96U“, TPP, Trasadingen, CH) in 60 µl X-Vivo 15 Medium mit 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertem FBS aufgetragen. Nach der Inkubation wurde die Multimer-Bead-Komplex Lösung aufgefüllt mit X-Vivo 15 Medium, das mit 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertem FBS versetzt war, so dass pro Vertiefung 50 µl zugegeben wurde. Anschließend wurde die Platte kurz angefügt und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ 48-60 h mit 95-100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.16 Kokultivierung der T-Zellen mit Tumorzellen

Für die durchflusszytometrische Bestimmung (Siehe 3.11) der Rezeptor-Expression wurde nach IL-2 Deprivation (siehe 3.9.8 oder 3.9.9) die zu untersuchenden T-Zellen analysiert. Anschließend wurde die Anzahl der eingesetzten T-Zellen auf die Transduktionsrate normiert. Zur Bestimmung der Anzahl nicht-transduzierter (nt) T-Zellen, die als Kontrolle dienten, wurde die niedrigste Transduktionsrate verwendet.

Zudem wurde die Anzahl der Tumorzellen bestimmt. Anschließend wurden die Rezeptor modifizierten T-Zellen (Effektorzellen) auf die Rundbodenplatten („Zellkulturtestplatte 96U“, TPP, Trasadingen, CH) in 100 µl RPMI 1640 Medium pro Vertiefung je nach Versuchsaufbau in Verdünnungsreihen aufgetragen. Danach wurden die Tumorzellen in 100 µl RPMI 1640 Medium pro Vertiefung in konstanter Anzahl aufgetragen. Die eingesetzte Anzahl Effektorzellen und Tumorzellen und ihre E:T Verhältnisse ist im jeweiligen Experiment angegeben. Nach 48 h Kokultivierung wurden 150 µl Zellkulturüberstand pro Vertiefung vorsichtig abgenommen und für Zytokin-ELISA (Siehe 3.18) eingesetzt oder zur längerfristigen Lagerung bei -20 °C aufbewahrt. Die Zytotoxizität der Effektorzellen auf die Tumorzellen wurde mittels XTT-basiertem Viabilitätstests (siehe 3.20) der verbleibenden Zellen bestimmt.

3.17 Pulsen von Tumorzellen

Die TAP-defizienten T2 Tumorzellen, welche sich im Kulturmedium befanden, wurden dreimal für 6 min bei 250 x g in 10 ml PBS gewaschen. Dreimaliges Waschen ist wichtig um das Serum (annähernd) komplett zu entfernen, da im Serum enthaltene Peptide die HLA Bindung mit dem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ („SLLMWITQV“ Peptidsequenz, GeneCust, Dudelange, L) Peptid stören können. Während der Zentrifugationszeiten wurde das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte (Greiner bio-one, Frickenhausen) in einem Volumen von jeweils 200 µl X-Vivo 15 Medium pro Vertiefung in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Danach wurden 1-2 x 10⁶ Zellen/ml mit einem Volumen von jeweils 1800 µl pro Vertiefung ausgesät. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ mit 95-100 % relativer Luftfeuchtigkeit für 3 h inkubiert.

3.18 „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Dieses Analyseverfahren wurde verwendet, um das Zytokin IFN-γ in Zellkulturüberständen nach Inkubation der T-Zellen mit immobilisierten Antikörpern (siehe 3.14), Multimer-Bead-Komplexen (siehe 3.15) oder mit Tumorzellen (siehe 3.16) zu bestimmen.

Hierfür wurden Mikrotiterplatten („F96 Maxisorp Nunc-Immuno“, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit dem Fangantikörper in 50 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung in den Platten wurde anschließend ausgeschlagen und freie Bindungsstellen der Oberfläche mittels 1 %

(w/v) BSA in PBS (BB) abgesättigt. Dazu wurden 200 µl dieser BB-Lösung pro Vertiefung aufgetragen und für wenigstens 2 h bei RT auf dem Kreisschüttler („KS125 basic“, IKA Labortechnik, Staufen) inkubiert. Danach wurden die Platten ausgeschlagen und dreimal mit 200 µl PBS/T pro Vertiefung gewaschen. Es folgte das Auftragen einer Standardreihe, wodurch eine bekannte Menge des IFN- γ Zytokins in BB/T titriert wurde. Zudem wurden die zu untersuchenden Überstände (je 50 µl pro Vertiefung) auf die Mikrotiterplatten gegeben. Die Mikrotiterplatten mit den Überständen wurden auf einem Schüttler („CERTOMAT MO II“, Sartorius, Göttingen) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten ausgeschlagen und viermal mit 200 µl PBS/T pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit dem entsprechenden Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper in jeweils 50 µl BB/T pro Vertiefung für mindestens 1 h bei RT auf dem Kreisschüttler inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit 200 µl PBS/T pro Vertiefung entfernt. Danach wurden 50 µl einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase in BB/T pro Vertiefung aufgetragen und für 30 min bei RT auf dem Kreisschüttler inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend fünfmal mit 200 µl PBS/T pro Vertiefung gewaschen und danach folgte die Zugabe von 100 µl ABTS-Substratlösung pro Vertiefung. Der Test entwickelte bei RT und die Absorption wurde photometrisch („EMax Plus Microplate Reader“, Molecular Devices, Sunnyvale, US) bei einer Wellenlänge von 405 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 490 nm bestimmt. Die Zytokin-Konzentrationen der Kulturüberstände wurden anhand der linearen Progression der gemessenen Standard-Konzentrationen des Zytokins berechnet.

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

Detektionslösung: BB/T, 1 µg/ml biotinylierter Maus anti-human IFN- γ

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

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

3.19 Multiplex-Immunoassay

Der Bead basierte Multiplex-Immunoassay „LEGENDplex Human Th1 Panel (5-plex)“ (BioLegend, London, UK) wurde angewandt, um die Konzentrationen mehrerer humaner Zytokine simultan in einem Zellkulturüberstand zu bestimmen. Bei dieser Durchführung wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α Herstellerangaben gerecht gemessen. Dafür wurden die entsprechenden Zellkulturüberstände (30 μ l pro Vertiefung) mit einer Bead-Mischung auf die im Kit enthaltene Filterplatte inkubiert. Hierbei gab es Hersteller vorgegebene Bead-Größen und die jeweiligen Beads waren mit Zytokin-spezifischen Antikörpern konjugiert. Die Zytokin-spezifischen Detektionsantikörper sind zudem Biotin-konjugiert, somit erfolgte nach Inkubation der Bead-Mischung die Zugabe eines Streptavidin-PE Konjugats. Die Hersteller angegebenen Waschschriffe erfolgten im „ELx50 Microplate Strip Washer“ (BioTek, Winooski, US). Anschließend wurden die Zytokinkonzentrationen der Kulturüberstände durchflusszytometrisch als verschiedene „Populationen“ aufgrund der Beadgröße und Fluoreszenzintensität simultan bestimmt. Die Kalibrierkurven wurden durch Verdünnungsreihen der im Kit enthaltenen Standardkonzentrationslösungen erstellt. Die Berechnung entsprechender Zytokinkonzentrationen der jeweiligen Überstände erfolgte mittels „FlowCytomix Pro 3.0“ Software (eBioscience, Frankfurt) unter zu Hilfenahme der Kalibrierkurven.

3.20 XTT-basierter Viabilitätstest

(Jost et al., 1992)

Nach dem Effektorzellen und Tumorzellen (siehe 3.16) kokultiviert wurden, folgte die Abnahme der Zellkulturüberstände und schließlich wurde die spezifische Zytolyse bestimmt. Dazu wurde zu den verbliebenen 50 μ l Ansätzen in der Mikrotiterplatte 100 μ l XTT-Reagenz Lösung pro Vertiefung zugegeben und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ mit 95-100 % relativen Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das XTT Tetrazolium-Salz wurde durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem roten wasserlöslichen Formazan-Salz umgesetzt. Somit ist die Anzahl lebender Zellen proportional zum Umsatz des XTT Tetrazolium-Salz. Die Farbmessung der XTT Ansätze erfolgte photometrisch („EMax Plus Microplate Reader“, Molecular Devices, Sunnyvale, US) bei einer Wellenlänge von 450 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

Die optische Dichte (OD) der kokultivierten Effektorzellen und Tumorzellen wurde spektrophotometrisch pro Vertiefung bestimmt. Von diesem Effektorzellen und Tumorzellen OD Wert wurde der OD Wert der Effektorzellen subtrahiert und in das Verhältnis des OD Wertes der Tumorzellen abzüglich des Medium Hintergrundwerts gesetzt. Prozentual wurde dieser OD Wert mit 100 multipliziert.

Die Viabilitätsberechnung erfolgte mittels folgender Formel:

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

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

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

3.21 Tumorinduktion in der Maus

Die Mausversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) genehmigt (Genehmigungs-nummer 84-02.04.2012.A417). Für die Versuche wurden Rag2^{-/-}cγ^{-/-} Mäuse (Taconic, Hudson, NY, USA) des Stammes C57BL/6 verwendet. Diese Rag2^{-/-}cγ^{-/-} Tiere sind immundefiziente Mäuse, welche durch Deletion der „common cytokine receptor γ chain“ keine NK Zellen besitzen. Das Einkreuzen der „recombinant activating gene 2“ (Rag2) defizienten Maus gewährleistet, dass wegen fehlender V(D)J Rekombination keine reifen T- und B-Lymphozyten gebildet werden (Shinkai et al., 1992).

Die transduzierten humanen T-Zellen wurden unter IL-2 Deprivation (siehe 3.9.8 oder 3.9.9) kultiviert und die Expression der Rezeptor modifizierten T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.11). Die Anzahl der nicht-transduzierten (nt) T-Zellen, als Kontrolle, wurde auf die Anzahl der Rezeptor modifizierten T-Zellen mit der niedrigsten Transduktionsrate normiert. Die adhärenenten Tumorzellen wurden von der Zellkulturflasche abgelöst (siehe 3.9.2), in Medium resuspendiert und die

Zellzahlen bestimmt (siehe 3.9.4). Die jeweils benötigte Zellzahl plus Reserve von mindestens einem Ansatz wurde mit 2×10^6 Tumorzellen pro Injektion, sowie 2×10^6 Rezeptor modifizierten T-Zellen bestimmt. Nach Zentrifugation für 3 min bei $300 \times g$ wurden die Zellen in kaltem PBS resuspendiert ($50 \mu\text{l}$ pro Injektion). Vor Ort wurden die T-Zellen und Tumorzellen im Verhältnis 1:1 gemischt und die Injektionen von je $100 \mu\text{l}$ der Zellgemisch Lösung erfolgten zeitnah. Als Kontrolle wurden 2×10^6 Tumorzellen mit 2×10^7 nicht-transduzierten (nt) T-Zellen in $100 \mu\text{l}$ kaltem PBS pro Injektion eingesetzt. Die Tumorzellen und Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden nach der Winn-Methode (Winn, 1961) subkutan (s.c.) in eine Flanke der Maus koinjiziert. Zur Analyse des Tumorwachstums wurden Höhe, Breite und Tiefe der Tumore mit Hilfe einer Schieblehre alle 2-4 Tage gemessen. Das Tumolvolumen wurde unter Annahme des Volumens eines maximalen Quaders berechnet.

3.22 Substanzapplikation bei der Maus

Die Mausversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) genehmigt (Genehmigungs-nummer 84-02.04.2012.A417). Für die Versuche wurden immundefiziente NOD-scid-HLA-A2 Mäuse („NOD.Cg-Prkdc^{scid}Tg(HLA-A2.1) Enge/Dvs“, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) des Stammes C57BL/6 verwendet (Banuelos et al., 2004).

Für die intraperitoneale (i.p.) Applikation wurde die entsprechende Menge Rezeptor modifizierter T-Zellen aus Kultur genommen und einmal mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der Transduktionsrate erfolgte zuvor (siehe 3.11). Die Zellen wurden in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen. Von der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ („SLLMWITQV“ Peptidsequenz, GeneCust, Dudelage, L) Peptidlösung wurden für den Mausversuch entsprechende Mengen verwendet und ebenfalls in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen. Bis zum Verwenden wurden die Suspensionen auf Eis gehalten. Die intraperitoneale Injektion von $100\text{-}250 \mu\text{l}$ pro Tier wurde im einseitigen Unterbauch gesetzt. Um eine Darmperforation zu vermeiden wurde die Maus leicht kopfüber gehalten. Die Injektion wurde etwa im 45° Winkel gesetzt.

Für die intravenöse (i.v.) Applikation wurde von der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ („SLLMWITQV“ Peptidsequenz, GeneCust, Dudelage, L) Peptidlösung für den Mausversuch entsprechende Mengen verwendet und in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen. Bis zum Verwenden wurde die Lösung auf Eis gehalten. Die Injektion

wurde durch Hyperthermie erleichtert, da sich dann die Gefäße der Schwanzvene gut darstellen. Für die Erwärmung der Mäuse wurden diese einem Infrarotstrahler ausgesetzt. Die Maus wurde geeignet fixiert und 100 µl Peptidlösung in die Vene des Tieres injiziert.

3.23 Präparation muriner T-Zellen aus dem Blut für die durchflusszytometrische Analyse

Das periphere Blut der Maus wurde mittels Anritzen der Schwanzvene gewonnen. Die Blutabnahme wurde durch Hyperthermie erleichtert, wobei die Mäuse einem Infrarotstrahler ausgesetzt wurden. Von dem Versuchstier wurden etwa 100 µl Blut abgenommen, das in 100 µl PBS-Heparin Lösung floss. Zur Gewinnung peripherer Lymphozyten aus Vollblut wurden die Erythrozyten lysiert. Dazu wurde das Zellsediment mit 2 ml des Erythrozyten-Lysepuffer (BD Biosciences, Heidelberg) gemischt und die Proben für 10-15 min zur Erythrozytenlyse bei 37 °C inkubiert. Die Lyse erfolgte, da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, wodurch sie die einströmenden Ionen nicht mehr hinaus befördern konnten. Zum Ausgleich des osmotischen Drucks, strömte Wasser ein, wodurch die Erythrozyten platzten. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS für 3 min bei 300 x g gewaschen. Anschließend standen die Lymphozyten der durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung (siehe 3.11).

4 Ergebnisse

4.1 Die rekombinanten Rezeptoren werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert

In dieser Arbeit wurden anti-NY-Eso-1 spezifische Rezeptoren in den Formaten des chimären Antigen Rezeptors (CAR) und des rekombinanten T-Zell Rezeptors (TCR) verwendet.

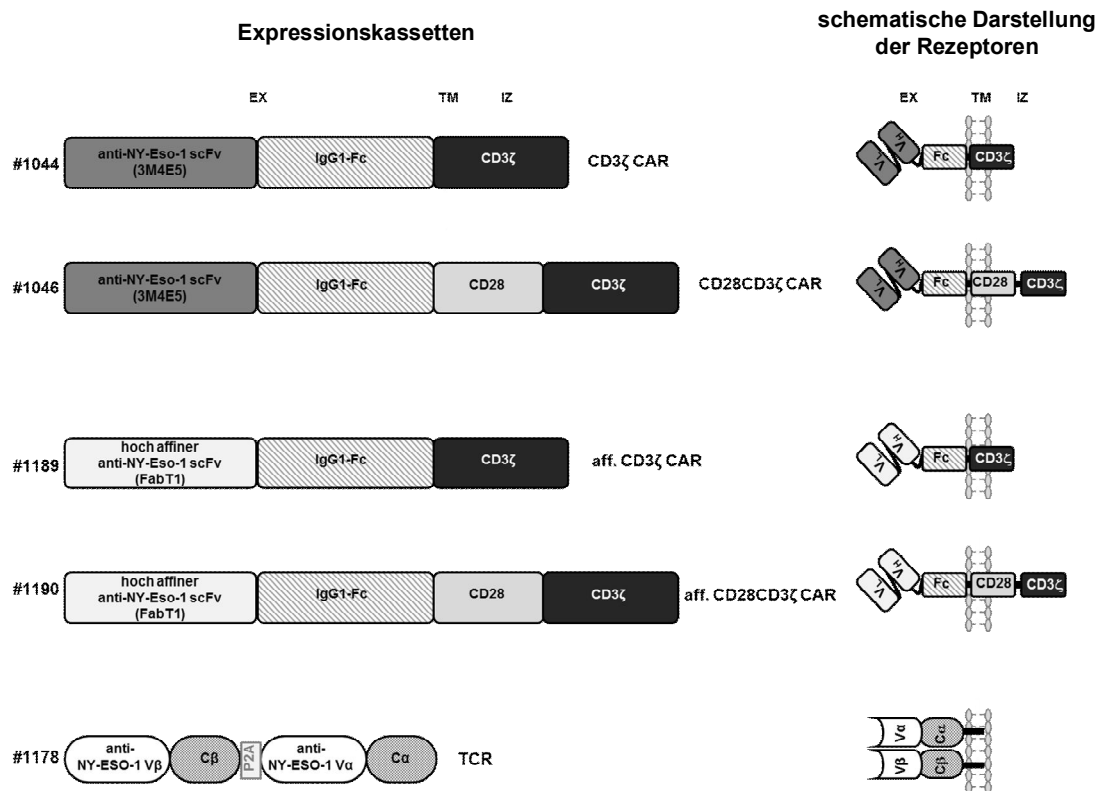


Abbildung 3 Der modulare Aufbau der rekombinanten Rezeptoren. Der CAR besteht in der extrazellulären Domäne (EX) aus einer Antikörper-abgeleiteten Einzelkettenbindedomäne (scFv), die aus der variablen Region der leichten und schweren Kette (V_L und V_H) mit Spezifität für NY-Eso-1 aufgebaut ist, sowie einer Fc Brückendomäne bestehend aus IgG1 CH2CH3. Die Transmembrandomäne (TM) besteht aus der Transmembranregion des CD3 Rezeptors bei den CD3ζ CARs (#1044, #1189) oder der Transmembranregion des CD28 Rezeptors bei den CARs mit der zusätzlichen kostimulatorischen CD28 Domäne (#1046, #1190). Im intrazellulären (IZ) Teil besteht der CAR aus der Signalkette des CD3 Rezeptors (#1044, #1189) oder aus der Kombination der kostimulatorischen CD28 Domäne mit der CD3ζ Kette (#1046, #1190). Die Polypeptidketten der CARs sind jeweils mit dem Leader der Immunglobulin Leichtkette kappa (Lk) ausgestattet. Der modulare Aufbau des 1G4 TCR besteht in der extrazellulären Domäne aus der variablen und konstanten β -Region ($V\beta$ und $C\beta$) sowie der variablen und konstanten α -Region ($V\alpha$ und $C\alpha$) des TCR. An die α - und β -Kette schließt sich je eine Transmembrandomäne an. Zur Gewährleistung einer äquimolaren Translation der Ketten des TCR sind die α - und β -Kette durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) verbunden.

Die CARs sind im extrazellulären Bereich aus einer Antikörper-abgeleiteten Einzelkettenbindedomäne (scFv) und der Brückendomäne IgG1 Fc aufgebaut. Die intrazelluläre Signalgebung erfolgt durch die CD3 ζ Kette (#1044, #1189) oder durch die kostimulatorische CD28 Domäne zusammen mit der CD3 ζ Kette (#1046, #1190). Die Antikörper-abgeleiteten Bindedomänen 3M4E5 (#1044, #1046) und FabT1 (#1189, #1190) erkennen das HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid und wurden als Bindedomänen im CAR verwendet. Die scFv Antikörper-abgeleiteten Bindedomänen 3M4E5 und FabT1 unterscheiden sich in ihrer Affinität, wobei der FabT1 scFv Antikörper 10fach affiner ist als der 3M4E5 scFv Antikörper (Stewart-Jones et al., 2009). Der anti-NY-Eso-1 TCR 1G4 (#1178) ist ein $\alpha\beta$ TCR Heterodimer, bestehend aus der variablen α - und β -Kette (V α , V β), sowie den konstanten Regionen der TCR α - und β -Kette (C α , C β), an die sich die Transmembrandomänen des TCR anschließen (Chen et al., 2005). Der modulare Aufbau der Rezeptoren ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zur Expression der CAR und TCR Moleküle wurden die Konstrukte retroviral in humane T-Zellen des peripheren Blutes transduziert. Die CARs wurden in der durchflusszytometrischen Analyse durch die Fc Brückendomäne nachgewiesen. Da der transgene TCR #1178 der V β 13.1 Familie angehört, wurde die variable β Kette (V β 13.1) zum Nachweis der TCR #1178 transgenen T-Zellen dargestellt. Zum Vergleich wurden unmodifizierte T-Zellen, die den endogenen V β 13.1 TCR exprimieren, wie der TCR #1178 nachgewiesen (Abbildung 4). Zum Nachweis der T-Zellen wurde CD3 dargestellt. Die durchflusszytometrische Analyse wies die Fc Brückendomäne der CARs #1044, #1046, #1189 und #1190 auf der T-Zell Oberfläche nach. Die Expression des rekombinanten TCR #1178 auf T-Zellen wurde durch Nachweis der erhöhten V β 13.1 Expression (24,5 %) gegenüber nicht modifizierten Zellen (4,3 %) erbracht. Der CD28CD3 ζ CAR #1046 hatte gegenüber dem CD3 ζ CAR #1044 eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und wurde in höherer Dichte exprimiert. CARs mit CD28 kostimulatorischer Domäne (#1046, #1190) zeigten eine höhere MFI als CARs ohne CD28 Domäne (#1044, #1189), was auf eine erhöhte Anzahl CAR Moleküle pro Zelle bei CARs mit kostimulatorischer Domäne hinweist. Die MFI des rekombinanten TCR #1178 ist etwa gleich der MFI des endogenen TCR; die Anzahl der TCR Moleküle pro Zelle ist beim endogenen TCR etwa gleich der des rekombinanten TCR. Färbungen mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps oder unmodifizierte T-Zellen dienten zur Kontrolle.

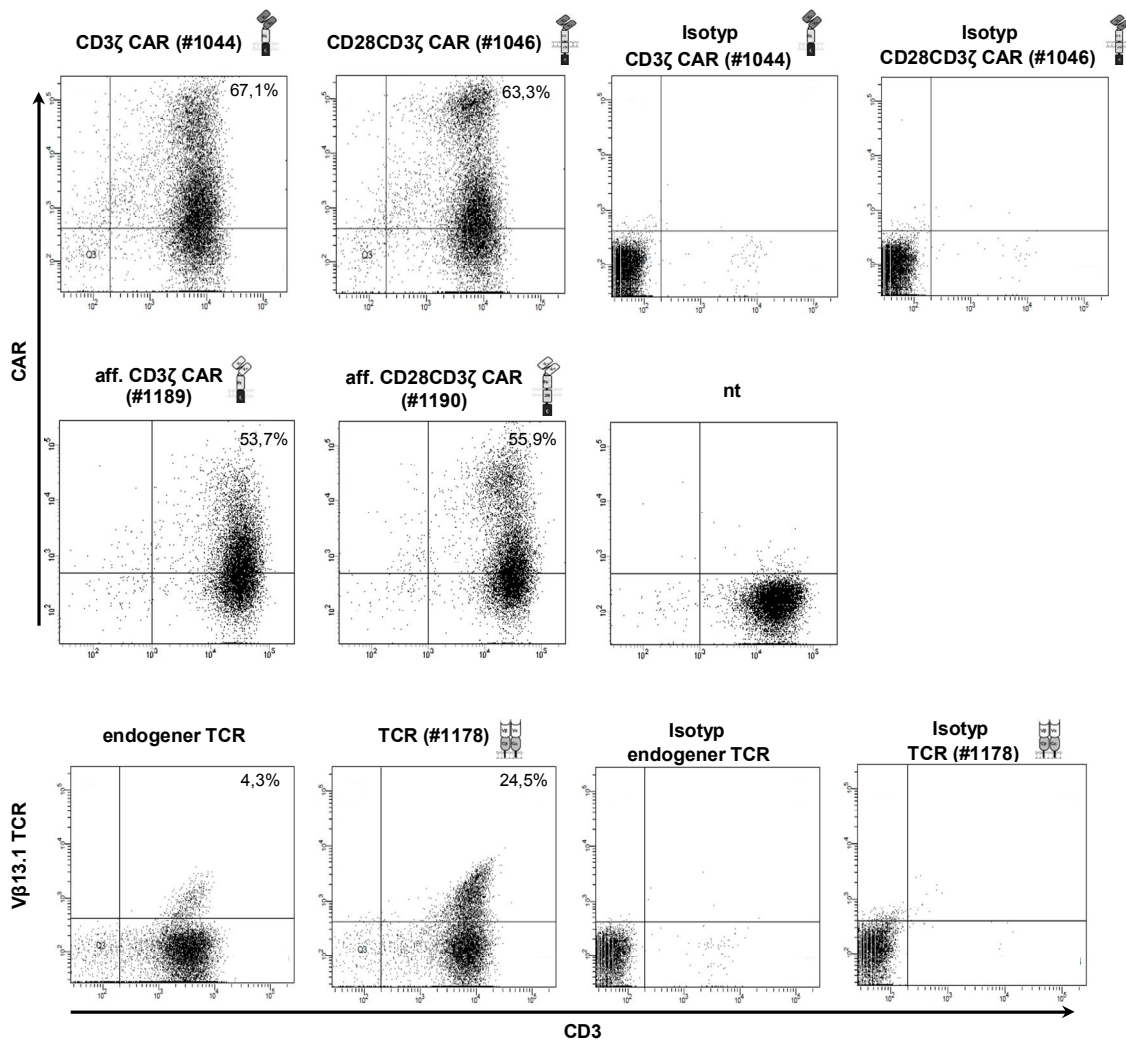


Abbildung 4 Expression der rekombinanten Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche. T-Zellen wurden mittels retroviralem Gentransfers mit den Rezeptoren unterschiedlicher modularer Komposition ausgestattet. Zum Nachweis der anti-NY-Eso-1 CARs wurden die Zellen mit dem PE-konjugierten anti-IgG1 Fab Antikörper inkubiert. Der TCR wurde durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-Vβ13.1 Antikörper nachgewiesen. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch einen APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper identifiziert. Als Kontrolle dienten nicht modifizierte (nt) T-Zellen oder Färbungen mit Antikörper gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Die mittlere Fluoreszenzintensität [MFI] der Rezeptor modifizierten T-Zellen war wie folgt: CD3ζ CAR #1044:15.846, CD28CD3ζ CAR #1046: 24.375, aff. CD3ζ CAR #1189: 4.308, aff. CD28CD3ζ CAR #1190: 10.610, endogener TCR: 914 und TCR #1178: 1.326.

4.2 Die rekombinanten Rezeptoren binden an das HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid

Um zu zeigen, dass die CARs und der TCR das NY-Eso-1 Antigen im HLA-A2 Kontext erkennen, wurde die Bindung der rekombinanten Rezeptoren an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ beladene HLA-A2 Multimere gemessen (Abbildung 5). Die Rezeptoren CD3ζ CAR #1044, CD28CD3ζ CAR #1046, aff. CD3ζ CAR #1189 oder der TCR #1178 wurden in T-Zellen retroviral transduziert und die Expression der Rezeptoren durchflusszyto-

metrisch nachgewiesen. Die CARs mit scFv Antikörper 3M4E5 (#1044, #1046) und scFv Antikörper FabT1 (#1189) sowie der TCR #1178 banden das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Multimer. CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen oder CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen zeigten eine höhere MFI als TCR #1178 modifizierte T-Zellen, was auf eine höhere NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Multimer Bindung seitens der CARs schließen lässt. Nicht modifizierte T-Zellen zeigten keine Bindung der Multimere.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass beide Rezeptorformate CAR und TCR das MHC I präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen binden.

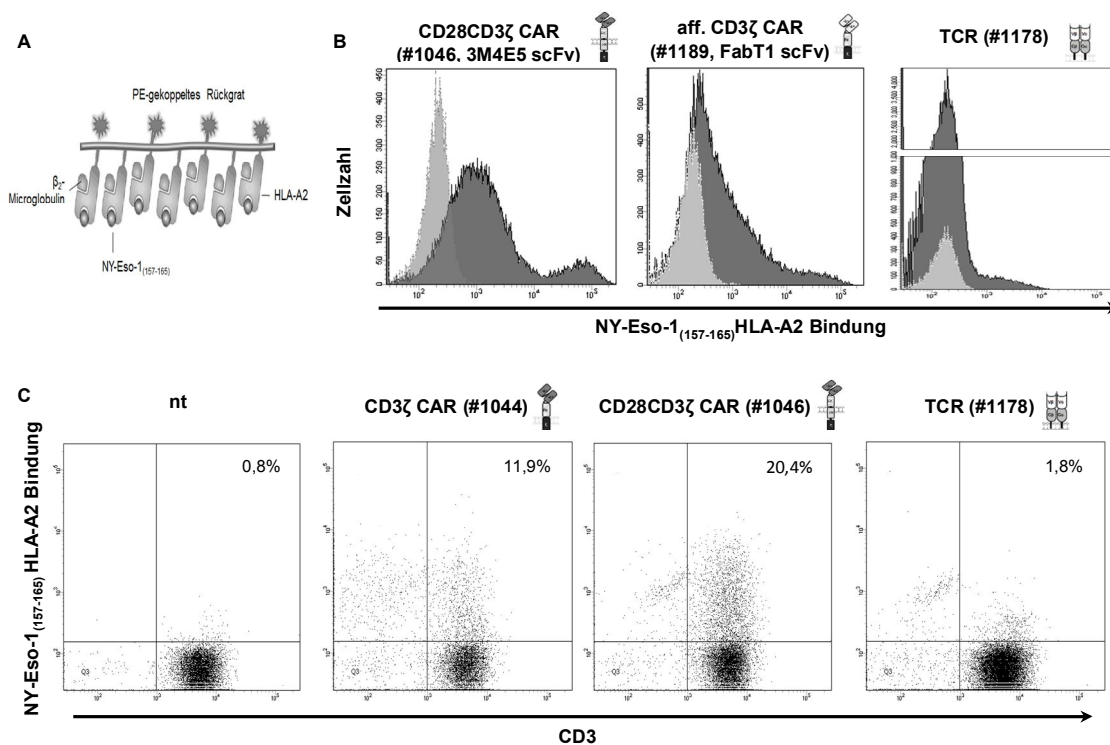


Abbildung 5 Die rekombinanten Rezeptoren binden an das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen im HLA-A2 Kontext. (A) Schematische Darstellung des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Multimer. Das Multimer besteht aus multiplen HLA-A2 Molekülen, die das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid präsentieren. Verbunden sind die MHC I Moleküle über ein PE-konjugiertes Rückgrat. (B) T-Zellen wurden mittels retroviralem Gentransfers mit den Rezeptoren CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189 oder dem TCR #1178 transduziert. Zum Nachweis der Bindung an HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ wurden die Zellen mit dem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ beladenen PE-gekoppelten Multimer inkubiert (dunkelgrau). Als Kontrolle dienten ungefärbte Rezeptor modifizierte T-Zellen (hellgrau). Die MFI der Multimer gebundenen Rezeptor modifizierten T-Zellen war: CD28CD3 ζ CAR #1046: 11.817, aff. CD3 ζ CAR #1189: 7.603, TCR #1178: 2.355. (C) Zum Nachweis der Bindung an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ im HLA-A2 Kontext mit gleicher Effektorzellzahl wurden 1 x 10⁵ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit dem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ beladenen PE-gekoppelten Multimer 60 h inkubiert. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch einen APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper identifiziert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte (nt) T-Zellen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Die MFI der Multimer gebundenen Rezeptor modifizierten T-Zellen war: nt: 237, CD3 ζ CAR #1044: 1192, CD28CD3 ζ CAR #1046: 1151, TCR #1178: 319.

4.3 Die rekombinanten Rezeptoren vermitteln eine Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zelle

In 4.2 wurde gezeigt, dass die Rezeptor modifizierten T-Zellen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Multimere binden. Im Folgenden wurde untersucht, ob die CAR und TCR modifizierten T-Zellen spezifisch durch die Bindung der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Multimere aktiviert werden. Dazu wurden anti-NY-Eso-1 CAR #1044, #1046 modifizierte T-Zellen sowie anti-NY-Eso-1 TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ beladenen HLA-A2 Multimeren inkubiert. Die IFN- γ Freisetzung dient als ein Indikator für die Rezeptor vermittelte T-Zell Aktivierung (Abbildung 6). Als Kontrolle diente die Inkubation unmodifizierter T-Zellen mit dem Multimer. Es zeigte sich eine erhöhte IFN- γ Ausschüttung der T-Zellen mit CAR #1044, #1046 und der T-Zellen mit TCR #1178 im Vergleich zu unmodifizierten T-Zellen. Der CD28CD3 ζ CAR #1046 mit der kostimulatorischen CD28 Domäne wies eine höhere IFN- γ Sekretion auf als die T-Zellen mit dem CD3 ζ CAR #1044 oder dem TCR #1178. Unmodifizierte T-Zellen zeigten keine erhöhte IFN- γ Freisetzung. Wir schließen daraus, dass die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen sowie TCR #1178 T-Zellen spezifisch durch HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen aktiviert wurden. Die T-Zell Aktivierung wurde durch die kostimulatorische Domäne CD28 im CAR #1046 verstärkt.

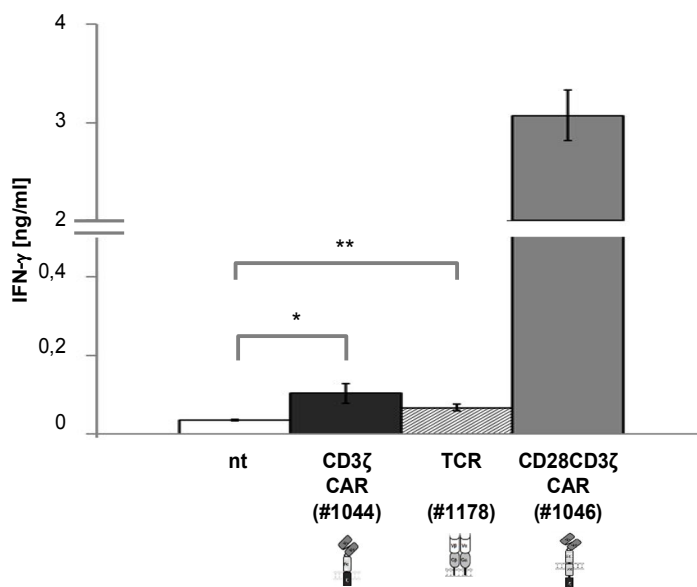


Abbildung 6 Die rekombinanten Rezeptoren vermitteln eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zelle. Die anti-NY-Eso-1 CARs #1044 und #1046 sowie der TCR #1178 wurden in T-Zellen exprimiert. Pro Vertiefung wurden $2,5 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit Multimer-Bead-Komplexen 48 h inkubiert. Als Vergleich dienten unmodifizierte T-Zellen (nt). Die Multimer-Bead-Komplexe wurden durch Inkubation der PE-gekoppelten Multimere mit anti-PE MicroBeads gewonnen. Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Vierfachbestimmungen \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Sekretion wurden mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^* < 0,002$ und $p^{**} \leq 0,0004$ bestimmt.

4.4 Der CD3 ζ CAR und der TCR vermitteln eine spezifische NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Antigen-abhängige zytotoxische T-Zell Aktivierung

Es wurde geprüft, ob CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen durch Bindung an HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ auf Tumorzellen für eine zytotoxische Wirkung aktiviert werden. Dazu wurden Rezeptor modifizierte T-Zellen mit Tumorzellen kokultiviert. Als Kontrolle diente die Kokultivierung mit unmodifizierten T-Zellen. Die Zielzellen wurden hinsichtlich ihrer NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expression untersucht. Die T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen zeigten eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression, die SK-MEL-37 Zelllinie wies eine geringe NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression auf (Abbildung 7A). Die T2 Zellen zeigten keine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression und dienten als Kontrolle. Die T-Zell Aktivierung wurde anhand der IFN- γ Freisetzung und die Zytotoxizität mittels XTT-basierendem Viabilitätstest bestimmt (Abbildung 7B). Die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und die TCR #1178 T-Zellen zeigten eine gesteigerte IFN- γ Sekretion nach Inkubation mit den NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ positiven T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen verglichen mit unmodifizierten T-Zellen. Die IFN- γ Sekretion der CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen war bei den NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ exprimierenden Zielzellen T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 geringer als die IFN- γ Sekretion der TCR #1178 T-Zellen bei gleicher Anzahl Rezeptor modifizierter Zellen. Bei der Koinkubation mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ negativen T2 Zellen wurde kein Anstieg der IFN- γ Sekretion gemessen. Die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und die TCR #1178 T-Zellen zeigten keine gesteigerte IFN- γ Sekretion nach Inkubation mit den SK-MEL-37 Zellen gegenüber unmodifizierten T-Zellen.

Die CD3 ζ CAR #1044 und TCR #1178 transduzierten T-Zellen zeigten eine höhere Zytotoxizität gegenüber den NY-Eso-1 positiven T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen im Vergleich zu der NY-Eso-1 negativen T2 Zelllinie. Die zytotoxische Aktivität der Rezeptor modifizierten T-Zellen war geringer gegenüber den SK-MEL-37 Zellen mit niedriger NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expression.

Es wurde gezeigt, dass CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen eine T-Zell Aktivierung bei Koinkubation mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 positiven Zellen induzieren und eine zytotoxische Wirkung auf die NY-Eso-1 positiven Zielzellen hatten. Die T-Zell Aktivierung bei Kokultivierung mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 positiven Zellen T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 durch den TCR #1178 induzierte eine höhere IFN- γ Freisetzung als die durch den CD3 ζ CAR #1044.

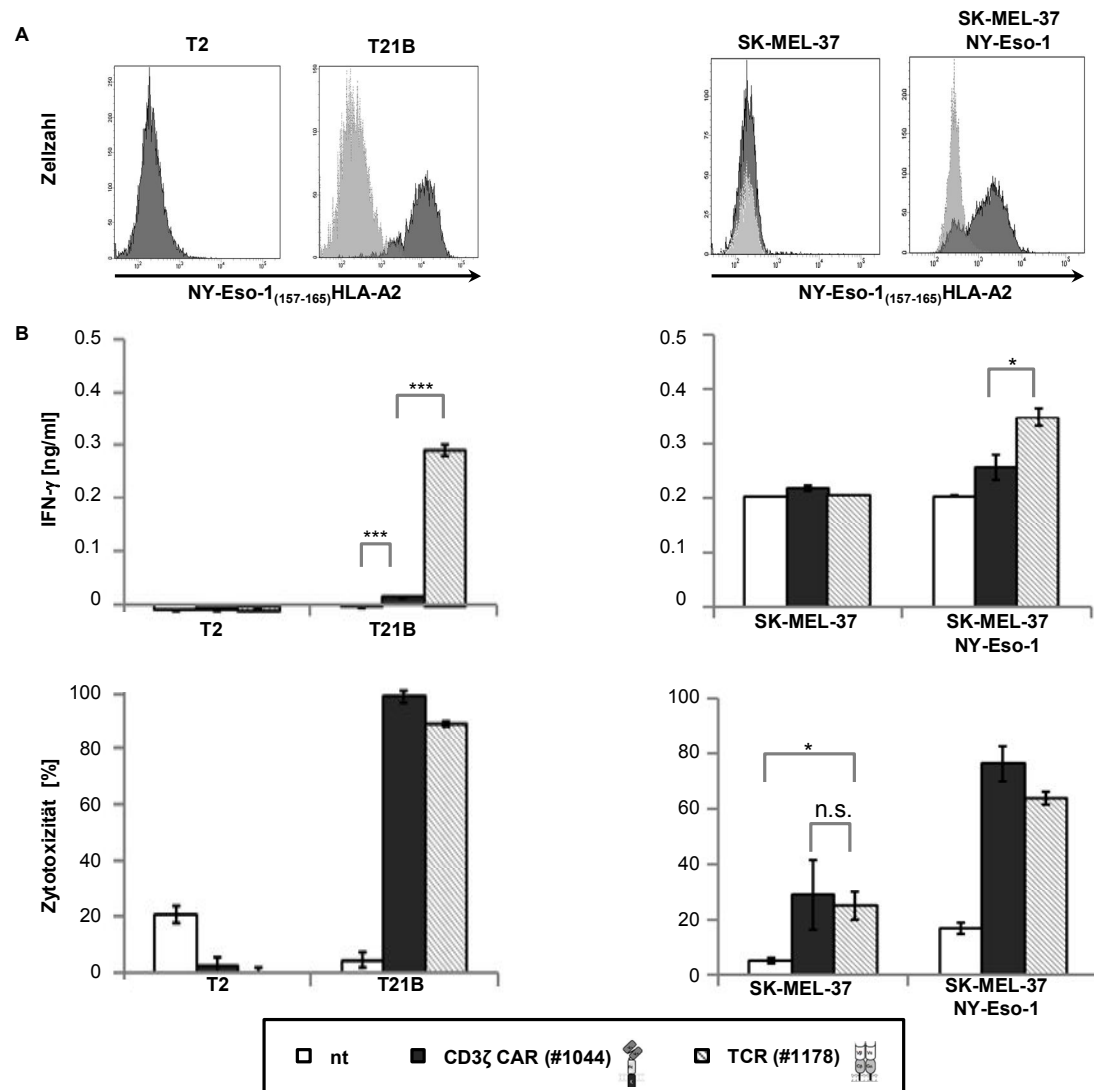


Abbildung 7 Der CD3 ζ CAR und der TCR vermitteln eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung. (A) Die Expression der HLA-A2 präsentierten NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Moleküle auf den Zielzellen wurde bestimmt. Dazu wurden die Lymphoma Zelllinien T2 und ihr Derivat T21B sowie die Melanom Zellen SK-MEL-37 und ihre Transfektante SK-MEL-37 NY-Eso-1 mit dem anti-HLA-A2-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antikörper inkubiert. Es folgte die Färbung mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper (dunkelgrau). Zur Kontrolle wurden die T21B Zellen mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper gefärbt und die SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen mit dem irrelevanten anti-CD20 #1369 Antikörper inkubiert und mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper nachgewiesen (hellgrau). (B) Der CD3 ζ CAR #1044 und der TCR #1178 wurden in T-Zellen exprimiert und pro Vertiefung $1,25 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ T2, T21B, SK-MEL-37 oder SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen 48 h kokultiviert. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Es wurde die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung eingesetzt. Die NY-Eso-1 negativen T2 Zellen dienten als Kontrolle. Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt und die Zellviabilität wurde durch XTT-basierten Viabilitätstest bestimmt und die Zytotoxizität errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der Vergleiche wurden mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test bestimmt mit $p^* \leq 0,005$; $p^{**} \leq 0,0005$; $p^{***} \leq 0,00005$ und n.s. nicht signifikant. Die Daten sind repräsentativ für mehr als 3 unabhängige Tests.

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, dass die Bindung und T-Zell Aktivierung der CAR und TCR modifizierten T-Zellen spezifisch durch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid

ausgelöst wurden. Dafür wurden die Zielzellen T21B und T21C verwendet, die jeweils unterschiedliche NY-Eso-1 Sequenzen präsentieren (Abbildung 8A). Die T21B Zellen präsentieren das NY-Eso-1 [9mer]₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid und die T21C Zellen das NY-Eso-1 [9mer]₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid. Die T2 Zellen exprimieren das HLA-A2 MHC I Molekül ohne Präsentation des NY-Eso-1 Peptid und dienen als Kontrolle. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die T21B Zellen HLA-A2 präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ exprimierten (Abbildung 8B). Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers spezifisch für HLA-A2 präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid. Die NY-Eso-1₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid positiven T21C Zellen sowie die NY-Eso-1 negativen T2 Kontrollzellen zeigten kein Signal.

Für den Nachweis der spezifischen T-Zell Aktivierung wurden T-Zellen mit dem anti-NY-Eso-1 CD3 ζ CAR #1044 oder dem anti-NY-Eso-1 TCR #1178 transduziert. Es folgte eine Kokultivierung der Rezeptor modifizierten T-Zellen mit den Zielzellen T21B, T21C oder T2. Als Kontrolle dienten unmodifizierte T-Zellen. Die Rezeptor modifizierten T-Zellen zeigten eine erhöhte IFN- γ Sekretion sowie eine zytotoxische Wirkung nach Koinkubation mit T21B Zellen (Abbildung 8C und D). Es wurde keine IFN- γ Freisetzung der Rezeptor modifizierten T-Zellen bei Kokultivierung mit den T21C oder den NY-Eso-1 T2 Zellen induziert. Ebenfalls zeigte sich keine zytolytische Aktivität der Rezeptor modifizierten T-Zellen gegenüber den T21C Zellen. Die IFN- γ Sekretion der TCR #1178 modifizierten T-Zellen erfolgte bei einer geringeren Effektorzellzahl als die IFN- γ Freisetzung der CD3 ζ CAR #1044 transduzierten T-Zellen. TCR #1178 modifizierte T-Zellen wiesen verglichen mit CAR #1044 modifizierten T-Zellen eine höhere IFN- γ Konzentration auf. Nicht-modifizierte T-Zellen zeigten keine IFN- γ Freisetzung. Die maximale zytolytische Aktivität war bei den CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und bei TCR #1178 modifizierten T-Zellen gleich. Der TCR #1178 benötigte allerdings eine geringere Effektorzellzahl als der CD3 ζ CAR #1044 zur Induktion der maximalen zytotoxischen Wirkung.

Es wurde gezeigt, dass CAR #1044 und TCR #1178 modifizierte T-Zellen eine T-Zell Aktivierung nach Bindung an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 von Zielzellen (T21B) in Abhängigkeit der Zellzahl induzierten. Die Aktivierung ist Antigen-spezifisch, da keine T-Zell Aktivierung bei einer irrelevanten NY-Eso-1 Peptidsequenz (T21C) erfolgte. Es wurde bei einer geringeren Anzahl TCR #1178 T-Zellen eine IFN- γ Sekretion und maximale zytotoxische Wirkung induziert als durch CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Daraus schließen wir, dass die T-Zell Aktivierung durch den TCR #1178 effizienter ist als durch den CD3 ζ CAR #1044.

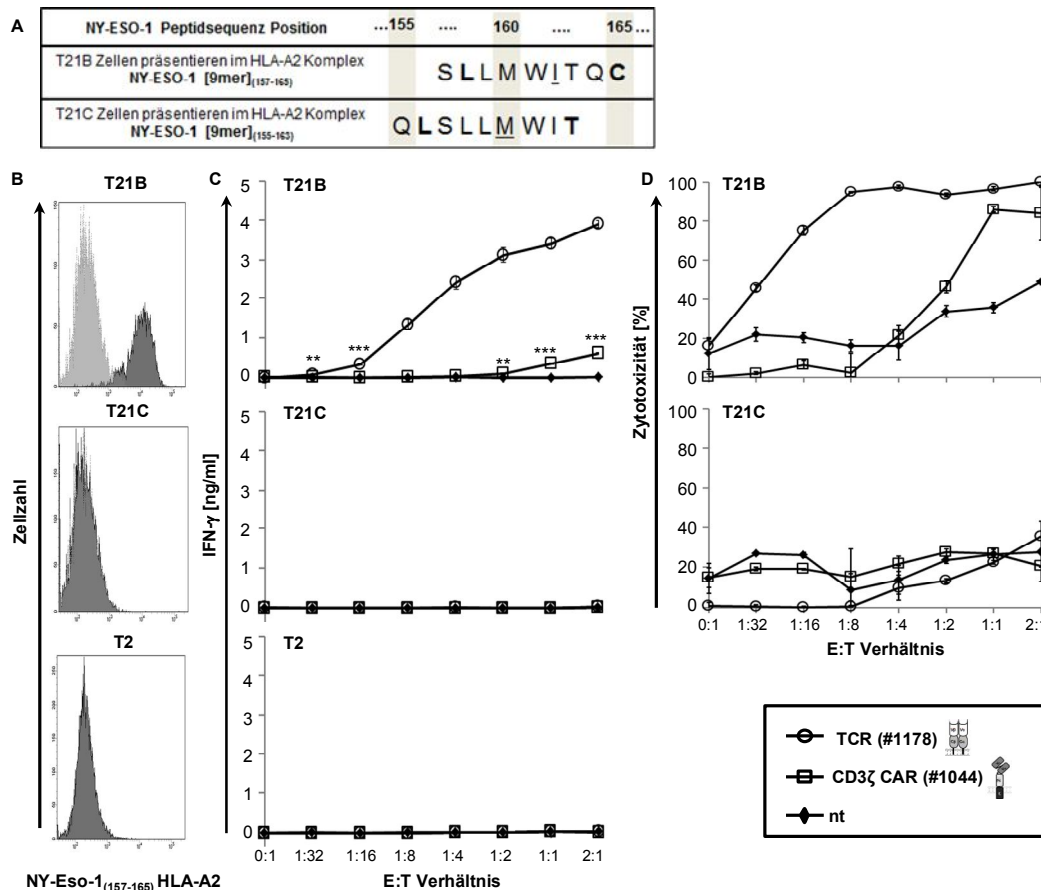


Abbildung 8 Die CD3ζ CAR und TCR vermittelte T-Zell Aktivierung ist spezifisch für HLA-A2 präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid. (A) Es wurden die Zelllinien T21B und T21C mit Präsentation unterschiedlicher NY-Eso-1 Peptide eingesetzt. Die T21B Zellen präsentieren das NY-Eso-1 [9mer]₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid und die T21C Zellen das NY-Eso-1 [9mer]₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid im HLA-A2 Kontext. Als Kontrolle dienten die T2 Zellen, die das HLA-A2 ohne NY-Eso-1 Peptid exprimieren. (B) Zum Nachweis der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression auf Zelllinien wurden T21B, T21C und T2 Zellen mit dem anti-HLA-A2-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Inkubation folgte die Färbung mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper (dunkelgrau). Zur Kontrolle wurden die T21B und T21C Zellen mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper gefärbt (hellgrau). Um die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Antigen-spezifische T-Zell Aktivierung zu zeigen, wurden pro Vertiefung 5×10^4 Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ Zielzellen T21B, T21C oder T2 48 h kokultiviert. Die transduzierten CAR #1044 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung eingestellt. CAR #1044 und TCR #1178 modifizierte T-Zellen wurden im Verhältnis von 2:1 bis 1:32 verdünnt. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Das E:T Verhältnis 0:1 repräsentiert $2,5 \times 10^4$ Zielzellen ohne T-Zellen. Es wurde (C) die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt und (D) die Zellviabilität wurde mittels XTT-basiertem Viabilitätstest ermittelt und die Zytotoxizität errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Sekretion wurden mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p \leq 0,005$; $p^{**} \leq 0,0005$ und $p^{***} \leq 0,00005$ bestimmt. Im T-Test wurden die Rezeptor modifizierten T-Zellen gegen die unmodifizierten T-Zellen (nt) verglichen. Die Daten sind repräsentativ für mehr als 3 unabhängige Tests.

4.5 Die B7–CD28 Kostimulation erhöht die CD3 ζ und TCR vermittelte T-Zell Aktivierung

Der TCR erfährt durch Bindung des CD28 Korezeptors an den B7 Rezeptor eine Verstärkung der T-Zell Antwort. Um den Einfluss der CD28 Kostimulation auf die T-Zell Aktivierung durch die rekombinanten Rezeptoren CD3 ζ CAR #1044 und TCR #1178 zu untersuchen, wurden Zielzellen verwendet, welche die kostimulatorischen Rezeptoren B7.1 und B7.2 exprimieren, sowie Zellen, die keine Expression der B7 Moleküle aufweisen. Zum Nachweis der B7 Rezeptoren wurden die Zielzellen SK-MEL-37, SK-MEL-37 NY-Eso-1 sowie T2 und T21B mit dem anti-B7.1 Antikörper oder dem anti-B7.2 Antikörper inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte die B7.1 und B7.2 Expression auf T2 und T21B Zellen, aber keine B7.1 oder B7.2 Expression auf den Melanom Zellen SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 (Abbildung 9).

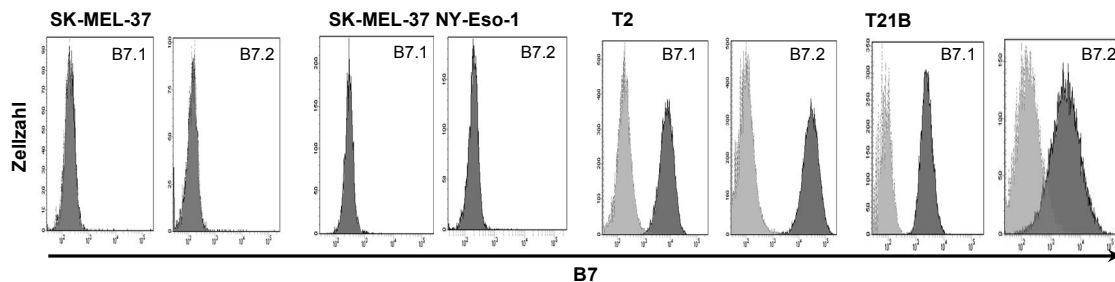


Abbildung 9 Expression der B7 Rezeptoren auf Zielzellen. Zum Nachweis der B7.1 und B7.2 Korezeptor Expression auf Tumorzellen wurden SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen sowie T21B und T2 Zellen mit dem FITC-gekoppelten anti-CD80 (B7.1) Antikörper oder dem PE-gekoppelten anti-CD86 (B7.2) Antikörper inkubiert (dunkelgrau). Die Kontrollen mit Antikörpern gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität wurden bei den SK-MEL-37, SK-MEL-37 NY-Eso-1 sowie den T2 Zellen jeweils mitgeführt (hellgrau). Bei T21B Zellen dienten ungefärbte T21B als Kontrolle (hellgrau). Die Antikörper Färbung wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Bestimmung des Einflusses des endogenen CD28 auf die T-Zell Aktivierung standen die NY-Eso-1 positiven Zielzellen SK-MEL-37 NY-Eso-1 und T21B zur Verfügung (Abbildung 7). Diese unterschiedliche B7 Rezeptor Expression der Zielzellen SK-MEL-37 NY-Eso-1 und T21B ermöglichte die Untersuchung der anti-NY-Eso-1 Rezeptoren an Zielzellen, die ein CD28 kostimulatorisches Signal bei T-Zellen induzieren (B7⁺ Zellen) oder Zielzellen, die keine CD28 T-Zell Kostimulation hervorrufen (B7⁻ Zellen). Für den Vergleich wurden CD3 ζ CAR #1044 oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B oder NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen kokultiviert (Abbildung 10). Als Kontrolle wurden die Tumorzelllinien NY-Eso-1⁻B7⁺ T2 und die NY-Eso-1^{low}B7⁻ SK-MEL-37 eingesetzt. Des Weiteren dienten unmodifizierte T-Zellen als Kontrolle. Die T-Zellen mit TCR #1178 zeigten nach Inkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zielzellen eine höhere IFN- γ Freisetzung und eine

höhere zytotoxische Aktivität als nach Inkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen. Die maximale Zytotoxizität der TCR #1178 modifizierten T-Zellen gegenüber den NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zellen war ab einem E:T Verhältnis von 1:16 erreicht, die TCR #1178 vermittelte IFN- γ Freisetzung wurde ab einem E:T Verhältnis von 1:32 nachgewiesen. TCR #1178 T-Zellen benötigten bei der Inkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zellen eine geringere Zellzahl zur Induktion einer T-Zell Antwort als bei der Inkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen.

Bei CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen war zur IFN- γ Freisetzung ebenfalls eine geringere Zellzahl bei Koinkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zielzellen notwendig als mit NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen. Die zytotoxische Wirkung der CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen gegenüber NY-Eso-1⁺ Zielzellen T21B oder SK-MEL-37 NY-Eso-1 wurde ab einem E:T Verhältnis von 1:2 gemessen. Diese CD3 ζ CAR #1044 vermittelte Aktivierung der Zytolyse war stärker bei den NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zellen als bei den NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen.

Die Koinkubation der Rezeptor modifizierten T-Zellen mit NY-Eso-1⁻B7⁺ T2 Zellen und NY-Eso-1^{low}B7⁻ SK-MEL-37 zeigte keine Steigerung der IFN- γ Sekretion im Vergleich zu unmodifizierten T-Zellen. Wir schließen daraus, dass die Rezeptor vermittelte T-Zell Aktivierung spezifisch durch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid erfolgt.

Durch Koinkubation mit NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zellen wurde eine höhere T-Zell Aktivierung durch TCR #1178 modifizierte T-Zellen als durch CD3 ζ CAR #1044 modifizierte T-Zellen induziert. Die zytotoxische Wirkung der TCR #1178 T-Zellen gegenüber NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zielzellen war maximal ab einem Effektor-Zielzell Verhältnis von 1:16. Die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen übten bei den vorliegenden Effektor-Zielzell (E:T) Verhältnissen keine maximale zytotoxische Wirkung auf die NY-Eso-1⁺B7⁺ Zielzellen aus. Die CD28-B7 vermittelte Aktivierung zur Zytolyse war bei TCR #1178 T-Zellen höher als bei CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen. TCR #1178 T-Zellen benötigten eine geringere Effektorzellzahl als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen zur Induktion der gleichen IFN- γ Sekretion sowohl bei NY-Eso-1⁺B7⁺ T21B Zellen als auch bei NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen. Der Vergleich zeigte, dass TCR #1178 modifizierte T-Zellen eine bessere T-Zell Aktivierung induzieren und eine effizientere zytotoxische Wirkung auf die NY-Eso-1⁺ Zielzellen T21B und SK-MEL-37 NY-Eso-1 haben als die CD3 ζ CAR #1044 transduzierten T-Zellen.

Diese Untersuchung belegte, dass die B7-CD28 Kostimulation einen Einfluss auf TCR #1178 T-Zellen hatte, aber einen geringeren auf CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen.

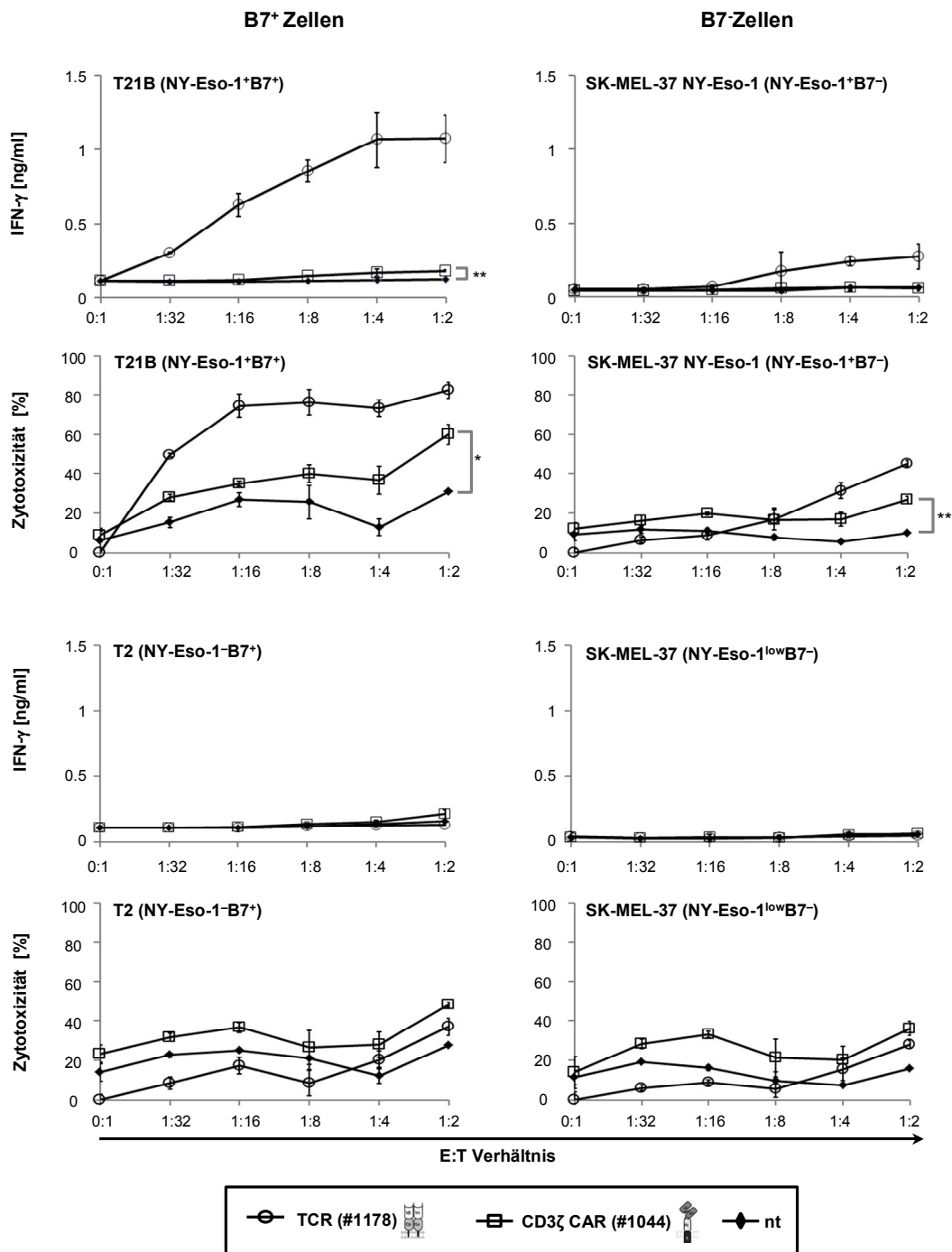


Abbildung 10 Der Einfluss der Kostimulation auf die CD3ζ CAR oder TCR vermittelte T-Zell Aktivierung. Der CD3ζ CAR #1044 und der TCR #1178 wurden in T-Zellen exprimiert und pro Vertiefung $1,25 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ Zielzellen SK-MEL-37 (NY-Eso-1^{low}B7⁻) oder SK-MEL-37 NY-Eso-1 (NY-Eso-1⁺B7⁻), T2 (NY-Eso-1⁻B7⁺) oder T21B (NY-Eso-1⁺B7⁺) 48 h kokultiviert. Die transduzierten CD3ζ CAR #1044 und TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung eingestellt. Effektorzell zu Zielzell Verhältnisse (E:T Verhältnis) von 1:2 bis 1:32 wurden getestet. Das E:T Verhältnis 0:1 repräsentiert $2,5 \times 10^4$ Zielzellen ohne T-Zellen und zeigte die Aktivität der Zielzellen an. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Die NY-Eso-1⁻B7⁺ T2 Zellen und die NY-Eso-1^{low}B7⁻ SK-MEL-37 Zellen dienten zum Vergleich. Es wurde die IFN-γ Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Zellviabilität wurde durch XTT-basierten Viabilitätstest bestimmt und die Zytotoxizität errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der Vergleiche wurden mittels ungepartem zweiseitigem T-Test mit $p^* \leq 0,002$ und $p^{**} \leq 0,0002$ bestimmt. Der T-Test verglich CD3ζ CAR #1044 modifizierte T-Zellen gegen unmodifizierte (nt) T-Zellen.

4.6 Die Tumorzelleliminierung ist effektiver durch T-Zellen mit rekombinanten TCR als durch CD3 ζ CAR T-Zellen

Um die rekombinanten Rezeptoren TCR #1178 und CD3 ζ CAR #1044 vergleichen zu können, wurden die Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt, die keine B7-CD28 Kostimulation induzierten. Dazu wurden SK-MEL-37 NY-Eso-1 NY-Eso-1⁺B7⁻ Tumorzellen verwendet. Über 90 % dieser SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen zeigten eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression auf der Oberfläche (Abbildung 11A) und die Zelllinie exprimiert keine B7 Moleküle (Abbildung 9). Der TCR #1178 und der CD3 ζ CAR #1044 wurden in T-Zellen exprimiert und mit den SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen kokultiviert (Abbildung 11B). Als Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen mitgeführt. Sowohl TCR #1178 T-Zellen als auch CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen zeigten eine zytotoxische Aktivität und T-Zell Aktivierung durch SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen. Ohne B7 Kostimulation wurden für die gleiche zytotoxische Wirkung mehr CAR T-Zellen benötigt als TCR modifizierte T-Zellen. Die zytotoxische Aktivität war bei TCR #1178 T-Zellen und bei CAR #1044 T-Zellen bei der höchsten Effektozellzahl gleich. TCR #1178 modifizierte T-Zellen wiesen eine höhere IFN- γ Konzentration auf als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Weniger TCR #1178 T-Zellen sezernierten die gleiche Menge IFN- γ wie CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Unmodifizierte T-Zellen wiesen keine erhöhte zytolytische Aktivität auf und zeigten keine Induktion der IFN- γ Sekretion.

Zur Testung einer langfristigen Tumorzelleliminierung wurden CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen zusammen mit diesen humanen Melanomzellen SK-MEL-37 NY-Eso-1 in immundefiziente Rag2^{-/-}c γ ^{-/-} Mäuse subkutan inokuliert (Abbildung 11C). Zum Vergleich wurden unmodifizierte T-Zellen mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 appliziert. Bei den Mäusen, die mit CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen inokuliert wurden, zeigte sich, dass bis Tag 40 das Tumorwachstum supprimiert wurde, während bei TCR #1178 T-Zellen die tumorfreie Zeit länger als 50 Tage betrug. Wir schließen daraus, dass TCR #1178 modifizierte T-Zellen eine primäre Tumorzelleliminierung effizienter induzierten als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Es fiel auf, dass unmodifizierte T-Zellen das Tumorwachstum förderten.

TCR #1178 T-Zellen ohne kostimulatorisches Signal induzierten eine höhere T-Zell Aktivierung und benötigten für die Tumorzelleliminierung weniger Effektorzellen als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Die effizientere primäre Tumorzelleliminierung zeigte sich sowohl in vitro (Abbildung 11B) als auch in Langzeit Inokulation in der Maus (Abbildung 11C).

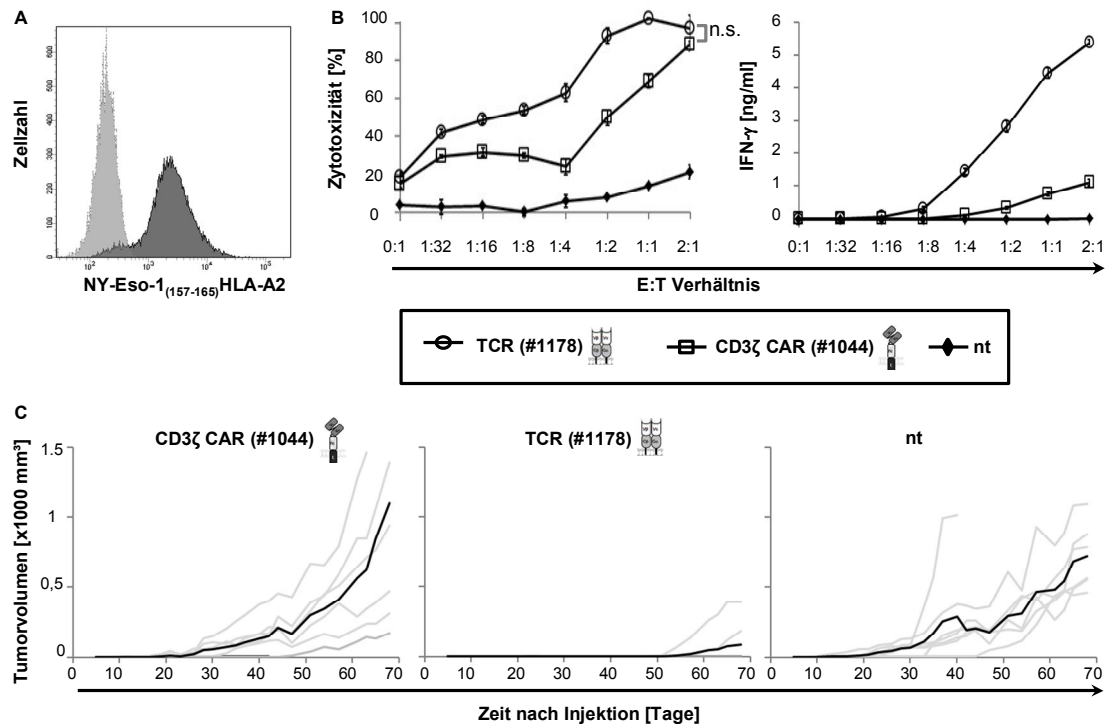


Abbildung 11 Die primäre Tumorzelleliminierung ist effizienter durch TCR #1178 T-Zellen als durch CD3ζ CAR #1044 T-Zellen. (A) Zum Nachweis der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression auf SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen wurden die Zellen mit dem anti-HLA-A2-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antikörper inkubiert. Dieser Inkubation folgte die Färbung mit PE-gekoppeltem anti-IgG1 Fab Antikörper (dunkelgrau). Zur Kontrolle wurden SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen mit dem PE-gekoppelten anti-IgG1 Fab Antikörper gefärbt (hellgrau). Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. (B) T-Zellen wurden zur Expression des CD3ζ CAR #1044 oder des TCR #1178 retroviral transduziert. Die Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden 3 Tage in Gegenwart von IL-2 (≤ 100 U/ml) kultiviert. Es wurden 5×10^4 Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen 48 h kokultiviert. Die CAR #1044 und TCR #1178 transduzierten T-Zellen wurden im Verhältnis von 2:1 bis 1:32 getestet. Das E:T Verhältnis 0:1 repräsentiert $2,5 \times 10^4$ Zielzellen ohne T-Zellen und zeigte die Aktivität der Zielzellen an. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Es wurde die IFN- γ Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Zellviabilität wurde durch XTT-basierten Viabilitätstest bestimmt und die Zytotoxizität errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. (C) Für den in vivo Test wurden in Rag2^{-/-}cγ^{-/-} Mäuse CD3ζ CAR #1044 T-Zellen und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen, TCR #1178 T-Zellen und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen oder unmodifizierte (nt) T-Zellen und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen subkutan koinjiziert (Tag 0). Jeder Maus wurden in die Flanke 2×10^6 SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen zusammen mit 2×10^6 CAR #1044 T-Zellen oder mit 2×10^6 TCR #1178 T-Zellen subkutan appliziert. Die Koinjektion der 2×10^6 Tumorzellen zusammen mit 2×10^7 nicht-modifizierten (nt) T-Zellen diente als Kontrolle. Die NY-Eso-1 Expression der verwendeten SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen ist unter (A) dargestellt. Die Gruppengröße betrug jeweils 7 Mäuse (Gender gemischt). Das Tumorzellwachstum wurde etwa alle 3 Tage gemessen. Die Diagramme zeigen die Größe der Tumore (hellgrau); die schwarze Linie stellt den Mittelwert aller Tumore der Gruppe dar.

4.7 Die CD28 Kostimulation im CAR hat Einfluss auf die Stärke der T-Zell Aktivierung

Es wurde untersucht, ob die kostimulatorische Domäne CD28 im CAR die T-Zell Aktivierung des CD3 ζ CAR verbessert. Um auszuschließen, dass eine Kostimulation über den endogenen CD28 Rezeptor durch Bindung an B7 Moleküle induziert wird, wurden für die Untersuchung die B7 negativen Zellen SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 verwendet (Abbildung 9). Für den Vergleich wurden T-Zellen mit den anti-NY-Eso-1 Konstrukten CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 retroviral transduziert.

Für den Testansatz wurden CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1⁺B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen kokultiviert (Abbildung 12). Als Kontrolle wurden die NY-Eso-1^{low}B7⁻ SK-MEL-37 Zellen eingesetzt. Des Weiteren dienten unmodifizierte T-Zellen als Vergleich. Der #1046 CAR mit integrierter CD28 kostimulatorischer Domäne induzierte in T-Zellen eine höhere IFN- γ Freisetzung bei Kokultivierung mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen als T-Zellen mit CD3 ζ CAR #1044. T-Zellen mit CD28CD3 ζ CAR #1046 benötigten weniger CAR T-Zellen zur Induktion der IFN- γ Sekretion als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Auch zeigten CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen eine stärkere zytotoxische Wirkung als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Das zytotoxische Maximum erreichten CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen bei der Koinkubation mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen bei einer niedrigeren CAR T-Zellzahl als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen.

T-Zellen mit kostimulatorischem CD28CD3 ζ CAR #1046 zeigten eine ähnliche zytolytische Effektivität gegenüber SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen wie T-Zellen mit TCR #1178. Bei der T-Zell Aktivierung durch die SK-MEL-37 NY-Eso-1 Tumorzellen zeigte sich, dass TCR #1178 T-Zellen mehr IFN- γ in den Überstand sezernierten als CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen. Die Koinkubation mit NY-Eso-1^{low}B7⁻ SK-MEL-37 Zellen zeigte, dass bei CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen eine INF- γ Sekretion induziert wurde; CD3 ζ CAR #1044 oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen setzten kein INF- γ frei. Die Zytotoxizität der CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen gegenüber NY-Eso-1^{low} B7⁻ SK-MEL-37 Zellen war ab einem E:T Verhältnis von 1:1 höher als bei TCR #1178 oder CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen. Die unmodifizierten T-Zellen wiesen keine T-Zell Aktivierung auf und hatten keine zytotoxische Wirkung auf die Zielzellen SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1.

Die Integration der CD28 kostimulatorischen Domäne in den CAR (CAR #1046 T-Zellen) verändert die T-Zell Aktivierung des CAR, wobei bei einer niedrigeren CAR T-Zellzahl eine IFN- γ Freisetzung induziert wurde und höhere IFN- γ Konzentrationen erreicht wurden als bei CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen zeigten eine T-Zell Aktivierung bei NY-Eso-1^{low} SK-MEL-37 Zellen.

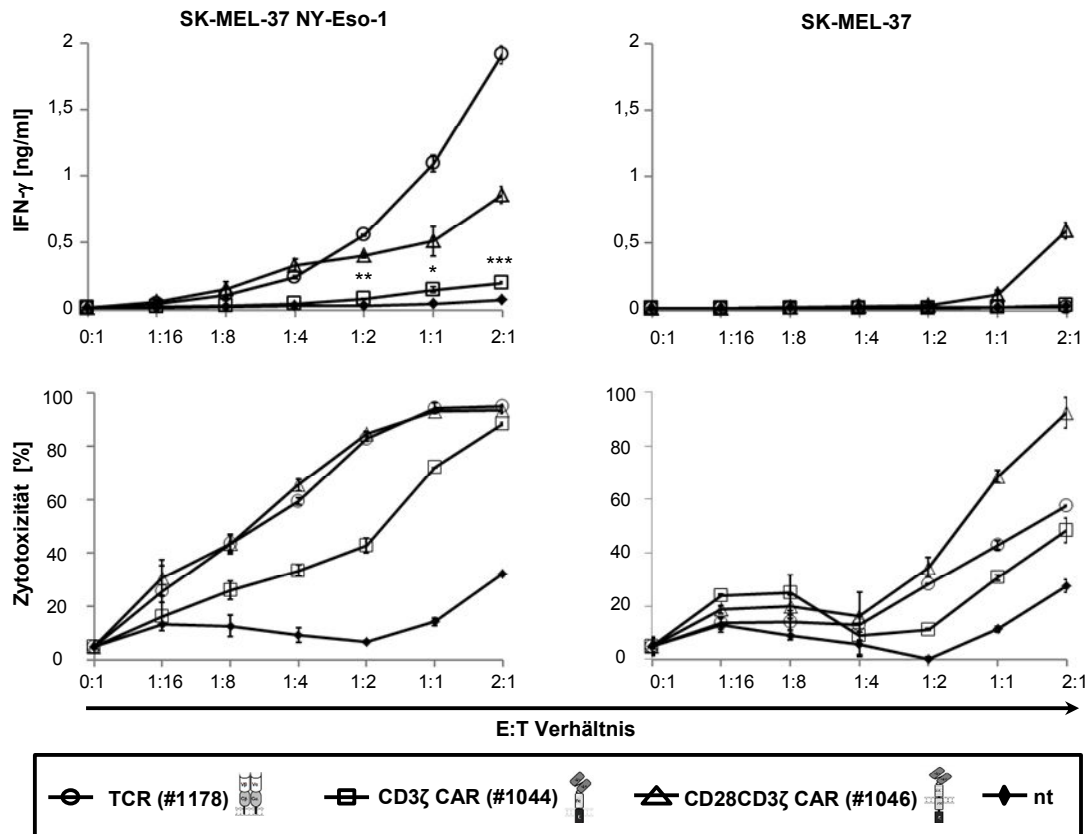


Abbildung 12 Die CD28 Kostimulation im CAR hat Einfluss auf die Stärke der T-Zell Aktivierung. Die Rezeptorkonstrukte CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 wurden retroviral in T-Zellen transduziert. Es wurden 5×10^4 Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ SK-MEL-37 NY-Eso-1 (72 % NY-Eso-1⁺) oder SK-MEL-37 Zielzellen 48 h kokultiviert. Die transduzierten CAR #1044 und #1046 T-Zellen sowie TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung eingestellt. Die CAR #1044, CAR #1046 und TCR #1178 modifizierten T-Zellen wurden im Verhältnis von 2:1 bis 1:16 getestet. Das E:T Verhältnis 0:1 repräsentiert $2,5 \times 10^4$ Zielzellen ohne T-Zellen und zeigte die Aktivität der Zielzellen an. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Die IFN- γ Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Die Zellviabilität wurde durch den XTT-basierten Viabilitätstest bestimmt und die Zytotoxizität errechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Konzentration wurden mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test bestimmt $p^* \leq 0,002$; $p^{**} \leq 0,0002$; $p^{***} \leq 0,00002$. Im T-Test wurden die CD3 ζ T-Zellen gegen unmodifizierte (nt) T-Zellen verglichen.

Es wurde gezeigt, dass unter diesen experimentellen Bedingungen die CD28 Domäne im CAR (CAR #1046 T-Zellen) die zytotoxische Wirkung auf SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen auf das Niveau der TCR #1178 T-Zellen hebt. Die TCR #1178 T-Zellen ohne kostimulatorisches Signal zeigten eine höhere IFN- γ Freisetzung als CD28CD3 ζ CAR

#1046 T-Zellen mit integrierter CD28 kostimulatorischer Domäne. Das lässt darauf schließen, dass die T-Zelle eine deutlich stärkere Aktivierung durch den TCR #1178 erfährt als durch den CD28CD3 ζ CAR #1046 oder den CD3 ζ CAR #1044.

4.8 Die Persistenz der CD28CD3 ζ CAR T-Zellen in vivo ist höher als die der TCR T-Zellen

Die Langzeitwirkung der rekombinanten Rezeptoren CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 auf T-Zellen wurde anhand der T-Zell Persistenz in vivo in Gegenwart des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptids untersucht. Dazu wurden immundefizienten HLA-A2⁺ NOD-SCID Mäusen intraperitoneal CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen injiziert. Etwa 60 % der Mäuse, denen CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen injiziert wurden, erhielten zusätzlich NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid intraperitoneal. Die Mäuse, denen nur CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen injiziert wurden, dienten als Kontrollgruppen. Nach 30 Tagen erhielten die Mäuse, denen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid intraperitoneal injiziert worden war, eine erneute NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid intravenöse Injektion. Am Tag 31 wurde peripheres Blut von jeder Maus gewonnen. Die aus dem Blut isolierten Lymphozyten wurden nach humanem CD3 gefärbt (Abbildung 13A) und nach den Rezeptor modifizierten T-Zellen (Abbildung 13B). Die Seren wurden für spätere Analysen verwendet (siehe siehe 4.9). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden ≤ 1 % humane T-Zellen in den Lymphozytenproben der Mäuse mit TCR #1178 T-Zellen nachgewiesen, unabhängig davon ob die Mäuse eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Injektion erhielten oder nicht. Bei den Mäusen, denen CAR #1046 T-Zellen und NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid injiziert worden waren, wurden im Mittel 25 % humane T-Zellen nachgewiesen; bei den Mäusen, denen CAR #1046 T-Zellen ohne NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid injiziert worden waren, wurden im Mittel 22 % humane T-Zellen nachgewiesen. Der humane T-Zell Anteil in den Gruppen mit CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen mit und ohne NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid war gleich.

Der V β 13.1 TCR T-Zell Anteil an der gesamten T-Zellpopulation in der Gruppe mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid wies 49 % auf, während er in der Gruppe ohne NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid einen V β 13.1 TCR T-Zell Anteil von 28 % zeigte. Wir nehmen an, dass ca. 20 % der T-Zellen den transgenen TCR tragen. Des Weiteren trugen über 90 % der humanen T-Zellen den CAR sowohl in der Gruppe mit als auch ohne NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid.

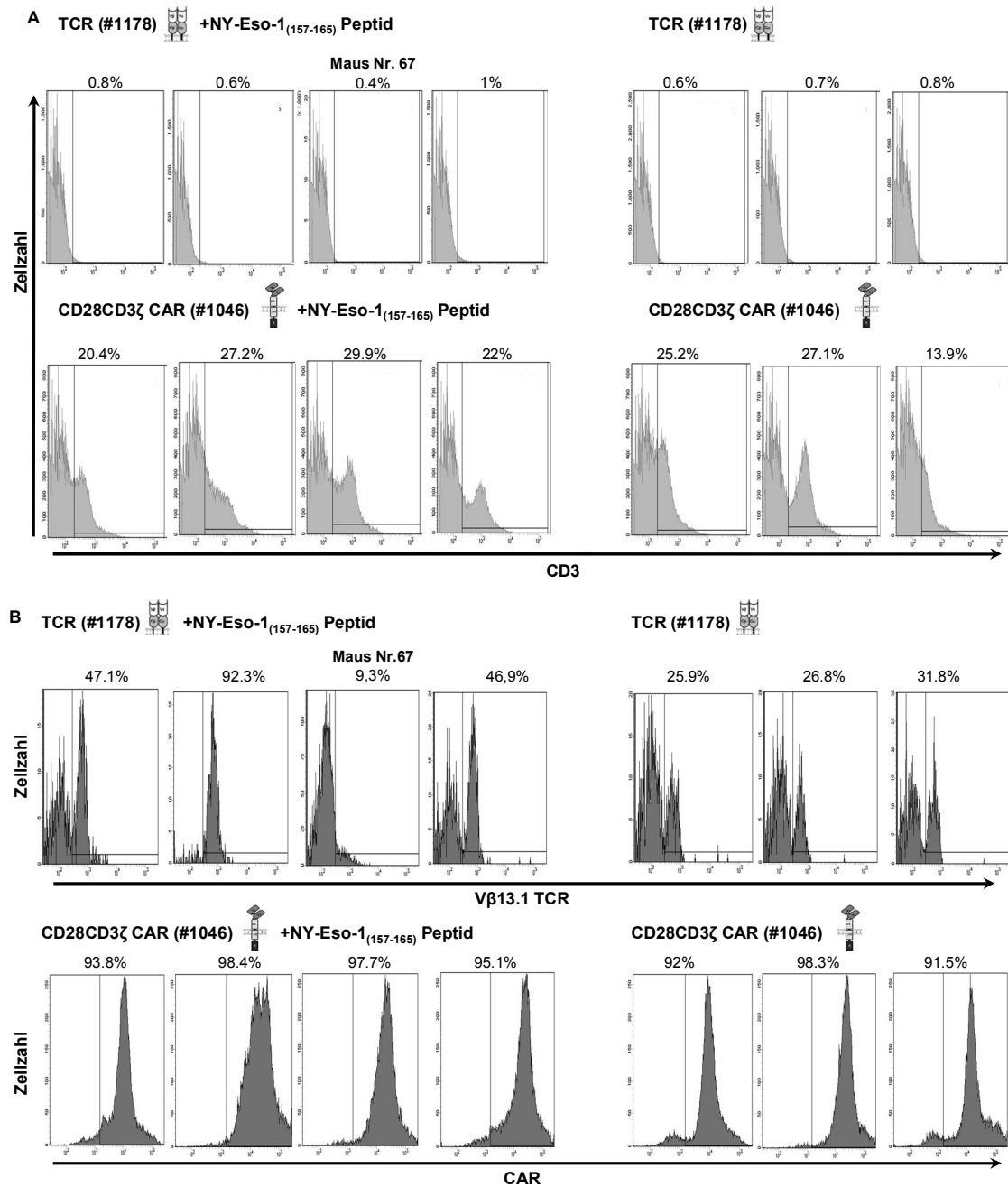


Abbildung 13 Die *in vivo* Persistenz der CD28CD3ζ CAR T-Zellen ist höher als die der TCR modifizierten T-Zellen. Der CD28CD3ζ CAR #1046 oder der TCR #1178 wurde in T-Zellen exprimiert. Jeweils 7 HLA-A2⁺ NOD-SCID Mäuse erhielten pro Maus 5×10^6 T-Zellen mit $6,5 \times 10^5$ CD28CD3ζ CAR #1046 modifizierten T-Zellen oder pro Maus 5×10^6 T-Zellen mit $6,5 \times 10^5$ TCR #1178 modifizierten T-Zellen. Die Applikation der T-Zellen erfolgte intraperitoneal (i.p.). In jeder Gruppe wurde 4 Mäusen 500 µg NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid intraperitoneal injiziert (Tag 0). Der Maus 67 wurde 300 µg NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid verabreicht. Als Kontrolle dienen die Mausgruppen, welche nur TCR #1178 oder nur CAR #1046 modifizierte T-Zellen appliziert bekamen. Am Tag 30 erhielten die Mäuse, denen bereits NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid appliziert worden war, 100 µg NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid intravenös (i.v.). Am Tag 31 wurde peripheres Blut der Mäuse gewonnen. Ausnahme bildete die tote Maus 67, hier wurde Blut aus der Herzregion isoliert. Die Seren der Blutproben wurden gewonnen (siehe 4.9) und nach Erythrozytenlyse wurden die isolierten Zellen gefärbt. Zum Nachweis der humanen T-Zellen aus den Mäuseblutzellen wurden die Proben mit APC-gekoppeltem anti-CD3 Antikörper inkubiert. Zum Nachweis des CD28CD3ζ CAR #1046 wurden die Zellen mit dem PE-konjugierten anti-IgG Fab Antikörper gefärbt. Der TCR #1178 wurde durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-Vβ13.1 Antikörper nachgewiesen. Der PE-konjugierte anti-Vβ13.1 Antikörper wies auch den endogenen

Vβ13.1 TCR nach. Die Analyse der humanen T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. (A) Die Histogramme zeigen den Anteil der humanen CD3⁺ T-Zellen an Blutlymphozyten. (B) Die Histogramme stellen die Rezeptor tragenden TCR Vβ13.1 oder CAR #1046 T-Zellen innerhalb der humanen CD3 T-Zell Population dar. Jedes Histogramm bildet jeweils eine Blutprobe ab.

Sowohl CD28CD3ζ CAR #1046 als auch TCR #1178 T-Zellen persistierten 31 Tage. Die Persistenz der transduzierten T-Zellen war nicht NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängig. Der Anteil der TCR #1178 modifizierten T-Zellen war in Gegenwart des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigens erhöht. Der Anteil humaner T-Zellen und der CAR T-Zell Anteil war bei den Gruppen mit CD28CD3ζ CAR #1046 T-Zellen gleich.

4.9 Die T-Zellen mit rekombinanten Rezeptoren lassen sich spezifisch durch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid reaktivieren

Der Mausmodellversuch aus Abschnitt 4.8 zeigte, dass CD28CD3ζ CAR #1046 und TCR #1178 transduzierte T-Zellen länger als 30 Tage in den HLA-A2⁺ NOD-SCID Mäusen persistierten (Abbildung 13). Es wurde untersucht, ob sich die Rezeptor modifizierten T-Zellen nach 30 Tagen spezifisch durch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen reaktivieren lassen. Dazu wurden die Seren analysiert, die am Tag 31 aus dem peripheren Blut der immundefizienten HLA-A2⁺ NOD-SCID Mäusen mit CD28CD3ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen und ±NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Injektion entnommen worden waren (siehe 4.8). Es zeigte sich, dass humanes IFN-γ nur in den Mäusen freigesetzt wurde, denen TCR #1178 oder CAR #1046 modifizierte T-Zellen und das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Antigen injiziert worden waren (Abbildung 14). Die Kontrollmäuse, denen nur TCR #1178 oder nur CAR #1046 T-Zellen injiziert worden waren, wiesen keine erhöhte IFN-γ Freisetzung auf.

Die Untersuchung zeigte, dass sich die T-Zellen mit CD28CD3ζ CAR #1046 und die TCR #1178 T-Zellen 30 Tage nach Injektion in die Maus durch NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen reaktivieren ließen (Abbildung 13). Die IFN-γ Freisetzung war bei den durch NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ stimulierten CD28CD3ζ CAR #1046 T-Zellen höher als bei den durch NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ stimulierten TCR #1178 T-Zellen.

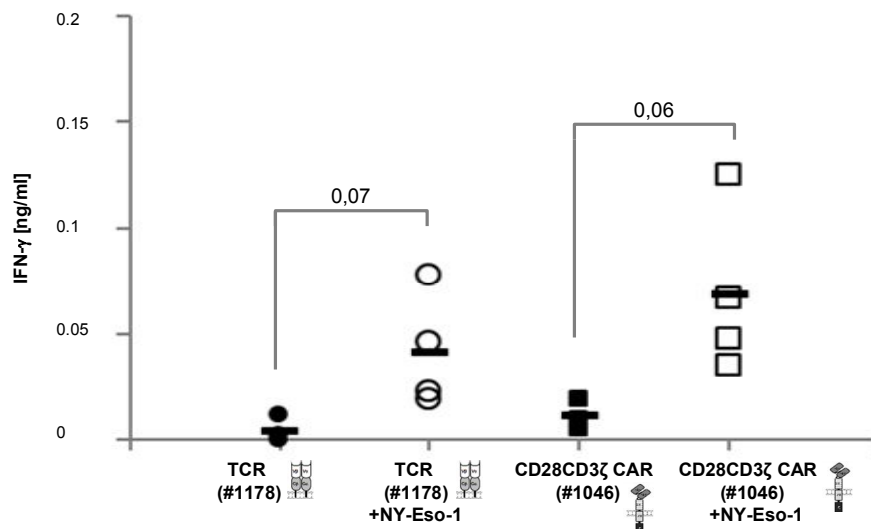


Abbildung 14 NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifische Reaktivierung der rekombinanten Rezeptoren. Die Seren der Blutproben aus Abschnitt 4.8 wurden verwendet. Die humane IFN- γ Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt. In dem Diagramm stellt jeder Kreis oder jedes Quadrat eine Mausserumprobe dar. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe sind als schwarze Balken dargestellt. Die abgebildeten Gruppen sind TCR #1178 (n=3, schwarze Kreise), TCR #1178 und NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid (n=4, weiße Kreise), CD28CD3 ζ CAR #1046 (n=3, schwarze Quadrate), sowie CD28CD3 ζ CAR #1046 und NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid (n=4, weiße Quadrate).

4.10 CAR und TCR modifizierte T-Zellen unterscheiden sich in der Antigen-spezifischen Aktivierungsschwelle

Es wurde gezeigt, dass die T-Zell Aktivierung durch den anti-NY-Eso-1 CAR oder TCR unterschiedlich ist (siehe 4.4 bis 4.7). Im Nachfolgenden wurde untersucht, ab welcher Peptidkonzentration die T-Zell Aktivierung durch den jeweiligen Rezeptor erfolgt. Die Aktivierungsschwelle wird definiert als die höchste NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Konzentration, die die Sekretion der Zytokine im Messbereich des Hintergrundes induziert. Ziel war es, die Schwellen der CAR und TCR vermittelten T-Zell Aktivierung in Abhängigkeit der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expressionsdichte zu ermitteln. Dafür wurden TAP defiziente B7⁺ T2 Zellen verwendet, um zu gewährleisten, dass die Beladung der MHC I Komplexe mit Peptid abhängig von der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentration erfolgte. Zuerst wurde untersucht, ob die T2 Zellen unterschiedliche NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expressionsdichten aufwiesen, wenn sie mit unterschiedlichen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentrationen inkubiert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass mit steigender NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration eine Dosis-abhängige Dichte des HLA-A2 präsentierten NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigens auf den T2 Zellen erreicht wurde (Abbildung 15). Als Kontrolle wurden die gepulsten T2 Zellen mit irrelevantem Antikörper inkubiert.

Die unterschiedlichen Expressionsdichten des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigens auf T2 Zellen ermöglichten es, die Zielzellen mit Dosis-abhängiger Antigenkonzentration zur Bestimmung der Rezeptor vermittelten Aktivierungsschwelle einzusetzen. Dazu wurden CD3ζ CAR #1044 T-Zellen, CD28CD3ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid gepulsten T2 Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte T-Zellen mitgeführt. Das Maß der T-Zell Aktivierung wurde mittels IFN-γ Konzentration im Überstand charakterisiert. Als Kontrolle dienten ungepulste T2 Zellen. Es zeigte sich, dass alle Rezeptor modifizierten T-Zellen auf die T2 Zellen unterschiedlicher NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expressionsdichten mit einer Antigen-abhängigen IFN-γ Freisetzung reagierten (Abbildung 16). TCR #1178 modifizierte T-Zellen wiesen ab einer NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Pulskonzentration von 0,3 ng/ml eine IFN-γ Freisetzung auf, außerdem wurde ab der 30 ng/ml NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Beladungskonzentration die maximale T-Zell Aktivierung erreicht.

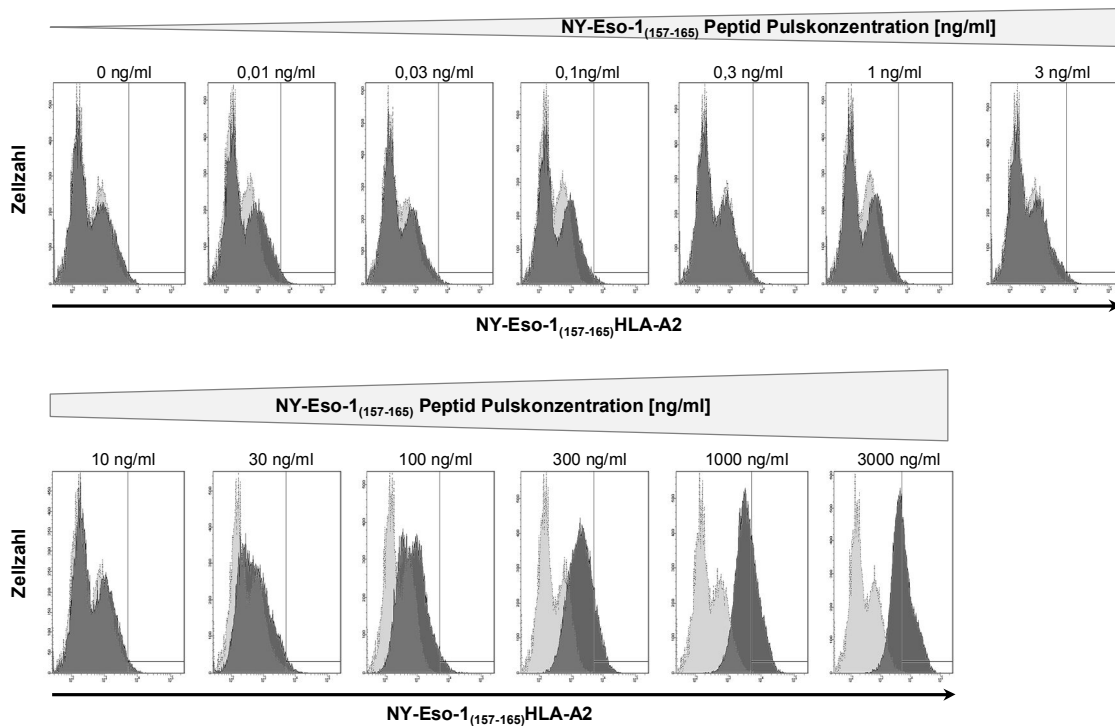


Abbildung 15 NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression auf gepulsten T2 Zellen. Die TAP defizienten B7⁺ T2 Zellen wurden mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid in Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 3000 ng/ml extern beladen (= gepulst). Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentrationen wurden im Verhältnis 1:3 verdünnt. Zum Nachweis der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression wurden die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ gepulsten T2 Zellen mit dem anti-HLA-A2- NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser Inkubation folgte die Färbung mit PE-gekoppeltem anti-IgG Fab Antikörper (dunkelgrau). Zur Kontrolle wurden die gepulsten T2 Zellen primär mit dem irrelevanten anti-CEA (#443) Antikörper inkubiert und mit dem PE-gekoppelten anti-IgG Fab Antikörper gefärbt (hellgrau). Als Kontrolle wurden ungepulste T2 Zellen (0 ng/ml) mitgeführt. Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expressionsdichte auf den gepulsten T2 Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen wurde ab einer NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Pulskonzentration von 300 ng/ml eine IFN- γ Sekretion induziert. Die IFN- γ Freisetzung der CAR #1046 T-Zellen mit kostimulatorischer CD28 Domäne erfolgte ebenfalls bei der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Pulskonzentration von 300 ng/ml, war aber höher als die IFN- γ Konzentration der CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Es wurde kein IFN- γ bei den unmodifizierten T-Zellen sezerniert.

Die Aktivierungsschwelle der CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen ist ca. 1000fach höher als die Schwelle der TCR #1178 modifizierten T-Zellen. Bei TCR #1178 T-Zellen wurde das Plateau der IFN- γ Freisetzung erreicht. Die integrierte kostimulatorische Domäne im CAR #1046 hat keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle, aber auf die Signalstärke der T-Zell Aktivierung.

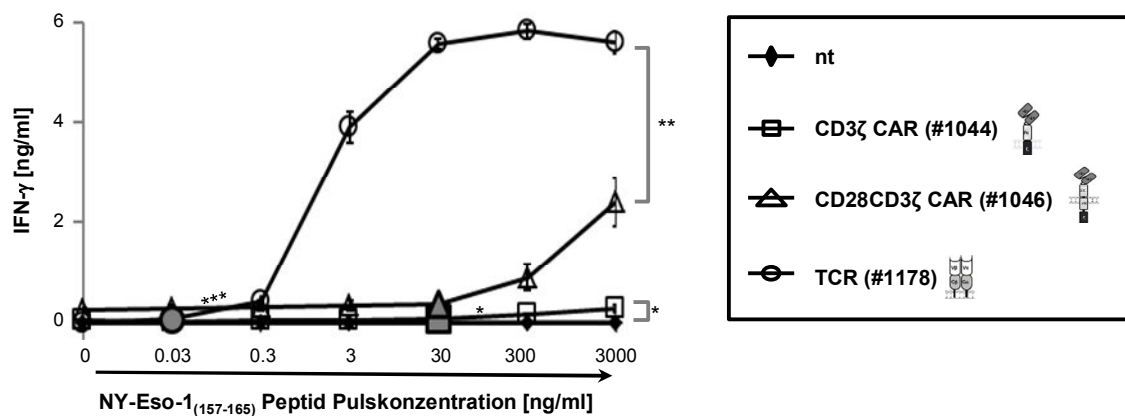


Abbildung 16 Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle der CAR und TCR modifizierten T-Zellen mit gepulstem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid. Es wurden T-Zellen retroviral mit den Expressionskonstrukten CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 transduziert. Zur Bestimmung der Aktivierungsschwelle wurden $2,5 \times 10^4$ CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen, CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit den NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beladenen B7⁺ T2 Zellen in einem E:T Verhältnis von 1:1 48 h kokultiviert. Die T2 Zellen wurden vor der Kokultivierung mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid in Konzentrationen von 0,03 ng/ml bis 3000 ng/ml extern beladen (= gepulst). Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentrationen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die IFN- γ Freisetzung in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte (nt) T-Zellen und ungepulste T2 Zellen mitgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Konzentrationen wurden bestimmt mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^* \leq 0,001$; $p^{**} \leq 0,0005$; $p^{***} \leq 0,00001$. Im T-Test wurden die CD3 ζ Zellen #1044 gegen unmodifizierte (nt) T-Zellen oder #1046 CAR T-Zellen gegen TCR #1178 T-Zellen verglichen. Die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren wird als größeres, graues Symbol dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für mehr als 3 unabhängige Tests.

Aus der letzten Beobachtung ging hervor, dass TCR #1178 modifizierte T-Zellen ein Plateau der T-Zell Aktivierung erreichten; die CAR transduzierten T-Zellen erreichten bis 3000 ng/ml NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration kein Plateau in der IFN- γ Sekretion. Somit stellte sich die Frage, ob CAR modifizierte T-Zellen, wie TCR #1178

T-Zellen, ein Plateau in der T-Zell Aktivierung erreichen. Für den Test wurden CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen verwendet, da diese eine höhere IFN- γ Freisetzung zeigten als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen (siehe Abbildung 12 und Abbildung 16). T2 Zielzellen exprimierten in Abhängigkeit der gepulsten NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigenkonzentration unterschiedliche NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Dichten auf der Oberfläche (Abbildung 17A). Zur Untersuchung der Aktivierungsplateaus der rekombinanten Rezeptoren wurden TCR #1178 exprimierende T-Zellen oder CD28CD3 ζ CAR #1046 exprimierende T-Zellen mit den gepulsten T2 Zellen kokultiviert. Des Weiteren wurden die Rezeptor modifizierten T-Zellen mit NY-Eso-1⁺ T21B Zellen (Vgl. Abbildung 7) oder NY-Eso-1⁻ T2 Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte T-Zellen mitgeführt.

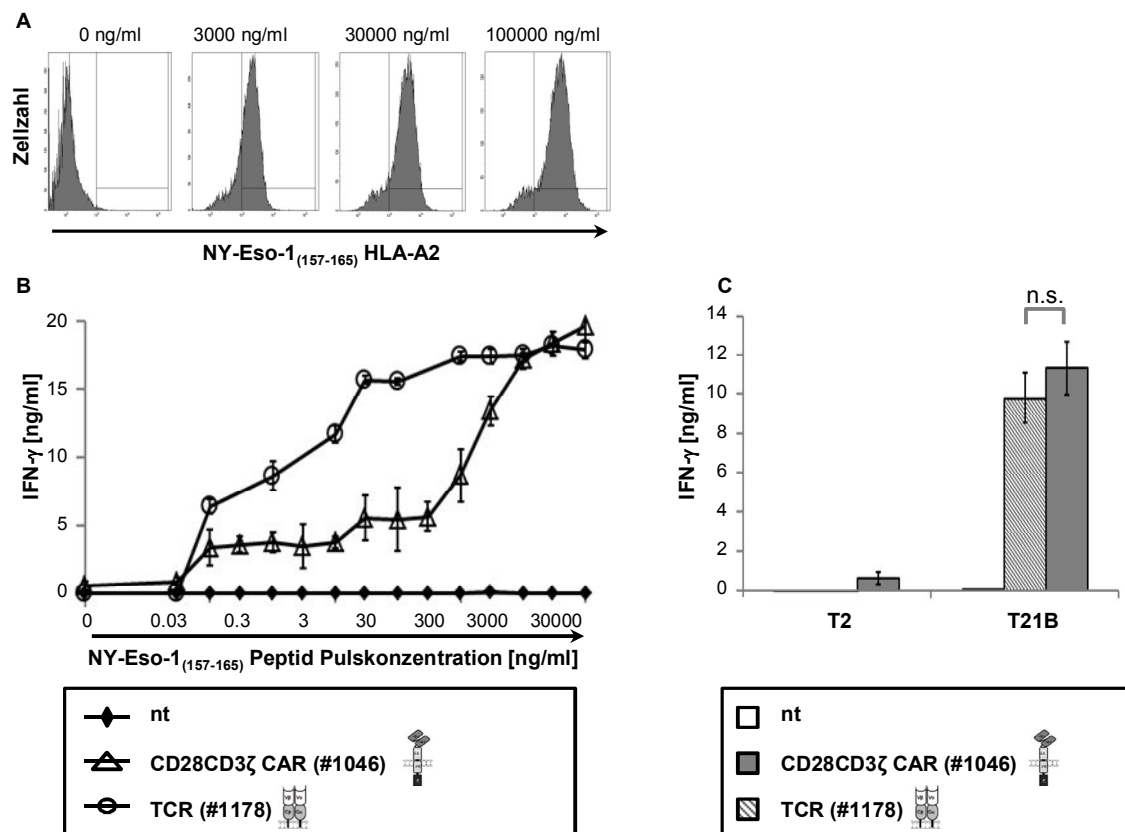


Abbildung 17 Aktivierungsplateau der TCR #1178 und CAR #1046 modifizierten T-Zellen. (A) Zum Nachweis der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid abhängigen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression wurden TAP defiziente B7⁺ T2 Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid in Konzentrationen von 3000 ng/ml bis 100000 ng/ml extern beladen. Zum Nachweis der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression wurden die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ gepulste T2 Zellen mit dem anti-HLA-A2-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifischen Antikörper inkubiert. Der Inkubation folgte die Färbung mit PE-gekoppeltem anti-IgG1 Fab Antikörper. Zur Kontrolle wurden ungepulsten T2 Zellen mitgefärbt. Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expressionsdichte auf den gepulsten T2 Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die jeweils verwendete NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration ist über den Histogrammen angegeben. Die MFI Werte waren 1397 bei 0 ng/ml, 2439 bei 3000 ng/ml, 4242 bei 30000 ng/ml und 7575 bei 100000 ng/ml NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Konzentration. T-Zellen wurden retroviral mit den Expressionskonstrukten CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 transduziert. Zur Bestimmung der Aktivierungskurven wurden 2,5 x 10⁴ CAR #1046

T-Zellen oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit (B) $2,5 \times 10^4$ NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beladenen T2 Zellen oder (C) $2,5 \times 10^4$ T21B oder T2 Zellen 48 h kokultiviert. Die CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung normiert. Die T2 Zellen wurden vor der Kokultivierung mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid in Konzentrationen von 0,03 ng/ml bis 100000 ng/ml extern beladen. Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentrationen wurden im Verhältnis 1:3 verdünnt. Die TCR #1178 T-Zellen verfügten über eine geringere Anzahl modifizierter T-Zellen, sodass keine Kokultivierung bei den NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Pulskonzentrationen von 0,3 ng/ml, 3 ng/ml und 300 ng/ml durchgeführt wurde. Die IFN- γ Freisetzung in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-modifizierte (nt) T-Zellen und (ungepulste) T2 Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Der Test wurde einmal durchgeführt.

Die Daten zeigten eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Dosis-abhängige T-Zell Aktivierung der rekombinanten Rezeptoren. Das Aktivierungsplateau der TCR #1178 modifizierten T-Zellen zeigte sich ab einer NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration von 30 ng/ml (Abbildung 17B). Die CD28CD3 ζ CAR #1046 modifizierten T-Zellen wiesen ein Aktivierungsplateau ab 30000 ng/ml NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration auf. Die CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 induzierte T-Zell Aktivierung durch T21B Zellen zeigte eine gleich hohe IFN- γ Freisetzung (Abbildung 17C). Unmodifizierte T-Zellen und die Kokultur mit T2 Zellen wiesen keine INF- γ Sekretion über Hintergrund auf. Die Auswertung ergab, dass sowohl CD28CD3 ζ CAR #1046 als auch TCR #1178 T-Zellen ein Plateau in der IFN- γ Konzentration aufwiesen. Die Antigendichte für das Erreichen des Plateaus war bei CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen höher als bei TCR #1178 T-Zellen.

4.11 Die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren ist unterschiedlich bei Zielzellen unterschiedlicher Antigendichte

Die Daten aus Abschnitt 4.10 ergaben, dass TCR #1178 modifizierte T-Zellen eine niedrigere Aktivierungsschwelle als CAR modifizierte T-Zellen aufwiesen. Die in 4.10 eingesetzten T2 Zielzellen sind positiv für B7 (Abbildung 9), sodass die TCR #1178 transduzierten T-Zellen zusätzlich das endogene CD28 kostimulatorische Signal erhielten. Im Folgenden wurde die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren in Abhängigkeit der endogen prozessierten NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigendichte und ohne CD28 Kostimulation über B7 untersucht. Dazu wurden B7⁻ SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen verwendet (Abbildung 9). Die SK-MEL-37 und SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen wurden gemischt und das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Molekül gefärbt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch in Abhängigkeit der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression sortiert (Abbildung 18A) und die erhaltenen

Zellpopulationen unterschiedlicher Antigendichte eingesetzt (Abbildung 18B). Die sortierten Zellpopulationen wurden mit CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 modifizierten T-Zellen kokultiviert.

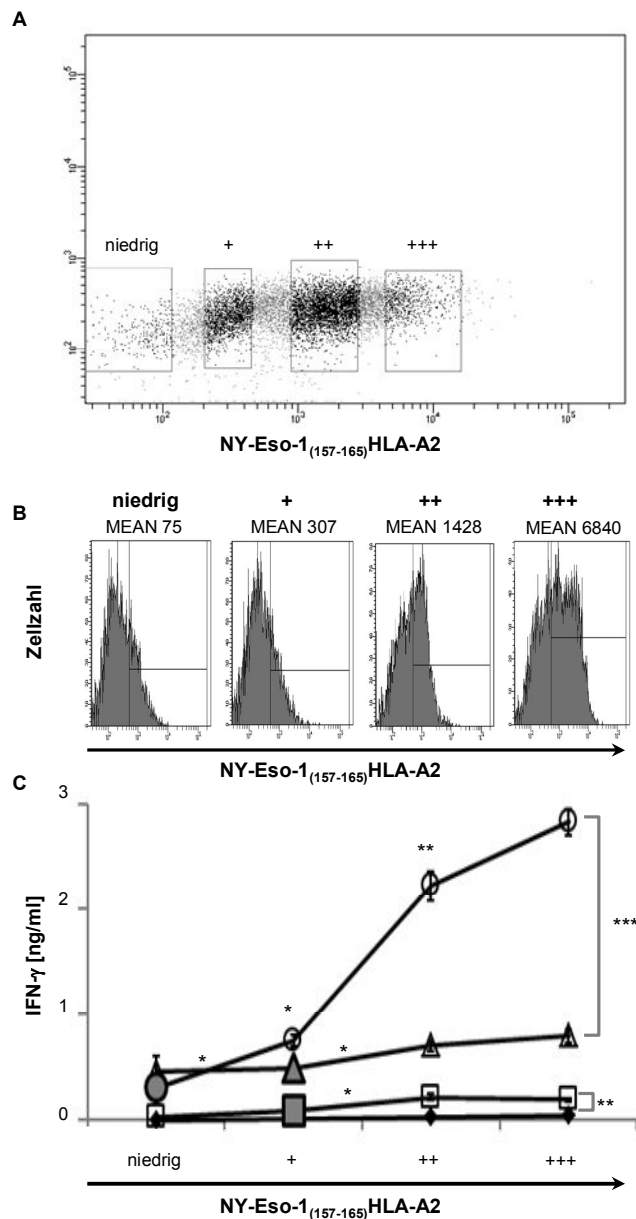
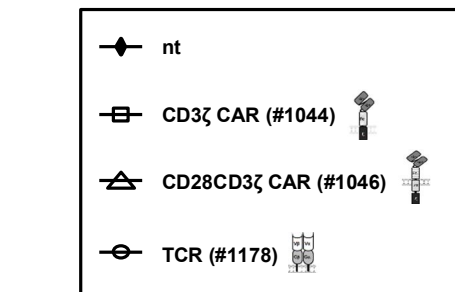


Abbildung 18 Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren bei Zielzellen unterschiedlicher NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expressionsdichte. (A) Die SK-MEL-37 Zellen und ihre Transfektante SK-MEL-37 NY-Eso-1 wurden gemischt und für die Sortierung vorbereitet. Dazu wurde die SK-MEL-37 Zellmischung mit dem anti-HLA-A2-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend mit dem PE-gekoppelten anti-IgG Fab Antikörper gefärbt. Es folgte die durchflusszytometrisch basierte Zellsortierung in 4 Populationen: niedrig, +, ++ und +++. (B) Nach der Sortierung wurden die 4 Populationen durchflusszytometrisch auf ihre NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expression untersucht. Die Histogramme zeigen die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expressionsdichten der 4 sortierten Populationen: niedrig (MFI 75), + (MFI 307), ++ (MFI 1428) und +++ (MFI 6840).



(C) T-Zellen wurden retroviral mit den Konstrukten CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 transduziert. Es erfolgte eine Kokultivation über 48 h von $1,3 \times 10^4$

CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 modifizierten T-Zellen mit den jeweiligen SK-MEL-37 Zellen unterschiedlicher NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Expressionsdichte. Die modifizierten CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Zellzahl pro Vertiefung eingestellt. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte (nt) T-Zellen mitgeführt. Die IFN- γ Freisetzung in die Kulturüberstände wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Konzentrationen wurden mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^* \leq 0,005$; $p^{**} \leq 0,0005$ und $p^{***} \leq 0,00005$ bestimmt. Im T-Test wurden die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen gegen unmodifizierte (nt) Zellen verglichen oder CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen gegen TCR #1178 T-Zellen. Die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren wird als größeres, graues Symbol dargestellt und daneben der entsprechende T-Test Vergleich mit der nächsthöheren NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Expressionsdichte. Die Daten sind repräsentativ für 2 Spender.

Die T-Zell Aktivierung wurde mittels IFN- γ Konzentration im Überstand bestimmt. Die Daten zeigen, dass alle Rezeptor modifizierten T-Zellen eine Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung aufwiesen (Abbildung 18C). Die TCR #1178 modifizierten T-Zellen wiesen eine niedrigere Aktivierungsschwelle auf als CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen oder CD28CD3 ζ CAR #1046 modifizierte T-Zellen. Die Aktivierungsschwelle der CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen und CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen war hingegen gleich. Die IFN- γ Konzentration im Überstand war bei TCR #1178 T-Zellen am höchsten und bei CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen mit integrierter kostimulatorischer CD28 Domäne höher als bei CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Es wurde kein IFN- γ bei unmodifizierten T-Zellen sezerniert.

Die Untersuchung mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen, die endogen HLA-A2 Moleküle mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beladen und dann auf der Oberfläche exprimieren, zeigte genau wie die externe NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidbeladung der T2 Zellen (Abbildung 16), dass TCR #1178 T-Zellen eine niedrigere Schwelle und eine höhere IFN- γ Freisetzung hatten als die CAR modifizierten T-Zellen.

Ohne B7-CD28 Kostimulation zeigte sich, dass die CAR integrierte Kostimulation keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle, aber auf die Höhe der freigesetzten IFN- γ Konzentration hatte. TCR #1178 T-Zellen zeigten eine niedrigere Aktivierungsschwelle und höhere IFN- γ Freisetzung als CAR T-Zellen, unabhängig von einer CD28 Domäne im CAR.

4.12 Die Affinität des CAR hat keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle

Es wurde nachfolgend untersucht, ob eine Erhöhung der scFv Affinität einen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle der CAR modifizierten T-Zellen ausübt. Hierfür wurden zu den CAR #1044 T-Zellen und CAR #1046 T-Zellen mit der 3M4E5 scFv Bindedomäne die CAR #1189 T-Zellen und CAR #1190 T-Zellen mitgeführt, die den etwa 10fach affineren FabT1 scFv Antikörper als Bindedomäne tragen. Für die Untersuchung wurden CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen, CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen, aff. CD3 ζ CAR #1189 T-Zellen, aff. CD28CD3 ζ CAR #1190 T-Zellen oder TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid gepulsten T2 Zellen kokultiviert (Abbildung 19). Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte T-Zellen mitgeführt. Die T-Zell Aktivierung wurde mittels der IFN- γ Konzentration im Überstand bestimmt. Als Kontrolle dienten

ungepulste T2 Zellen. Es bestätigte sich, dass alle Rezeptoren eine Antigen-abhängige Aktivierung der T-Zellen induzierten. Die TCR #1178 modifizierten T-Zellen zeigten eine niedrigere Aktivierungsschwelle als die CAR modifizierten T-Zellen und erreichten ein Plateau in der IFN- γ Freisetzung. Alle CAR modifizierten T-Zellen wiesen die gleiche Aktivierungsschwelle auf. Die IFN- γ Konzentrationen der CAR T-Zellen mit integrierter kostimulatorischer CD28 Domäne #1046 und #1190 waren höher als die IFN- γ Konzentrationen der CD3 ζ CAR #1044 und #1189 T-Zellen. Die IFN- γ Freisetzung der CD28CD3 ζ CAR #1046 und #1190 T-Zellen mit unterschiedlicher Affinität war gleich, ebenso war die IFN- γ Freisetzung der CD3 ζ CAR #1044 und #1189 T-Zellen gleich. Bei hoher NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration zeigten die T-Zellen mit dem affineren CD28CD3 ζ CAR #1190 eine höhere IFN- γ Freisetzung als CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen. Es wurde kein IFN- γ bei den unmodifizierten T-Zellen sezerniert.

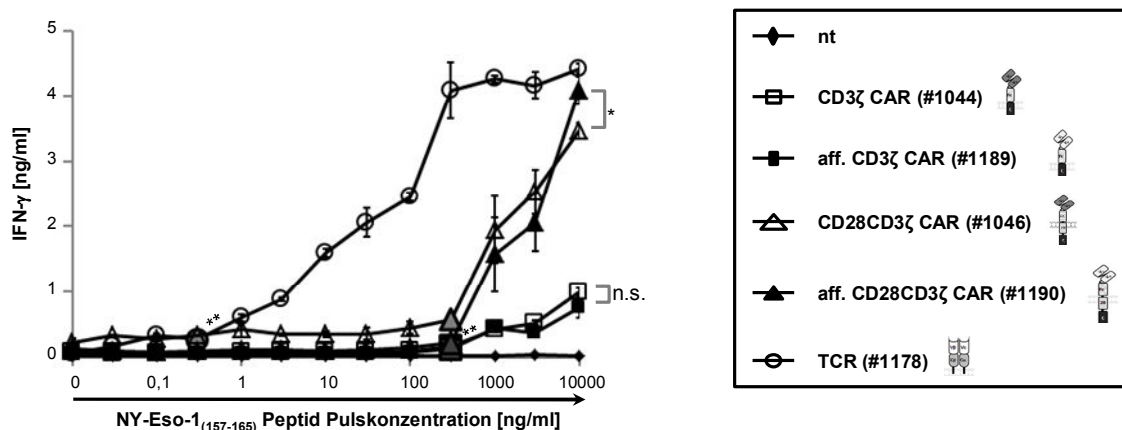


Abbildung 19 Steigerung der Affinität des CAR hat keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle. Es wurden T-Zellen retroviral mit den Expressionskonstrukten CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189, aff. CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 transduziert. Das aff. steht für hoch affin, da die scFv Antikörper-abgeleitete Bindedomäne FabT1 (#1189, #1190) 10fach stärker bindet als die 3M4E5 Antikörper-abgeleitete Bindedomäne (#1044, #1046). Zur Bestimmung der Aktivierungsschwellen wurden $2,5 \times 10^4$ #1044, #1046, #1189, #1190 oder #1178 Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beladenen B7⁺ T2 Zellen 48 h kokultiviert. Die T2 Zellen wurden vor der Kokultivierung mit dem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid in Konzentrationen von 0,03 ng/ml bis 10000 ng/ml beladen. Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentrationen wurden im Verhältnis 1:3 verdünnt. Die IFN- γ Freisetzung in die Kulturüberstände wurde mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte (nt) T-Zellen und (ungepulste) T2 Zellen mitgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der IFN- γ Konzentrationen wurden bestimmt mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^* \leq 0,01$; $p^{**} \leq 0,002$; n.s. nicht signifikant. Im T-Test wurden die CD3 ζ CAR T-Zellen #1044 gegen #1189 verglichen oder CD28CD3 ζ CAR T-Zellen #1046 gegen #1190. Die Aktivierungsschwelle der rekombinanten Rezeptoren wird als größeres, graues Symbol dargestellt und daneben der entsprechende T-Test Vergleich mit der nächsthöheren NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Pulskonzentration. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Tests.

Wie die Beobachtungen aus 4.10 und 4.12 zeigten, führte die kostimulatorische CD28 Domäne in den CARs (#1046, #1190) zu einer höheren IFN- γ Freisetzung nach Aktivierung der T-Zellen als bei CD3 ζ CAR T-Zellen (#1044, #1189). Die Steigerung der Affinität (#1190) erhöht die IFN- γ Freisetzung bei einer hohen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration.

Da die Aktivierungsschwelle aller vier CAR modifizierten T-Zellen (#1044, #1046, #1189, #1190) gleich war, schließen wir daraus, dass die unterschiedliche Affinität der verwendeten Bindedomänen keinen Einfluss auf die Schwelle der T-Zell Aktivierung hatte.

4.13 Die Affinität des CAR hat keinen Einfluss auf die T-Zell aktivierende Effektorzellzahl bei gegebener Antigendichte

Die vorangegangenen Daten zeigten, dass bei gleicher Anzahl CAR T-Zellen die Affinität keinen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle hatte. Im Folgenden wurde untersucht, ob bei gleichbleibender NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen Expressionsdichte und Änderung der CAR T-Zellzahl die Affinität einen Einfluss nimmt. Dazu wurden CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189 oder aff. CD28CD3 ζ CAR #1190 CAR modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎⁺ Tumorzellen T21B oder SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen kokultiviert. Als Kontrolle dienten T2 (NY-Eso-1⁻) und SK-MEL-37 (NY-Eso-1^{low}) Tumorzellen. Des Weiteren wurden unmodifizierte T-Zellen als Kontrolle eingesetzt. Es zeigte sich, dass die IFN- γ Freisetzung von der Anzahl CAR T-Zellen bei den NY-Eso-1 positiven Zielzellen abhängig war (Abbildung 20). Die IFN- γ Freisetzung war bei CD28CD3 ζ CAR T-Zellen mit unterschiedlich affinen Bindedomänen (#1046, #1190) sowohl bei den SK-MEL-37 NY-Eso-1 als auch bei den T21B Zellen gleich. Die IFN- γ Freisetzung beider CD3 ζ CAR T-Zellen (#1044, #1189) wurde ebenfalls bei der gleichen Anzahl CAR T-Zellen bei Kokultivierung mit NY-Eso-1 positiven Zielzellen induziert. Es zeigte sich, dass die CAR modifizierten T-Zellen mit kostimulatorischer CD28 Domäne (#1046, #1190) weniger CAR T-Zellen zur T-Zell Aktivierung bei der Kokultur mit T21B Zellen als bei der mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen brauchten. Es bedurfte mehr CD3 ζ CAR T-Zellen (#1044, #1189) zur Induktion der gleichen IFN- γ Konzentration als CD28CD3 ζ CAR T-Zellen (#1046, #1190). Bei hoher Anzahl CD3 ζ CAR T-Zellen war die IFN- γ Konzentration des affineren CD3 ζ CAR #1189 höher als bei T-Zellen mit dem niedriger affineren CD3 ζ CAR #1044. Bei

4.14 T-Zellen sezernieren mehrere proinflammatorische Zytokine nach CAR oder TCR Stimulation

Durch die T-Zell Aktivierung kommt es neben der Sekretion des IFN- γ zur Freisetzung weiterer Zytokine. Es galt zu überprüfen, ob weitere proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Dazu wurden die T-Zell Antwort Zytokine IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α in den Kulturüberständen der CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189, aff. CD28CD3 ζ CAR #1190 und TCR #1178 aus Abbildung 19 mittels Bead basiertem Multiplex-Immunoassay analysiert (Abbildung 21).

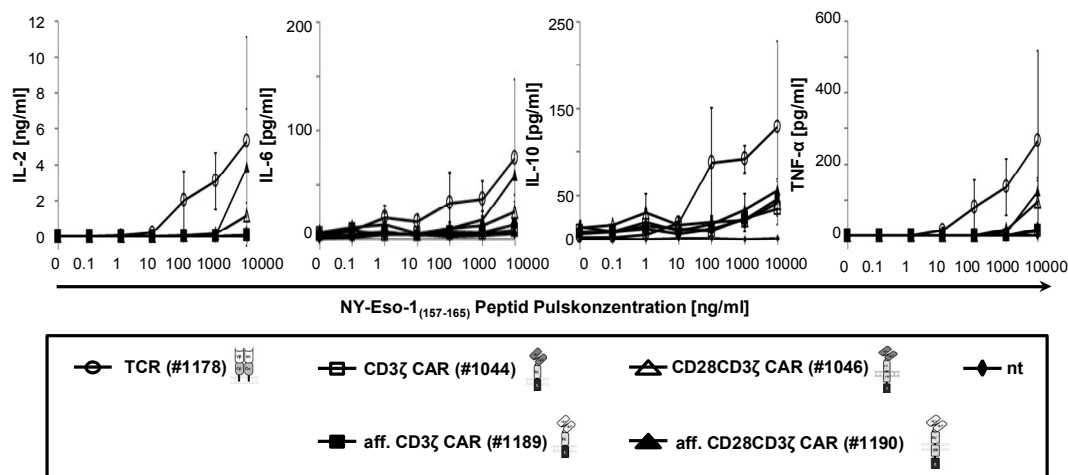


Abbildung 21 Messung der T-Zell aktivierenden Zytokine. Es wurden mehrere T-Zell aktivierende Zytokine in den Kulturüberständen der T-Zell Aktivierung (Abbildung 19) mittels Bead basiertem Multiplex-Immunoassay „LEGENDplex™ Human Th1 Panel (5-plex)“ bestimmt. Dazu wurden die Überstände der Zellansätze aus den Koinkubationen der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptidkonzentration von 0,1 ng/ml bis 10000 ng/ml in den Verdünnungsschritten 1:10 verwendet. Als Kontrolle wurden unmodifizierte (nt) T-Zellen und ungepulste T2 Zellen mitgeführt. Der Multiplex-Immunoassay wurde durchflusszytometrisch analysiert und die Konzentration der Zytokine berechnet. Als Standard dienten Verdünnungsreihen der im Multiplex-Immunoassay enthaltenen Anti-Zytokine Beads für IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α . Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten \pm SEM.

Es zeigte sich eine Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung bei allen Rezeptor modifizierten T-Zellen. Die Aktivierungsschwelle der TCR #1178 modifizierten T-Zellen war bei allen gemessenen Zytokinen niedriger als die der CAR T-Zellen. Des Weiteren war die Menge des jeweils freigesetzten Zytokins der TCR #1178 modifizierten T-Zellen höher als die der CAR T-Zellen. Die CAR modifizierten T-Zellen zeigten unabhängig von der kostimulatorischen Domäne und der Affinität die gleiche Aktivierungsschwelle. CAR T-Zellen mit integrierter CD28 kostimulatorischer Domäne (#1046, #1190) induzierten eine stärkere Zytokinsekretion als CD3 ζ CAR (#1044, #1189) T-Zellen. Die CD28CD3 ζ CAR T-Zellen mit hoher Affinität (#1190) induzierten

bei hoher NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Pulskonzentration eine höhere IL-2 und IL-6 Zytokinfreisetzung als CD28CD3 ζ CAR (#1046) T-Zellen mit niedrigerer Affinität. Unmodifizierte T-Zellen wiesen keine Zytokinfreisetzung auf.

Die Untersuchung ergab, dass neben IFN- γ die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α nach TCR #1178 oder CAR Stimulation sezerniert wurden. Des Weiteren zeigen die Daten, dass die Aktivierungsschwelle der CAR T-Zellen nicht von der CD28 kostimulatorischen Domäne oder der Affinität abhing. Die Kostimulation durch die CD28 Domäne erhöhte die Zytokinkonzentration, aber veränderte nicht das Spektrum der sezernierten Zytokine.

4.15 TCR und CAR T-Zellen sezernieren dieselben Zytokine nach NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängiger Aktivierung

Die Beobachtung aus Abschnitt 4.14 zeigte, dass neben IFN- γ die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α nach TCR #1178 oder CAR Stimulation durch Bindung an das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen sezerniert wurden. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Freisetzung dieser Zytokine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen-abhängig ist. Dazu wurden die Zielzellen T21B und T21C verwendet, die unterschiedliche, spezifische NY-Eso-1 Sequenzen präsentieren (Abbildung 8). Als Kontrollzellen wurden die NY-Eso-1⁻ T2 Zellen eingesetzt. Die Tumorzellen wurden mit CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189, aff. CD28CD3 ζ CAR #1190 oder TCR #1178 modifizierten T-Zellen kokultiviert. Die Daten bestätigten, dass die vorliegenden anti-NY-Eso-1 scFv Antikörperbindedomänen 3M4E5 und FabT1 der CARs (#1044, #1046, #1189, #1190) und des anti-NY-Eso-1 TCR #1178 eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifische Zytokinfreisetzung induzierten (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass bei Koinkubation mit T21B Zellen die CD28 kostimulatorischen CAR T-Zellen (#1046, #1190) und die TCR (#1178) T-Zellen eine gleich hohe Zytokinfreisetzung aufwiesen, unabhängig der Affinität der CARs. Es bestätigte sich, dass die CD28CD3 ζ CAR (#1046, #1190) T-Zellen eine höhere Zytokinkonzentration sezernierten als die CD3 ζ CAR (#1044, #1189) T-Zellen.

Die Untersuchung zeigte, dass die anti-NY-Eso-1 Rezeptor induzierte Freisetzung der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α spezifisch für das kognitive NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Antigen ist.

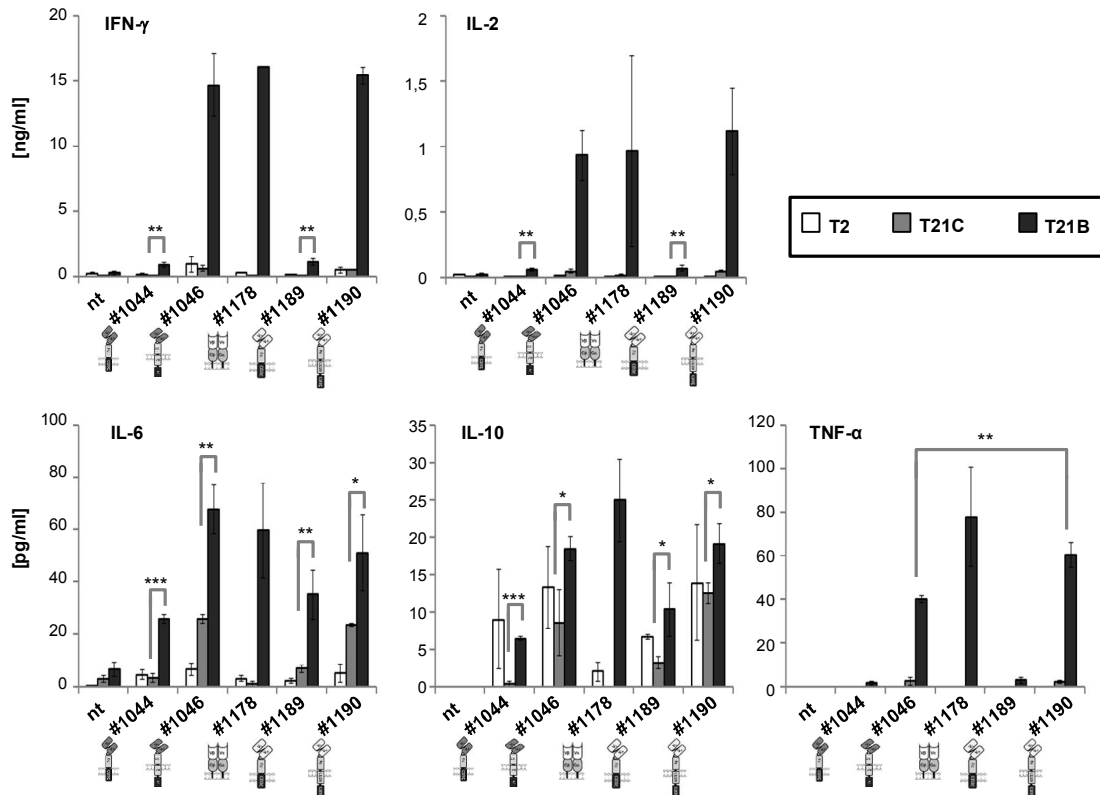


Abbildung 22 Die Qualität der spezifischen NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ T-Zell Aktivierung. Für die Untersuchung der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ induzierten Zytokinfreisetzung wurden die CARs CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046, aff. CD3 ζ CAR #1189, aff. CD28CD3 ζ CAR #1190 oder der TCR #1178 in T-Zellen exprimiert und pro Vertiefung $2,5 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ Zielzellen T2 (NY-Eso-1⁻), T21B (NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid Expression) oder T21C (NY-Eso-1₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid Expression) 48 h kokultiviert. Die Antikörper-abgeleitete Bindedomäne FabT1 (CAR #1189, CAR #1190) bindet 10fach stärker als die 3M4E5 Antikörper-abgeleitete Bindedomäne (CAR #1044, CAR #1046). Als Vergleich dienten nicht-modifizierte (nt) T-Zellen. Die transduzierten CAR #1044, #1046, #1189, #1190 T-Zellen und die TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Zellzahl pro Vertiefung normiert. Die NY-Eso-1⁻ T2 Zellen dienten als Kontrolle. Es wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α in den Kulturüberständen mittels Bead basiertem Multiplex-Immunoassay „LEGENDplex™ Human Th1 Panel (5-plex)“ bestimmt. Der Multiplex-Immunoassay wurde durchflusszytometrisch analysiert und die Konzentration der Zytokine berechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der Vergleiche wurde mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test bestimmt mit $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$.

4.16 CD28CD3 ζ CAR T-Zellen proliferieren stärker als TCR und CD3 ζ CAR T-Zellen

Folgende Untersuchung soll zeigen, ob die rekombinanten Rezeptoren ohne Antigenkontakt bei T-Zellen eine Proliferation induzieren. Dazu wurden CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 modifizierte T-Zellen bei niedriger IL-2 Konzentration für 20 Tage kultiviert. Als Kontrolle dienten unmodifizierte T-Zellen. Es

zeigte sich, dass die T-Zellen mit CD28CD3 ζ CAR #1046 eine höhere Zellzahl nach 20 Tagen hervorbrachten als T-Zellen mit CD3 ζ CAR #1044 oder TCR #1178 (Abbildung 23). CD3 ζ CAR #1044, TCR #1178 und unmodifizierte T-Zellen zeigten bis zum Tag 11 eine gleichbleibende Proliferation. Ab Tag 14 war die Amplifikation der CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen geringer als die der TCR #1178 modifizierten T-Zellen.

Der CD28CD3 ζ CAR #1046 induziert T-Zellen zu einer Antigen unabhängigen Proliferation, die bei TCR #1178 und CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen nicht beobachtet wurde.

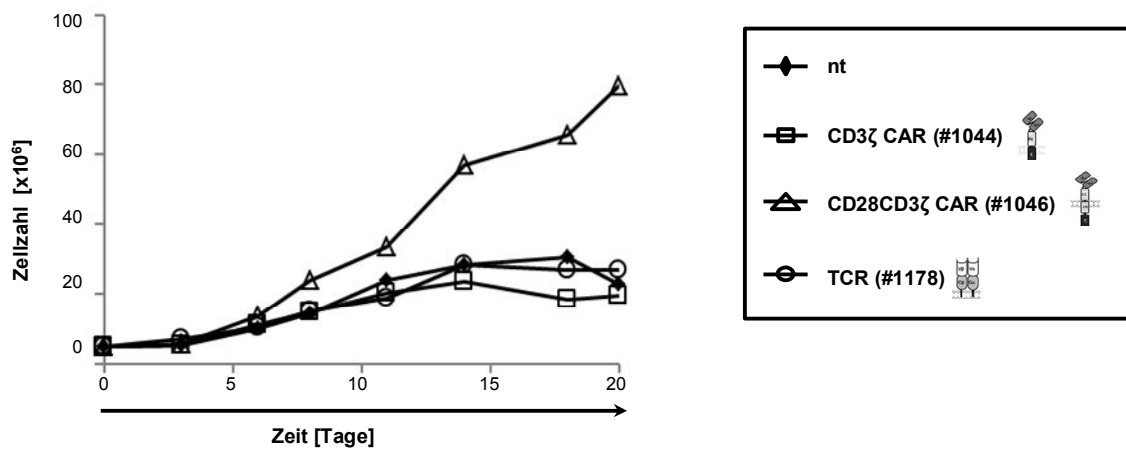


Abbildung 23 Das proliferative Verhalten der rekombinanten Rezeptoren. Für die Untersuchung der Proliferation wurden der CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder der TCR #1178 in T-Zellen exprimiert. Eine Gesamtzellzahl von $5,5 \times 10^6$ mit 5×10^5 Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden in 5 ml Medium mit 100 U/ml IL-2 20 Tage kultiviert. Die proliferierten Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen/ml mit 100 U/ml IL-2 eingestellt. Verdünnungen und Zellentnahmen wurden in die Zellzahlbestimmung mit einbezogen. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mittels Vi-Cell gezählt und die Zellzahl berechnet. Unmodifizierte T-Zellen (nt) dienten als Vergleich. Die Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Tests.

4.17 Die rekombinanten Rezeptoren induzieren unterschiedliche T-Zell Phänotypen

Ziel war es, den phänotypischen Charakter der CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 modifizierten T-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die modifizierten T-Zellen in Gegenwart niedriger IL-2 Konzentration 20 Tage kultiviert. In zeitlichen Abständen wurde ihre Rezeptor Expression (Abbildung 24), das CD4/CD8 Lymphozyten Verhältnis der Rezeptor modifizierten T-Zellen (Abbildung 25) und der Gedächtnis T-Zell Phänotyp der Rezeptor tragenden T-Zellen (Abbildung 26) analysiert.

Der CD28CD3 ζ CAR #1046 nahm mit der Zeit zu, verglichen zum CD3 ζ CAR #1044. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Anzahl CAR Moleküle pro Zelle bei CARs mit kostimulatorischer Domäne höher war (Vgl. Abbildung 24). Die Rezeptor Expression der TCR #1178 modifizierten T-Zellen war in der Zeit konstant.

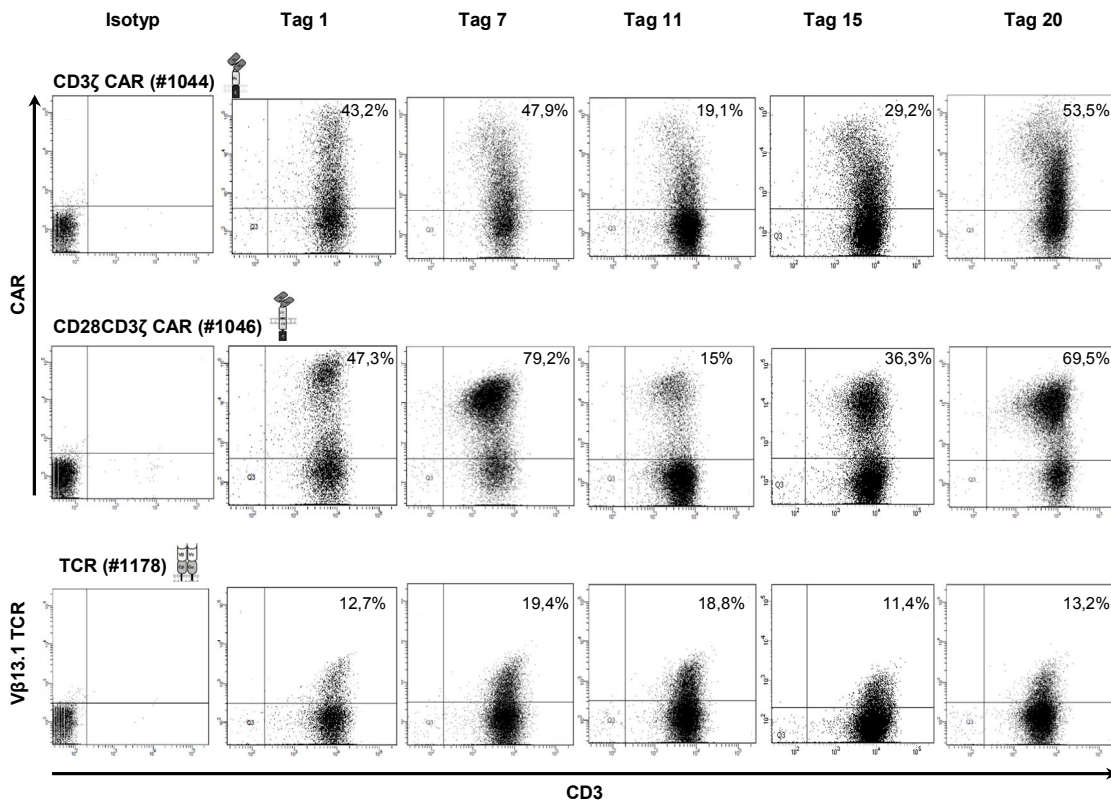


Abbildung 24 Expression der rekombinanten Rezeptoren in der Langzeitkultur. Für die Untersuchung der Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden die CARs CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder der TCR #1178 in T-Zellen exprimiert und eine Gesamtzellzahl von $5,5 \times 10^6$ mit 5×10^5 Rezeptor modifizierten T-Zellen in 5 ml Medium mit 100 U/ml IL-2 20 Tage kultiviert. Über die Zeit wurden die proliferierten Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml mit 100 U/ml IL-2 eingestellt. Zum Nachweis der anti-NY-Eso-1 CARs #1044 und #1046 wurden die T-Zellen mit dem PE-konjugierten anti-IgG1 Fab Antikörper inkubiert. Der TCR #1178 wurde durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-V β 13.1 Antikörper nachgewiesen. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch einen APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper identifiziert. Als Kontrolle dienten Isotypen Färbungen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten [MFI] über die Zeit waren: Tag 1 CAR #1044: 6354, CAR #1046: 13684, TCR #1178: 1046; Tag 7 CAR #1044: 9647, CAR #1046: 12793, TCR #1178: 944; Tag 11 CAR #1044: 7780, CAR #1046: 14842, TCR #1178: 905; Tag 15 CAR #1044: 6441, CAR #1046: 10472, TCR #1178: 451; Tag 20 CAR #1044: 9353, CAR #1046: 10528, TCR #1178: 766.

Anhand des CD4/CD8 Lymphozyten Verhältnisses wird deutlich, dass die CAR modifizierten T-Zellen fast ausschließlich aus zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen bestanden (Abbildung 25). Dieser CD8⁺ Anteil der CAR #1044 T-Zellen und CAR #1046 T-Zellen war in der Zeit konstant. Der CD8⁺ Anteil der TCR #1178 modifizierten T-Zellen war niedriger als der zytotoxische T-Zell Anteil der CAR T-Zellen.

TCR #1178 modifizierte T-Zellen hatten nach 20 Tagen den höchsten Anteil an CD62L⁺ T-Zellen im Vergleich zu CAR modifizierten T-Zellen. Der Anteil CD62L⁺ TCR #1178 modifizierter T-Zellen während der 20 Tage war konstant.

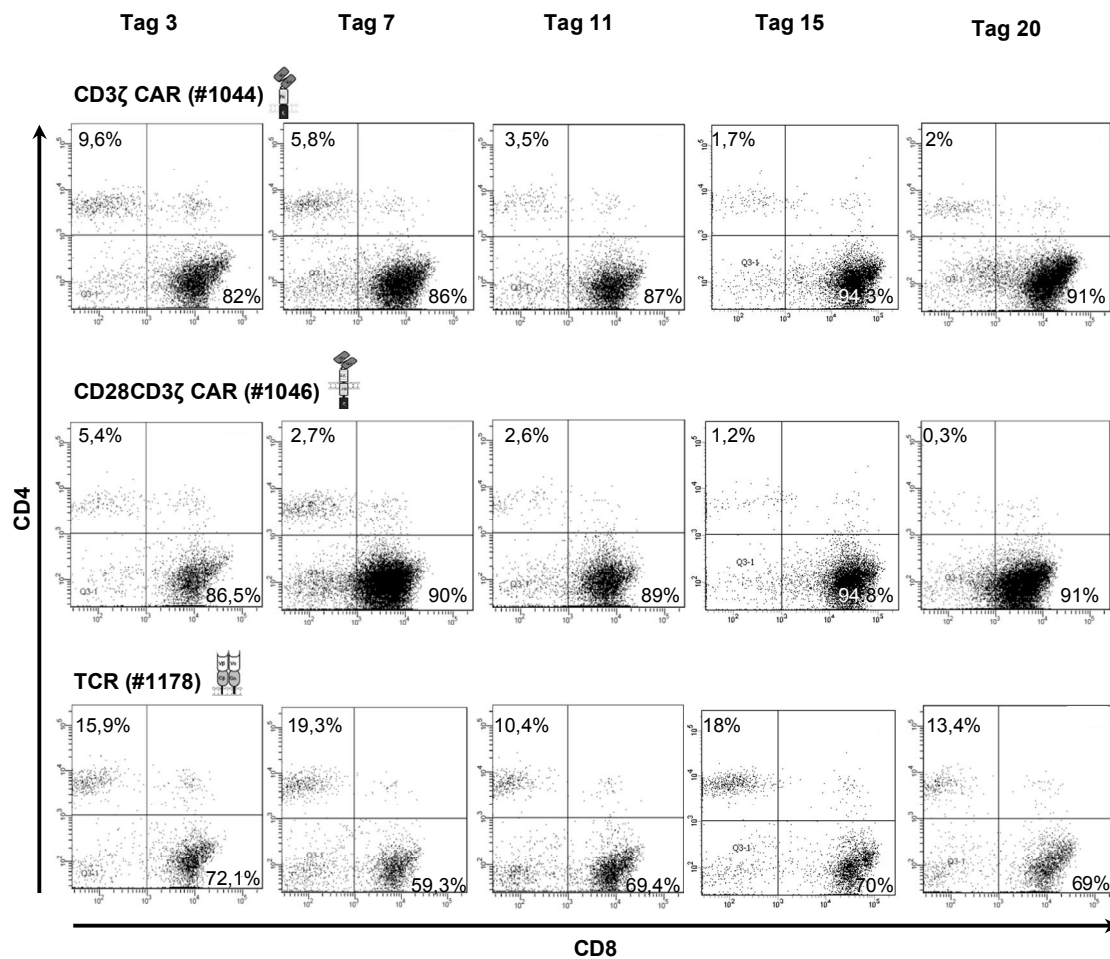


Abbildung 25 Das CD4/CD8 T-Zell Verhältnis der Rezeptor modifizierten T-Zellen in der Langzeitkultur. Um das CD4/CD8 Lymphozyten Verhältnis der transduzierten T-Zellen über die Zeit zu bestimmen, wurden die Zellansätze mit dem FITC-gekoppelten anti-CD4 Antikörper und dem APC-gekoppelten anti-CD8 Antikörper gefärbt. Zum Nachweis der Rezeptoren wurden die CAR #1044 und CAR #1046 modifizierten T-Zellen mit dem PE-konjugierten anti-IgG1 Fab Antikörper inkubiert. Der TCR #1178 wurde durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-Vβ13.1 Antikörper nachgewiesen. Das Gate wurde auf Rezeptor positive Zellen eingestellt und aus diesen Rezeptor positiven Zellen der CD4 bzw. der CD8 Lymphozyten Anteil bestimmt. Als Kontrolle dienten Isotypen Färbungen. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Spender.

Des Weiteren war der Effektor-Gedächtnis-T-Zell (T_{EM}) CD62L⁻CD45RO⁺ Anteil innerhalb der TCR #1178 T-Zell Population konstant. Sowohl die CD3ζ CAR #1044 T-Zellen als auch die CD28CD3ζ CAR #1046 T-Zellen erfuhren am Tag 20 eine Abnahme der T_{EM} (CD62L⁻CD45RO⁺) Population, während die final ausdifferenzierten Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EMRA}) CD62L⁻CD45RO⁻ zunahmen. Den höchsten T_{EMRA} CD62L⁻CD45RO⁻ T-Zell Anteil wiesen CD3ζ CAR #1044 modifizierte T-Zellen und den niedrigsten TCR #1178 modifizierte T-Zellen auf (Abbildung 26B).

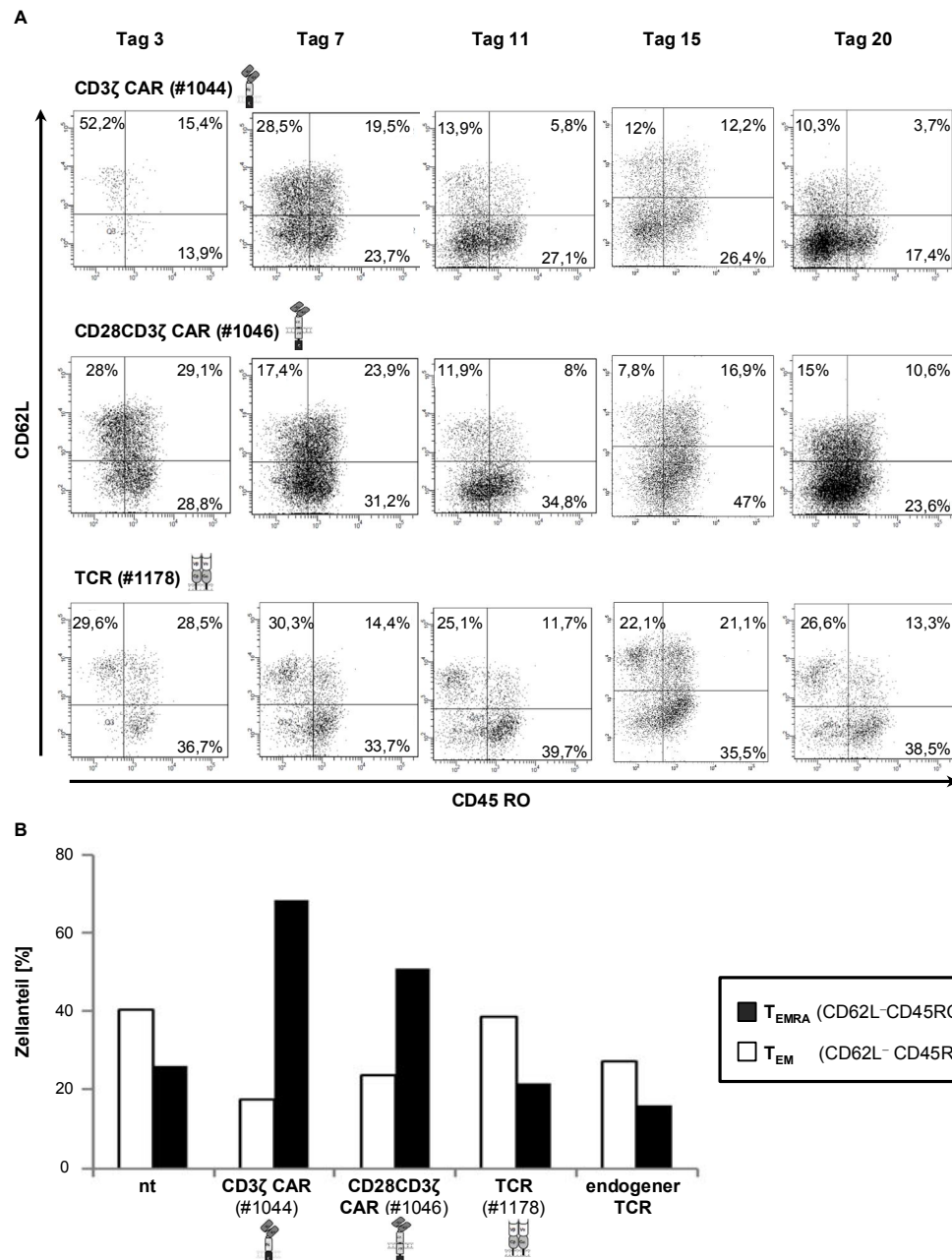


Abbildung 26 Das Gedächtnis T-Zell Profil der Rezeptor modifizierten T-Zellen in der Langzeitkultur. (A) Um den Phänotyp der modifizierten T-Zellen mit der Zeit zu charakterisieren, wurden die Ansätze mit dem PerCP-gekoppelten anti-CD3 Antikörper, dem FITC-gekoppelten anti-CD45RO und dem APC-gekoppelten anti-CD62L Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurden zum Nachweis der Rezeptoren die CAR #1044 T-Zellen und CAR #1046 modifizierten T-Zellen mit dem PE-konjugierten anti-IgG1 Fab Antikörper inkubiert. Die Rezeptoren der TCR #1178 modifizierten T-Zellen wurden durch Färbung mit dem PE-konjugierten anti-Vβ13.1 Antikörper nachgewiesen. Das Gate wurde auf Rezeptor positive CD3 Zellen eingestellt. Als Kontrolle und zur Einstellung der „Gates“ dienten Isotypen Färbungen. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Spender. (B) Das Balkendiagramm stellt den T_{EM} und T_{EMRA} Anteil der Rezeptor positiven CD3 Zellen an Tag 20 dar. Als Kontrolle diente die Bestimmung des endogenen Vβ 13.1 TCR. Hierfür wurden unmodifizierte T-Zellen wie der TCR #1178 gefärbt und das „Gate“ auf Vβ 13.1 positive CD3 Zellen eingestellt. Ebenfalls als Kontrolle dienten nicht-modifizierte (nt) Zellen. Bei den nicht-modifizierten T-Zellen wurde das „Gate“ auf CD3 positive T-Zellen eingestellt.

Aus den Daten ist ersichtlich, dass sich der Phänotyp bei TCR und CAR modifizierten T-Zellen unterscheidet. Bei TCR #1178 T-Zellen lag das T_{EM}/T_{EMRA} Verhältnis im Vergleich zu den CAR T-Zellen zu Gunsten der T_{EM} T-Zellen. Die CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen wiesen an Tag 20 mehr T_{EMRA} Zellen als CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen auf.

4.18 Die CAR induzierte T-Zell Antwort nimmt mit der Zeit ab, wohingegen die TCR induzierte T-Zell Antwort zunimmt

Die Änderung des Phänotyps der Rezeptor modifizierten T-Zellen über die Zeit wurde gezeigt. Im Folgenden wurde die zytotoxische Fähigkeit der modifizierten T-Zellen nach Langzeitkultur untersucht. Dazu wurden CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen, CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen und TCR #1178 modifizierte T-Zellen in Gegenwart von IL-2 (100 U/ml) 20 Tage kultiviert. Zur Bestimmung der zytotoxischen Fähigkeit wurden die CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 oder TCR #1178 Rezeptor modifizierten T-Zellen mit SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zellen an Tag 2, Tag 8 und Tag 20 kokultiviert. Die IFN- γ Freisetzung und die Zytotoxizität wurden bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt zeigte sich, dass die IFN- γ Konzentration von der Rezeptor T-Zellzahl abhängig war (Abbildung 27). Zu späteren Zeitpunkten wurde eine höhere Anzahl Rezeptor modifizierter T-Zellen benötigt, um gleiche IFN- γ Induktion zu erzielen. CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen setzten eine gleich hohe IFN- γ Konzentration während der gesamten Kokulturzeiten frei. CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen sezernierten stets eine niedrigere IFN- γ Konzentration.

Die Daten zur zytolytischen Aktivität zeigten, dass TCR #1178 modifizierte T-Zellen nach 20 Tagen das höchste Maß an Zytotoxizität erreichten. Bei CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen nahm die zytolytische Aktivität über die Zeit ab. CD28CD3 ζ CAR #1046 modifizierte T-Zellen wiesen bis zum Tag 8 die gleiche Zytotoxizität wie TCR #1178 transduzierte T-Zellen auf. Am Tag 20 zeigte sich, dass der zytotoxische Effekt der CD28CD3 ζ CAR #1046 modifizierten T-Zellen niedriger war als der der TCR #1178 modifizierten T-Zellen.

Die Untersuchung zeigte, dass die freigesetzte IFN- γ Konzentration sowohl bei CAR als auch bei TCR modifizierten T-Zellen über die Zeit abnahm. Die zytolytische Aktivität war bei CAR T-Zellen nach 20 Tagen verringert, wohingegen sie bei TCR #1178 T-Zellen erhöht war.

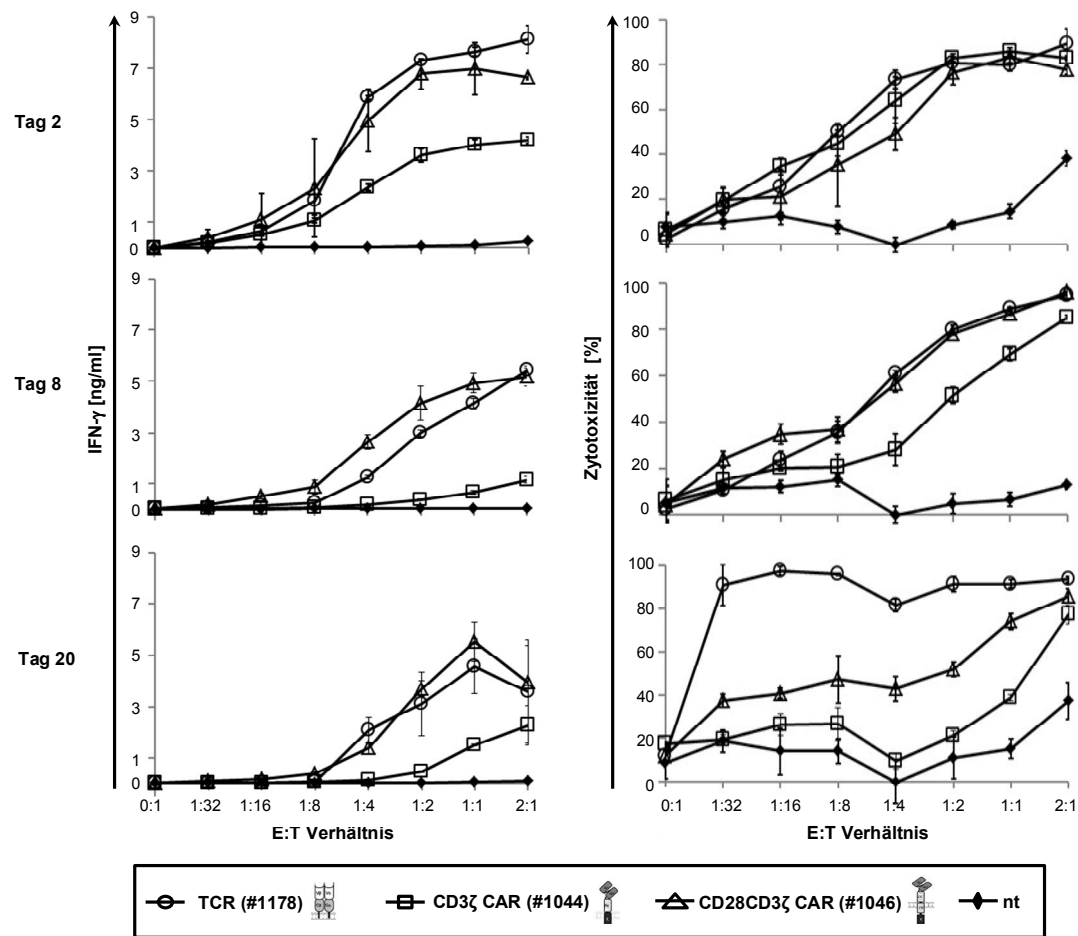


Abbildung 27 Die NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ induzierte T-Zell Antwort der rekombinanten Rezeptoren mit der Zeit. Die CARs CD3ζ CAR #1044, CD28CD3ζ CAR #1046 oder der TCR #1178 wurden in T-Zellen exprimiert und eine Gesamtzellzahl von $5,5 \times 10^6$ mit 5×10^5 Rezeptor modifizierten T-Zellen in 5 ml Medium mit 100 U/ml IL-2 20 Tage kultiviert. Über die Zeit wurden die proliferierten Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml mit 100 U/ml IL-2 eingestellt. Um den zytotoxischen Effekt der modifizierten T-Zellen zu bestimmen, wurden pro Vertiefung 3×10^4 CD3ζ CAR #1044, CD28CD3ζ CAR #1046 oder TCR #1178 Effektor T-Zellen mit $1,5 \times 10^4$ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen 48 h kokultiviert. Die transduzierten CAR #1044 T-Zellen, CAR #1046 T-Zellen und TCR #1178 T-Zellen wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung normiert. Die CAR #1044, CAR #1046 und TCR #1178 modifizierten T-Zellen wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt, so dass Effektorzell zu Zielzell Verhältnisse (E:T Verhältnis) von 2:1 bis 1:32 getestet wurden. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Diese Kokultivierung wurde an den Tagen 2, 8 und 20 angesetzt. Die IFN-γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt und die Zellviabilität wurde durch XTT-basierten Viabilitätstest ermittelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM.

4.19 Generierung neuer anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten

Aus den vorangegangenen Untersuchungen war ersichtlich, dass die Aktivierungsschwelle der TCR #1178 T-Zellen niedriger lag als die der CAR T-Zellen. Es ist bekannt, dass die Signalgebung des TCR durch mehrere Komponenten wie CD3ζ Rezeptor und CD28 Korezeptor induziert und verstärkt wird. Diese Signaldomänen

werden durch mehrere Moleküle vermittelt, wohingegen im CAR die Signaldomänen hintereinander in einem Molekül geschaltet sind. Es galt zu klären, ob eine Trennung der stimulatorischen Signale auf zwei Rezeptoren eine TCR ähnliche T-Zell Aktivierung induziert. Dazu wurde der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 konstruiert, bei dem das CD3 ζ Primärsignal und das kostimulatorische CD28 Signal auf zwei CAR Moleküle aufgeteilt wurde (Abbildung 28).

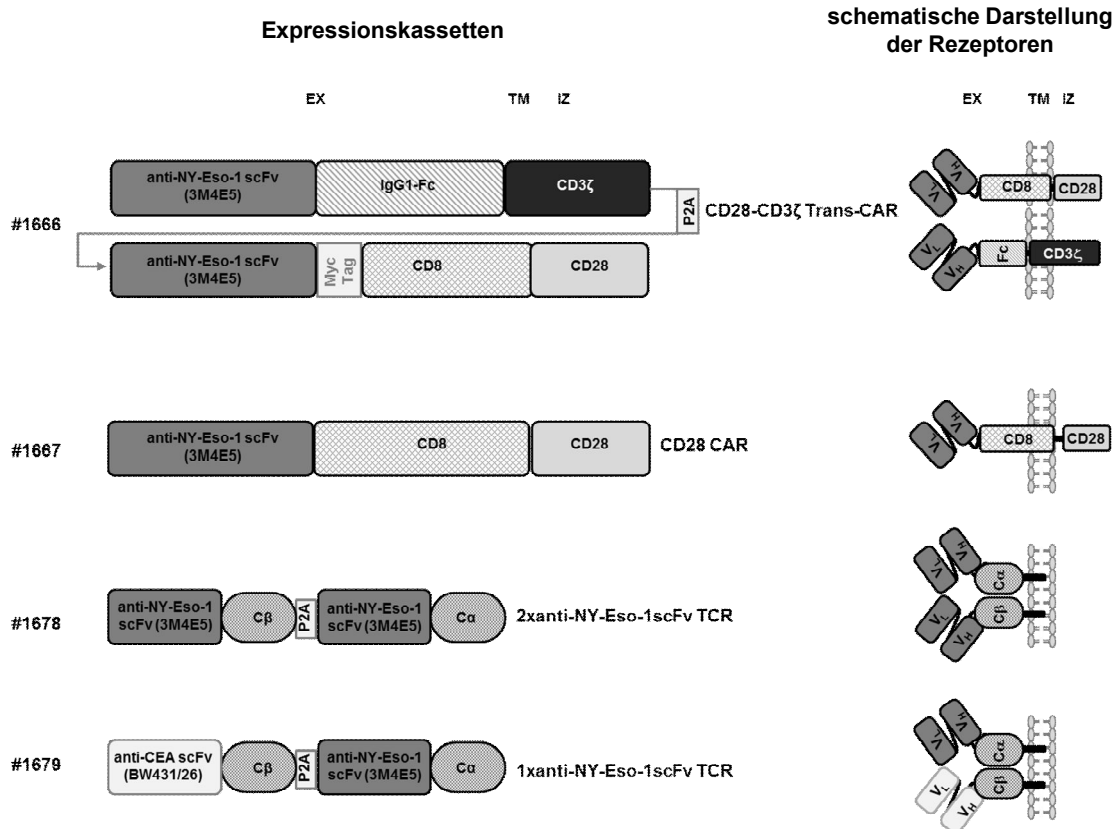


Abbildung 28 Der modulare Aufbau der anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten. Der CD28-CD3 ζ CAR #1666 besteht in der extrazellulären Domäne (EX) aus einer Antikörper-abgeleiteten Einzelkettenbindedomäne (scFv) mit Spezifität für NY-Eso-1, sowie einer Fc Brückendomäne bestehend aus IgG1 CH2CH3 oder der CD8 Brückendomäne. Die Transmembrandomäne (TM) besteht aus der Transmembranregion des CD3 Rezeptors oder der Transmembranregion des CD8 Rezeptors. Im intrazellulären (IZ) Teil besteht das CD28-CD3 ζ CAR Konstrukt aus der Signalkette des CD3 Rezeptors und des CD28 Rezeptors. Der 2x anti-NY-Eso-1scFvTCR #1678 besteht in der extrazellulären Domäne aus dem scFv mit Spezifität für NY-Eso-1 und der konstanten β ($C\beta$) Region des 1G4 TCR sowie dem anti-NY-Eso-1 scFv und der konstanten α ($C\alpha$) Region des 1G4 TCR. Der 1x anti-NY-Eso-1scFvTCR #1679 besteht in der extrazellulären Domäne aus dem scFv mit Spezifität für NY-Eso-1 und der $C\beta$ Region des 1G4 TCR, sowie dem scFv mit Spezifität für NY-Eso-1 und der $C\alpha$ Region des 1G4 TCR. Zur Gewährleistung einer äquimolaren Translation der Ketten des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 und der scFvTCR sind die Expressionskassetten durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) verbunden. Als Kontrollrezeptor wurde der #1667 CAR konstruiert, welcher in der extrazellulären Domäne (EX) aus dem scFv mit Spezifität für NY-Eso-1 sowie der CD8 Brückendomäne besteht, der CD8 Transmembrandomäne (TM) und intrazellulär (IZ) aus der CD28 kostimulatorischen Domäne. Die Expressionskassetten der CARs sind mit dem Leader der Immunglobulin Leichtkette Kappa (Lk) ausgestattet.

Zum weiteren Vergleich wurden anti-NY-Eso-1 scFv TCRs (#1678, #1679) konstruiert, bei denen jeweils auf die C α Domäne und die C β Domäne ein scFv als Bindedomäne gesetzt wurde. Durch die Beibehaltung der konstanten TCR Domänen in den Rezeptoren #1678 und #1679 soll die Rekrutierungsfähigkeit der CD3 ζ und CD28 Rezeptoren bestehen bleiben, aber eine Antikörper-abgeleitete Bindedomäne die Antigenerkennung vermitteln. Während der TCR #1678 zwei anti-NY-Eso-1 scFv Bindedomänen aufweist, wurde ein TCR #1679 generiert, der auf der C α Domäne die anti-NY-Eso-1 scFv Bindedomäne und auf der C β Domäne die anti-CEA scFv Bindedomäne trägt.

Die Koexpression zweier CARs oder beider „TCR“ Ketten (scFvC α , scFvC β) wurde durch Verwendung einer Expressionskassette erreicht, welche die beiden kodierenden DNS-Sequenzen über ein P2A Peptid verknüpft. Der modulare Aufbau der Expressionskassetten ist in Abbildung 28 dargestellt. Als Kontrolle wurde der anti-NY-Eso-1 CD28 kostimulatorische CAR #1667 konstruiert, der keine CD3 ζ Primärsignalkette enthält.

4.19.1 Klonierung des Plasmids pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3 ζ -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666 CAR, CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR)

Im ersten Schritt wurde aus dem Plasmid #1044 ein Teil des CD3 ζ DNS-Fragments durch die Restriktionsenzyme AarI und BsrGI isoliert (Abbildung 29). Das Plasmid #1658 wurde zur Isolation des DNS-Fragments CD3 ζ (3.Teil)-P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 mit den Restriktionsenzymen BsrGI und XhoI gespalten. Der Vektor #1044 wurde mit den Restriktionsenzymen AarI und XhoI zur Gewinnung des Plasmidfragments pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3 ζ (1.Teil) geschnitten. Zur Generierung des neuen Plasmids pBullet-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3 ζ -P2A-L κ -anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666) wurden die drei Fragmente ligiert. Die Sequenz des neu generierten Plasmids #1666 wurde mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 78, 136, 289, 707, 954, 1112, 1127, 1146, 1167, 1270 verifiziert. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassette #1666 befindet sich im Anhang (siehe 6.1.1).

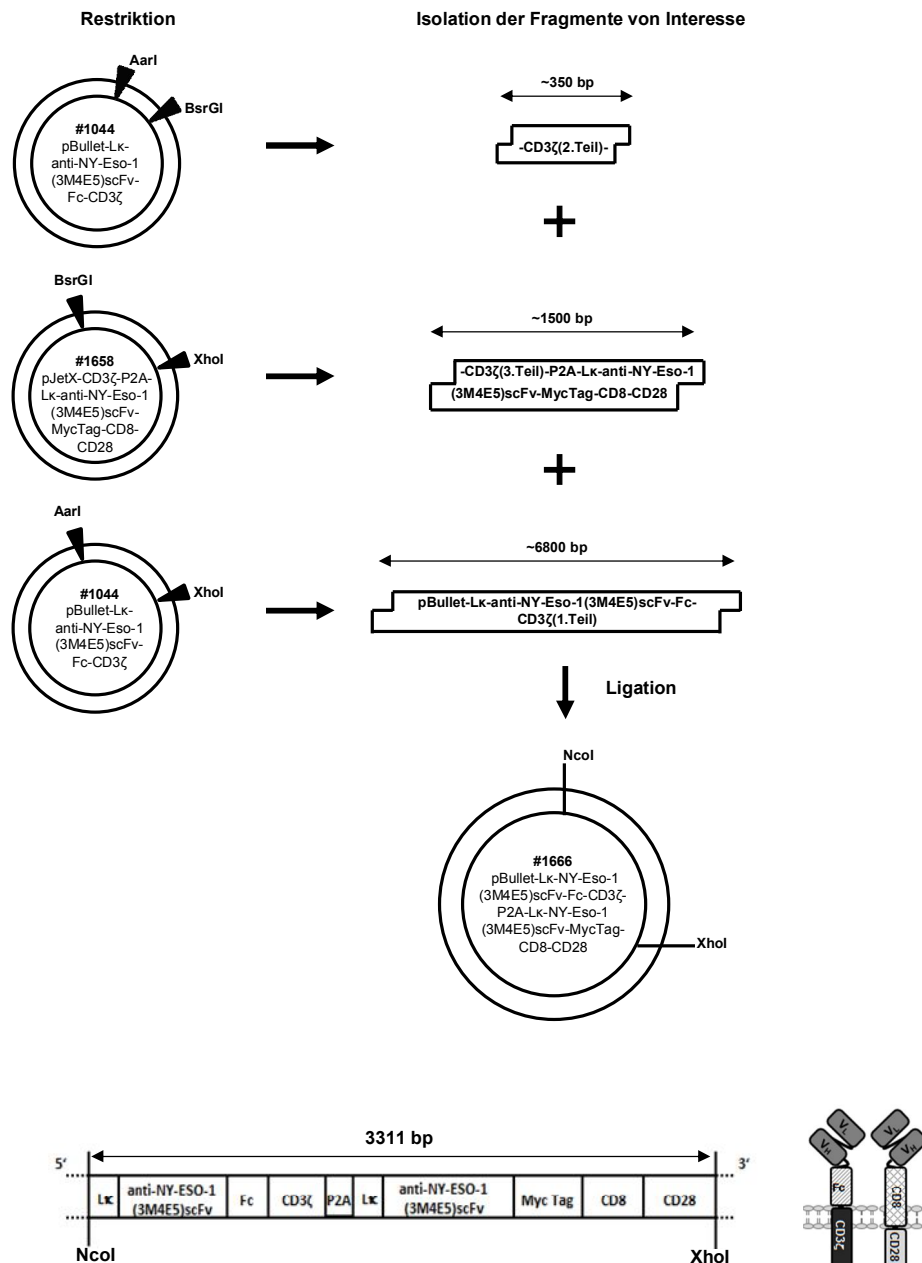


Abbildung 29 Klonierung der Expressionskassette für den CD28-CD3ζ Zweiketten CAR pBullet-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Myc Tag-CD8-CD28 (#1666 CAR). Die bicistronische Expressionskassette, die die DNS für den anti-NY-Eso-1scFv-Fc-CD3ζ CAR und den anti-NY-Eso-1scFv-MycTag-CD8-CD28 CAR enthält, wurde mittels drei Fragment Ligation aus den Plasmiden #1044 und #1658 generiert. Hierbei wurde das für die CD3ζ Signalkette kodierende DNS-Fragment in drei einzelnen Teilen aus den Plasmiden #1044 und #1658 isoliert. Die DNS des anti-NY-Eso-1scFv-Fc-CD3ζ CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des niedriger affinen 3M4E5 scFv, die IgG₁-Fc CH2CH3 Brückendomäne und die CD3ζ Transmembran- und Signaldomäne. Die DNS des anti-NY-Eso-1 scFv-MycTag-CD8-CD28 CAR kodiert die Einzelkettenbindedomäne des niedriger affinen 3M4E5 scFv, die CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie die CD28 kostimulatorische Signaldomäne. Die 3M4E5 scFv Antikörper-abgeleitete Einzelkettenbindedomäne ist spezifisch gegen HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ gerichtet. Der MycTag zwischen Binde- und Brückendomäne dient zur Detektion des CAR. Durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) wird bei der Expressionskassette eine äquimolare Translation der jeweiligen CAR Konstrukte gewährleistet.

4.19.2 Klonierung des Plasmids pBullet-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667 CAR, CD28 CAR)

Zur Konstruktion des Plasmids pBullet-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 wurde das DNS-Fragment Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 aus dem Plasmid #1658 mittels NcoI und XhoI restringiert (Abbildung 30).

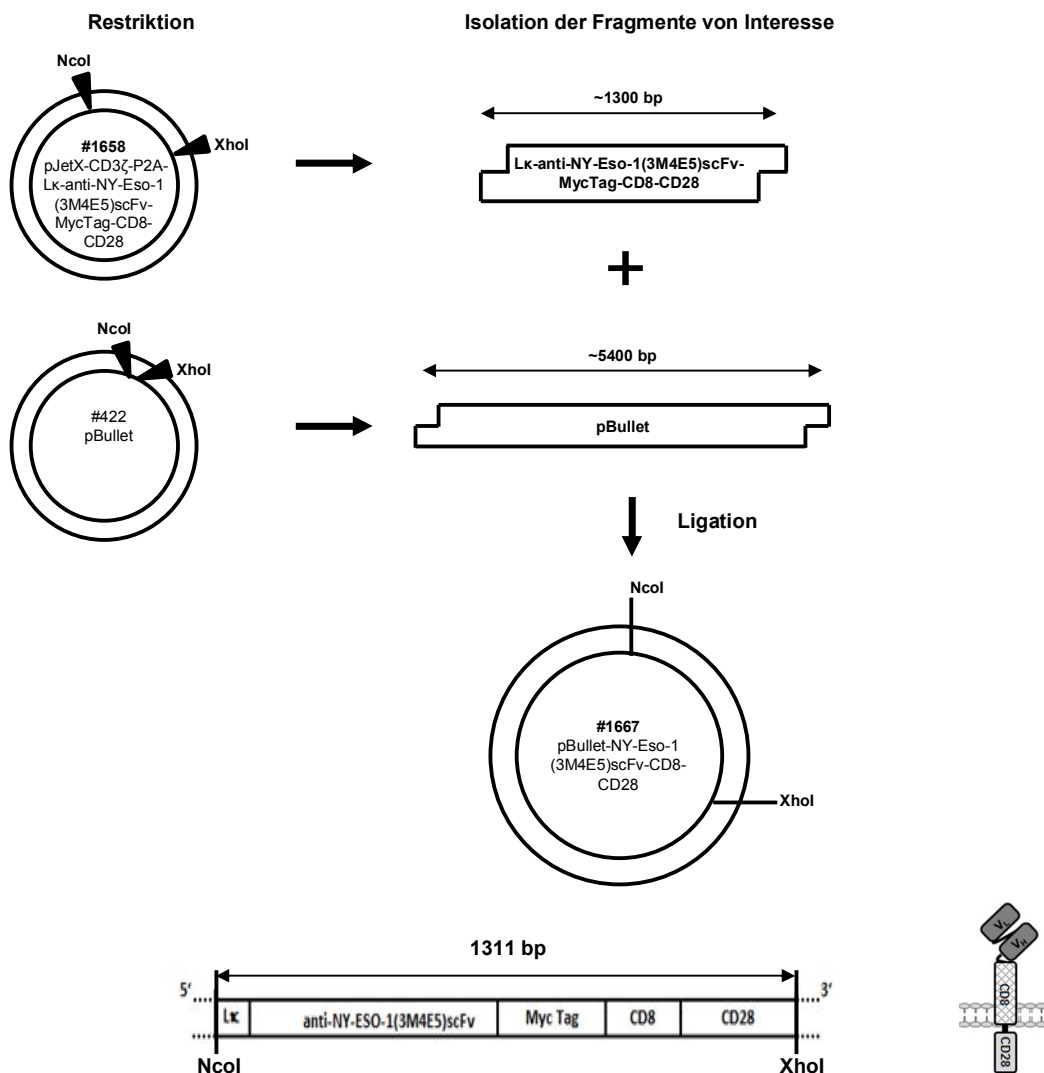


Abbildung 30 Klonierung der Expressionskassette für den CD28 CAR pBullet-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667 CAR). Die Expressionskassette für die Einzelkettenbindedomäne des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 spezifischen Antikörpers 3M4E5, der CD8 Brücken- und Transmembrandomäne sowie der CD28 kostimulatorischen Signaldomäne wurde generiert. Der MycTag zwischen Binde- und Brückendomäne dient zur Detektion des CAR. Das DNS-Fragment Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5) scFv-MycTag-CD8-CD28 wurde aus dem Plasmid #1658 mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI isoliert und in den ebenso gespaltenen linearisierten pBullet Vektor #422 ligiert.

Für die Isolierung des pBullet Vektors wurde das Plasmid #422 mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten. Der pBullet Vektor wurde mit dem Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 DNS-Fragment zu dem Konstrukt #1667 pBullet-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 ligiert. Die Sequenz des neu generierten Plasmids wurde mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 1086, 1146, 1166, 1167 verifiziert. Die annotierte DNS-Sequenz der Expressionskassette #1667 befindet sich im Anhang (siehe 6.1.2).

4.19.3 Klonierung des Plasmids pMP71-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1678 TCR, 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR)

Zur Generierung der Expressionkassette für den 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR wurde im ersten Schritt aus dem Klonierungsplasmid #1663 das DNS-Fragment P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR mittels der Restriktionsenzyme KasI und EcoRI isoliert (Abbildung 31). Das Plasmid #1662 wurde zur Isolation des DNS-Fragments Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR mit den Restriktionsenzymen NotI und KasI gespalten. Zur Erzeugung des neuen Plasmids pMP71-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1678) wurde aus dem Plasmid #1178 mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI der Expressionsvektor pMP71 isoliert und mit den DNS-Fragmenten Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR und Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR ligiert. Die Sequenz des neu generierten Plasmids wurde mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 670, 671, 809, 954, 1149 verifiziert. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassette #1678 befindet sich im Anhang (siehe 6.1.3).

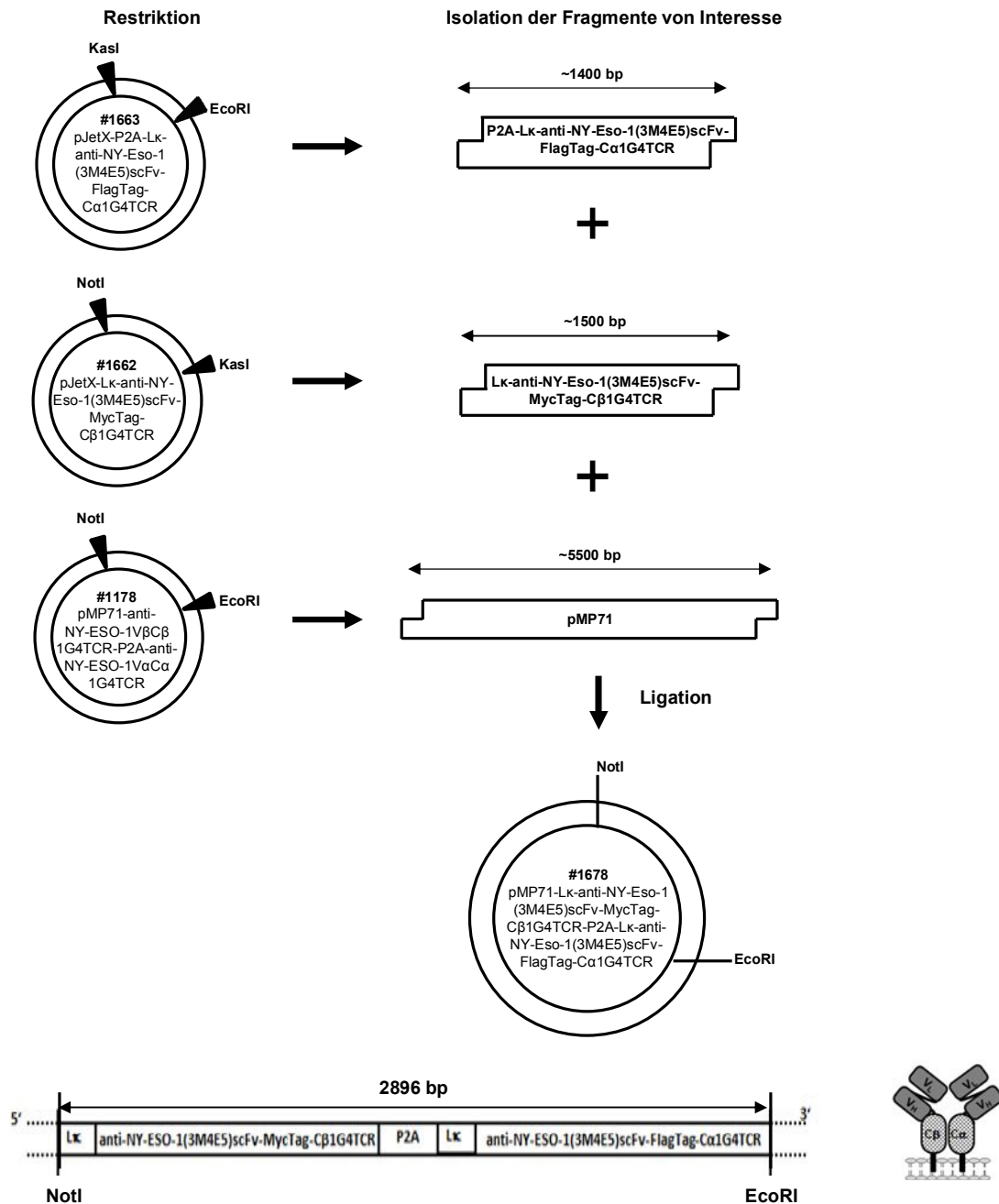


Abbildung 31 Klonierung der Expressionskassette für pMP71-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-Cβ1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTagCα1G4TCR (#1678, 2xNY-Eso-1scFvTCR). Die bicistronische Expressionskassette, welche die DNS für den Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Cβ1G4TCR und den Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Cα1G4TCR enthält, wurde mittels Restriktion der Plasmide #1663, #1662 und #1178 und anschließender Ligation der DNS-Fragmente generiert. Die DNS der Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Cβ1G4TCR Kette kodiert die Einzelkettenbindedomäne des niedriger affinen 3M4E5 scFv mit Spezifität gegen HLA-A2 präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ und die konstante β Domäne (Cβ) des anti-NY-Eso-1 TCR 1G4. Die DNS der anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Cα1G4TCR Kette kodiert die niedriger affine 3M4E5 scFv Antikörper-abgeleitete Bindedomäne und die konstante α Domäne (Cα) des anti-NY-Eso-1 TCR 1G4. Der MycTag oder FlagTag zwischen scFv und konstanter Domäne dient zur Detektion der jeweiligen Rezeptorkette. Durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) wird eine äquimolare Translation der jeweiligen scFvTCR Ketten gewährleistet.

4.19.4 Klonierung des Plasmids pMP71-Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1679 TCR, 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR)

Zur Generierung der bicistronischen Expressionkassette für den 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR wurde im ersten Schritt aus dem Klonierungsplasmid #1663 das DNS-Fragment P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR durch die Restriktionsenzyme KasI und EcoRI isoliert (Abbildung 32). Das Plasmid #1664 wurde zur Isolation des DNS-Fragments Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR mit den Restriktionsenzymen NotI und KasI gespalten. Zur Erzeugung des neuen Plasmids #1679 pMP71-Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR wurde aus dem Plasmid #1178 mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI der Expressionsvektor pMP71 isoliert und mit den DNS-Fragmenten Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR und Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR ligiert. Die Sequenz des neu generierten Plasmids wurde mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung der Oligonukleotide Nr. 663, 664, 809, 958, 1149, 1152 verifiziert. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionkassette #1679 befindet sich im Anhang (siehe 6.1.4).

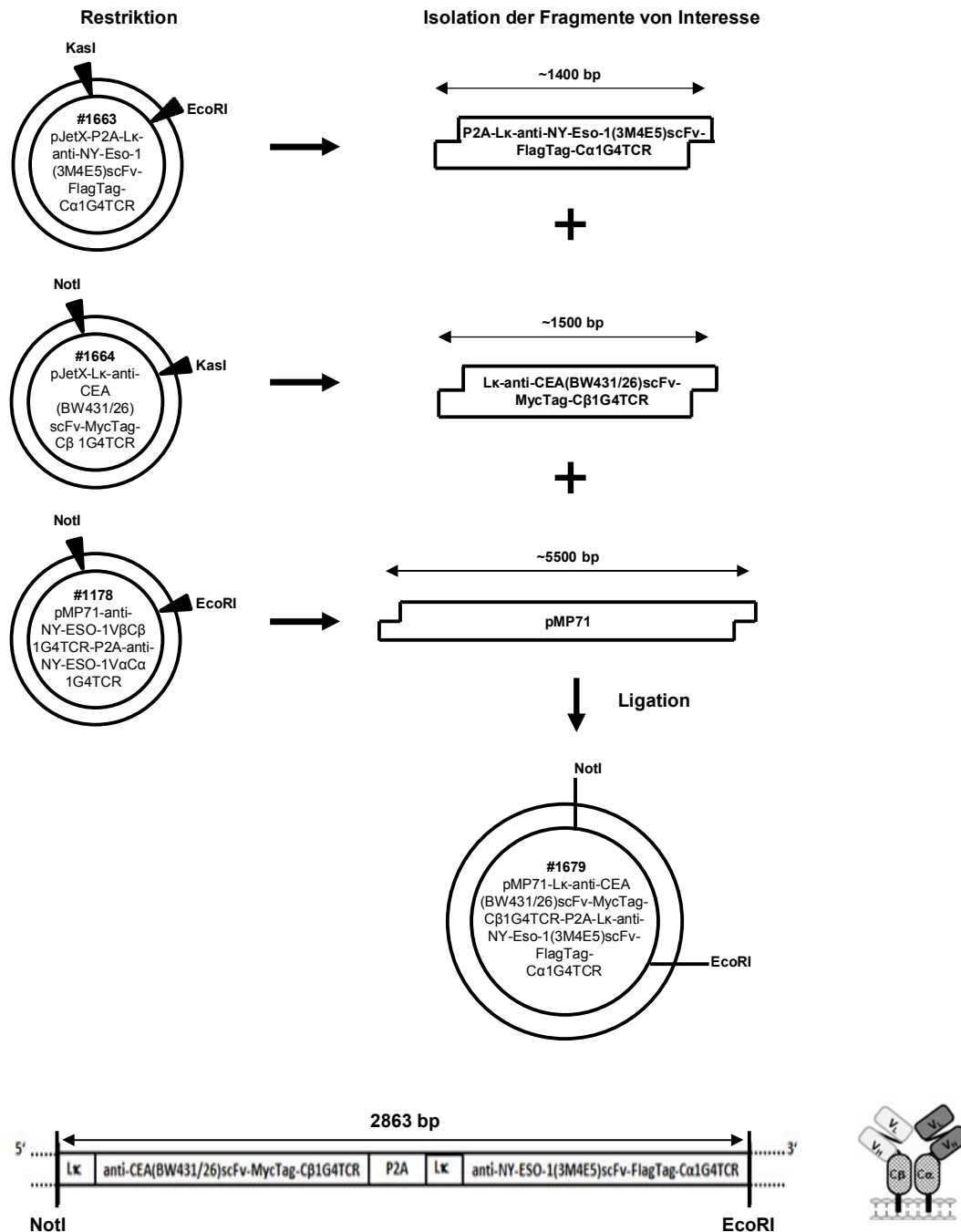
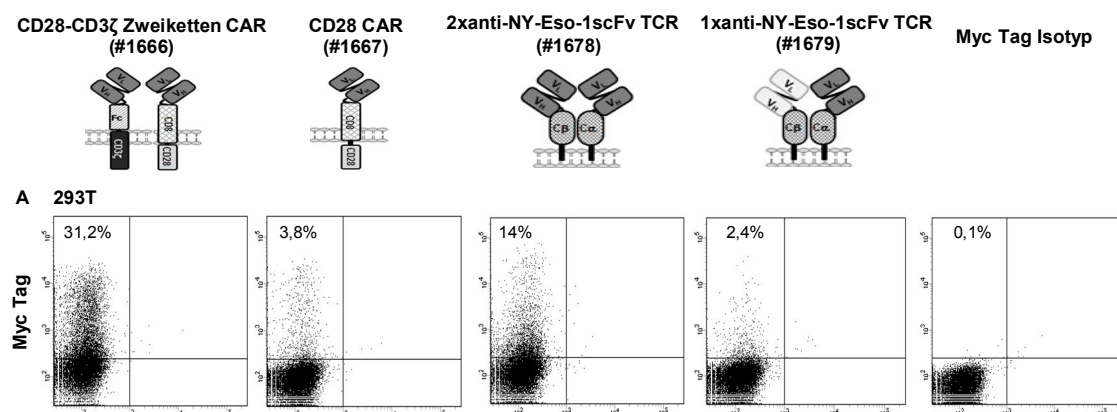


Abbildung 32 Klonierung der Expressionskassette für den pMP71-Lk-anti-CEAscFv (BW431/26)-MycTag-Cβ1G4TCR-P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-Cα1G4TCR (#1679, 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR). Die bicistronische Expressionskassette, welche die DNS für den Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-Cβ1G4TCR und den Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-Cα1G4TCR enthält, wurde mittels Restriktion der Plasmide #1663, #1664 und #1178 und anschließender Ligation der DNS-Fragmente generiert. Die DNS der Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-Cβ1G4TCR Kette kodiert die Einzelkettenbindedomäne des CEA spezifischen Antikörpers BW431/26 und die konstante β Domäne (Cβ) des anti-NY-Eso-1 TCR 1G4. Die DNS der anti-NY-Eso-1 (3M4E5)scFv-FlagTag-Cα1G4TCR Kette kodiert die niedriger affine 3M4E5 scFv Antikörper-abgeleitete Bindedomäne und die konstante α Domäne (Cα) des anti-NY-Eso-1 TCR 1G4. Der MycTag oder FlagTag zwischen scFv und konstanter Domäne dient zur Detektion der jeweiligen Rezeptorkette. Durch das 2A Peptid eines Picornavirus (P2A) wird eine äquimolare Translation der jeweiligen scFvTCR Ketten gewährleistet.

4.20 Die anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert

Ziel war es, die Expression der neuen anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ rekombinanten Rezeptor Varianten Zweiketten CAR und scFv TCRs auf der T-Zell Oberfläche zu überprüfen. Die Expression der CARs #1666 und #1667 sowie der scFvTCRs #1678 und #1679 auf Zellen der Linie HEK 293T nach Transfektion wurde nachgewiesen (Abbildung 33A). Die Modifikationen der HEK 293T Zellen mit den bicistronischen Expressionskassetten des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 und der scFvTCRs #1678 und #1679 führten zur Expression beider CARs beim #1666 oder zur Expression beider scFvTCR Ketten der #1678 und #1679 Konstrukte (Abbildung 33B). Ebenso wurden die rekombinanten Rezeptoren der Konstrukte #1666, #1667, #1678 und #1679 nach retroviraler Transduktion auf T-Zellen exprimiert (Abbildung 33C). Der scFvTCR #1679 mit zwei anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ scFv's wurde in höherer Dichte auf T-Zellen exprimiert als der scFvTCR #1679 mit nur einem anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ scFv. Die anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ CARs #1666 und #1667 wurden beide auf T-Zellen mit annähernd gleichem Expressionsniveau exprimiert. Die Koexpression der #1666 bicistronischen Expressionskassette des CD3 ζ Primärsignalgeber CAR zusammen mit dem kostimulatorischen CD28 CAR auf T-Zellen stellt Abbildung 33D dar.

Es wurde gezeigt, dass alle neuen anti-NY-Eso-1 Rezeptor Varianten auf T-Zellen exprimiert werden; der 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1679 wurde allerdings so gering exprimiert, dass er für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurde.



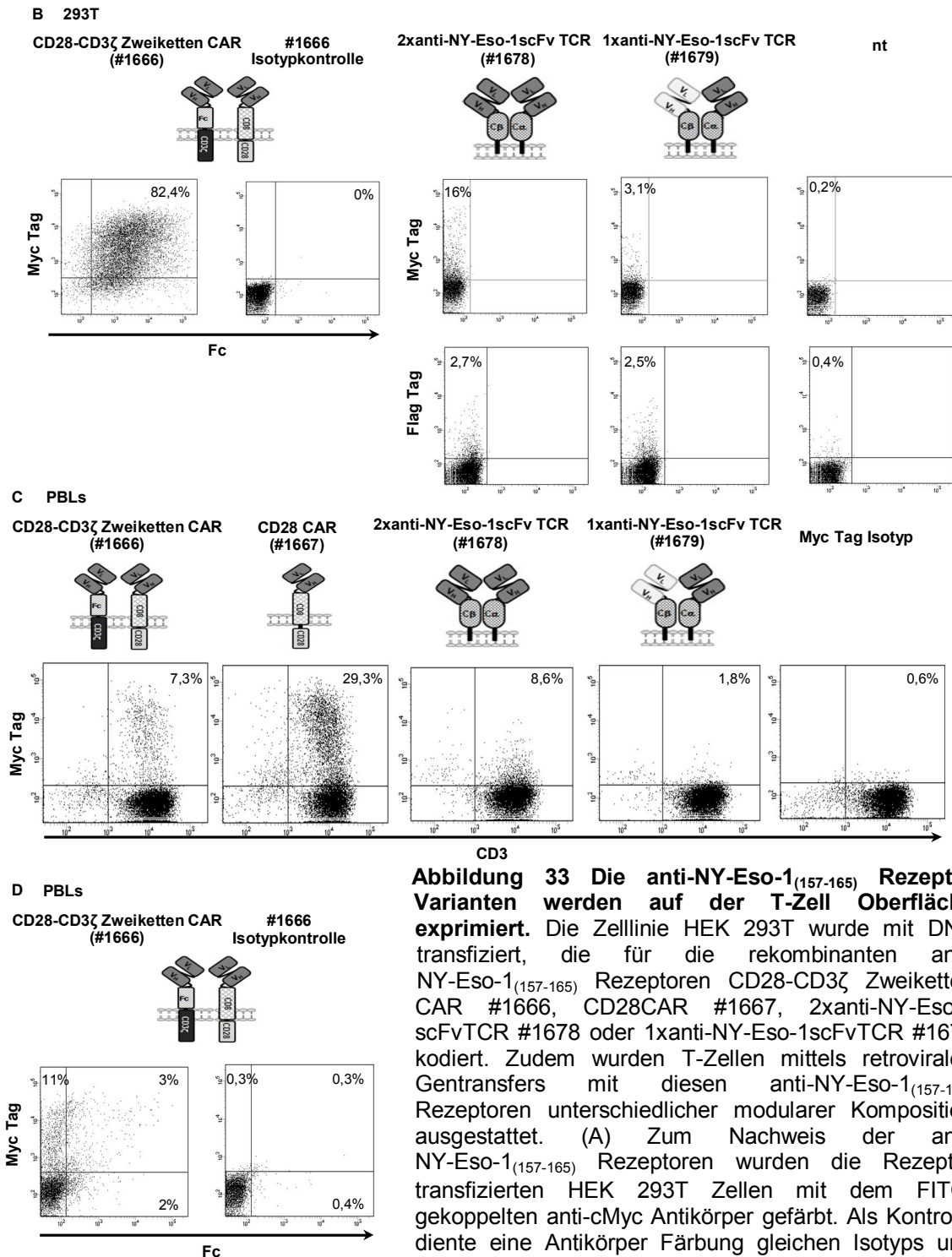


Abbildung 33 Die anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptor Varianten werden auf der T-Zell Oberfläche exprimiert. Die Zelllinie HEK 293T wurde mit DNS transfiziert, die für die rekombinanten anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666, CD28CAR #1667, 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1678 oder 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1679 kodiert. Zudem wurden T-Zellen mittels retroviralen Gentransfers mit diesen anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren unterschiedlicher modularer Komposition ausgestattet. (A) Zum Nachweis der anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren wurden die Rezeptor transfizierten HEK 293T Zellen mit dem FITC-gekoppelten anti-cMyc Antikörper gefärbt. Als Kontrolle diente eine Antikörper Färbung gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität. (B) Die Koexpression beider CARs des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 wurde auf transfizierten HEK 293T durch gleichzeitige Färbung mit dem FITC-gekoppelten anti-cMyc Antikörper und dem anti-IgG1 Fab Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Färbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität. Zum Nachweis, dass beide Ketten der scFvTCRs exprimiert wurden, wurden die scFvTCR transfizierten HEK 293T mit dem FITC-gekoppelten anti-cMyc Antikörper oder dem PE-gekoppelten anti-Flag Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienten untransfizierte (nt) HEK 293T Zellen. (C) Die Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden mit dem FITC-gekoppelten anti-cMyc Antikörper gefärbt. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch den APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle diente ein anti-cMyc Antikörper gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität. (D) Die Koexpression beider CARs des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 auf T-Zellen wurde durch gleichzeitige Färbung mit dem FITC-gekoppelten anti-cMyc

Antikörper und dem anti-IgG1 Fab Antikörper gezeigt. Die T-Zellen wurden zusätzlich durch den APC-gekoppelten anti-CD3 Antikörper identifiziert. Als Kontrolle dienten Färbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps und irrelevanter Spezifität. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch.

4.21 Die Expressionsdichte des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR ist niedriger im Vergleich zum Einketten CAR CD3 ζ und CD28CD3 ζ

Die Expressionsdichte des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 wurde mit der des CD28CD3 ζ Einketten CAR #1046 verglichen. Dazu wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten des CD28-CD3 ζ CAR #1666 und des CD28CD3 ζ CAR #1046 nach Expression auf T-Zellen ermittelt. Zum Vergleich wurden die Expressionen des CD3 ζ CAR #1044 bestimmt. Es zeigte sich, dass der CD3 ζ CAR niedriger exprimiert wurde, wenn er als Teil des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 exprimiert wird im Vergleich zur alleinigen Expression wie beim CD3 ζ CAR #1044 (Abbildung 34). Die höchste MFI zeigte der CD28CD3 ζ CAR #1046.

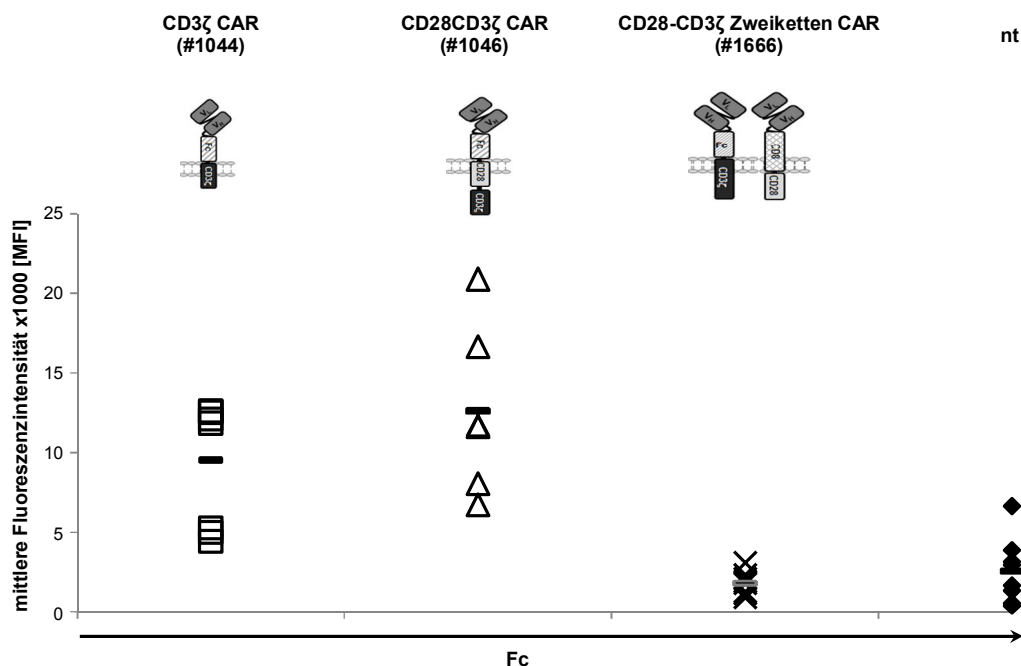


Abbildung 34 Die Expressionsdichte des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR im Vergleich zum klassischen CD3 ζ CAR und CD28CD3 ζ CAR. T-Zellen wurden mittels retroviralen Gentransfer mit den anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ CAR Konstrukten #1044, #1046 oder #1666 transduziert. Zum Nachweis der anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren wurden die CAR modifizierten T-Zellen mit dem anti-IgG1 Fab Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden nicht-modifizierte T-Zellen (nt) ebenfalls mit dem anti-IgG1 Fab Antikörper gefärbt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 und CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. In dem Diagramm sind die Messungen (\square , Δ , \times , \blacklozenge) unterschiedlicher Tests dargestellt. Die Mittelwerte der jeweiligen CAR sind als schwarze Balken dargestellt. Die abgebildeten Rezeptoren sind CD3 ζ CAR #1044 (n=9, \square), CD28CD3 ζ CAR #1046 (n=7, Δ), CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 (n=9, \times) und nicht-modifizierte T-Zellen (nt) (n=9, \blacklozenge).

CD3 ζ CAR #1044 und CD28CD3 ζ CAR #1046 wiesen eine höhere Anzahl Fc Brückendomänen auf T-Zellen auf als der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666.

4.22 Der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 vermittelt eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ abhängige Aktivierung der T-Zelle

Es wurde untersucht, ob der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 die modifizierten T-Zellen spezifisch durch Bindung an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 Moleküle aktiviert. Dazu wurde der koexprimierte CD3 ζ CAR des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 über die Fc Brückendomäne aktiviert. Die CAR modifizierten T-Zellen #1044 oder #1666 wurden auf immobilisiertem anti-human IgG inkubiert und die T-Zell Aktivierung anhand der IFN- γ Freisetzung bestimmt (Abbildung 35A). CD28-CD3 ζ CAR #1666 modifizierte T-Zellen und CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen wurden durch Bindung ihrer Fc Brückendomäne an den immobilisierten anti-human IgG Antikörper aktiviert. Die anti-human IgG Antikörper Inkubationen mit nicht-modifizierten T-Zellen und TCR #1178 modifizierten T-Zellen führte zu keiner Aktivierung. Als Kontrolle diente die Inkubation der Rezeptor modifizierten T-Zellen mit den immobilisierten agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern, die zu einer endogenen TCR und CD28 induzierten T-Zell Aktivierung bei allen Rezeptor modifizierten T-Zellen führte. Als Kontrolle diente weiterhin die Inkubation mit dem irrelevanten Maus IgG Antikörper, die keine IFN- γ Freisetzung der Rezeptor modifizierten T-Zellen induzierte. Der koexprimierte CD3 ζ CAR des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 vermittelt eine T-Zell Aktivierung, da die Fc Brückendomäne die Signalübertragung auf die CD3 ζ Kette weiterleitete.

Um zu zeigen, dass der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 das HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid erkennt, wurde die Bindung an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 beladene Multimere durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 35B). Die HLA-A2 präsentierenden NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ PE-gekoppelten Multimere binden an T-Zellen, die den CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 exprimierten. Nicht modifizierte T-Zellen zeigten keine Bindung der Multimere.

Es wurde zudem untersucht, ob die CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 modifizierten T-Zellen spezifisch durch Bindung an ihr HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen aktiviert wurden. Dazu wurden CD3 ζ CAR #1044, CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 sowie TCR #1178 modifizierte T-Zellen mit NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ beladenen

HLA-A2 Multimeren kokultiviert (Abbildung 35C). Es zeigte sich, dass bei allen Rezeptor modifizierten T-Zellen eine IFN- γ Freisetzung induziert wurde.

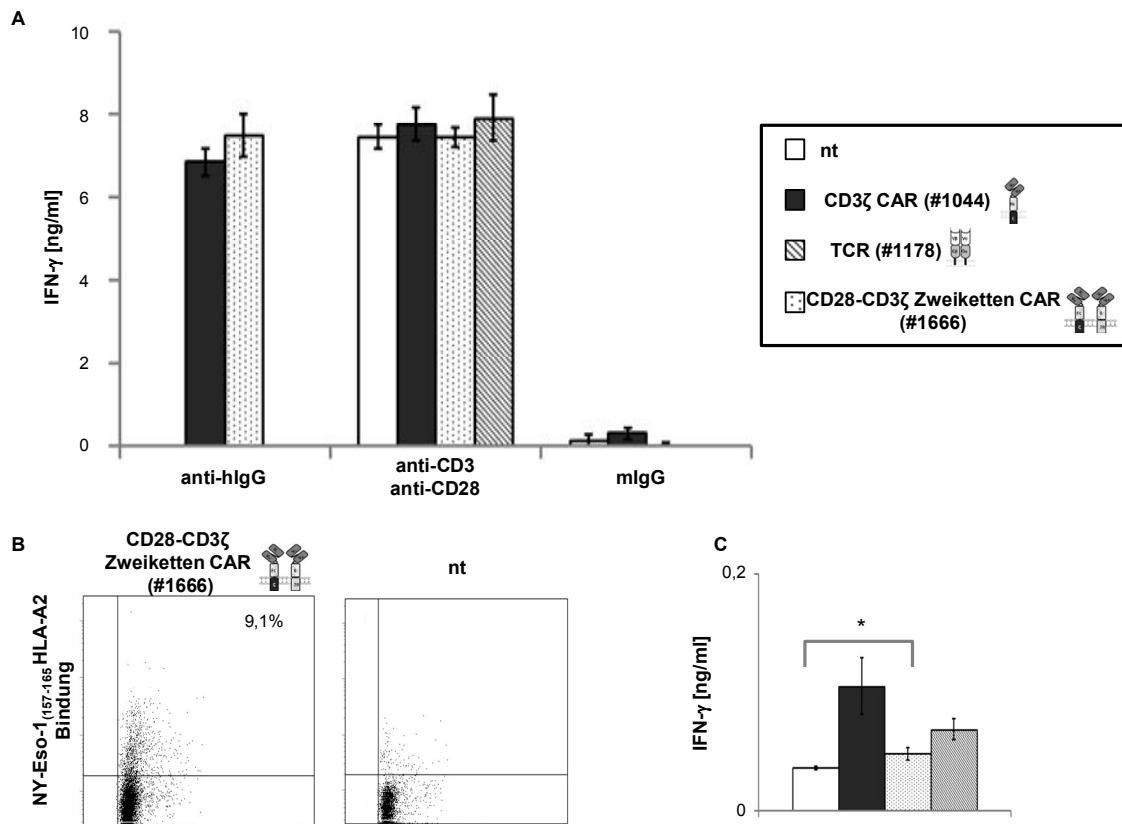


Abbildung 35 Der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 vermittelt eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ abhängige Aktivierung der T-Zelle. Die rekombinanten Rezeptoren CD3 ζ CAR #1044, CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 oder der TCR #1178 wurden auf T-Zellen exprimiert. (A) Pro Vertiefung wurden 4×10^4 Rezeptor modifizierte T-Zellen mit immobilisiertem anti-human IgG (Beschichtungskonzentration $2 \mu\text{g/ml}$) 48 h inkubiert. Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation mit immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (Beschichtungskonzentration $1 \mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 Antikörper (Beschichtungskonzentration $5 \mu\text{g/ml}$) oder mit Maus IgG (mIgG) (Beschichtungskonzentration $2 \mu\text{g/ml}$). Als Vergleich dienten TCR #1178 modifizierte T-Zellen und nicht-modifizierte T-Zellen. Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt.

T-Zellen wurden zur Expression des CD3 ζ CAR #1044, des CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 oder des TCR #1178 retroviral transduziert. Pro Vertiefung wurden $2,5 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit Multimer-Bead-Komplexen 48 h inkubiert. Als Vergleich dienten unmodifizierte T-Zellen (nt). Die Multimer-Bead-Komplexe wurden gewonnen, indem die PE-gekoppelten Multimere mit anti-PE MicroBeads 1 h inkubiert wurden. (B) Zum Nachweis der Bindung an HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ wurden die Zweiketten CAR #1666 modifizierten T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten unmodifizierte T-Zellen (nt). (C) Die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen dieser NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Multimer Stimulation wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten (A,C) repräsentieren Mittelwerte von vierfach Bestimmungen \pm SEM. Die Signifikanz der IFN- γ Sekretion wurde mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^* < 0,01$ bestimmt.

CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 modifizierte T-Zellen wiesen eine niedrigere IFN- γ Konzentration im Überstand verglichen zu CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen oder TCR #1178 T-Zellen auf. Die als Kontrolle mitgeführten unmodifizierten T-Zellen zeigten keine IFN- γ Freisetzung. Wir schließen daraus, dass die Zweiketten CAR #1666 modifizierten T-Zellen spezifisch durch HLA-A2 präsentierte NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid aktiviert wurden.

4.23 Die T-Zell Aktivierung des anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Zweiketten CAR und des 2xscFvTCR nach Antigenerkennung ist geringer als die der anderen anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Rezeptoren

Die vorhergehenden Untersuchungen ergaben, dass die CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 modifizierten T-Zellen eine NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigen spezifische T-Zell Antwort induzierten. Es galt zu klären, ob durch Trennung der stimulatorischen Signale CD3 ζ und CD28 die T-Zell Aktivierung ähnlich der des TCR #1178 ist. Dazu wurden die rekombinanten Rezeptoren CD3 ζ CAR #1044, CD28CD3 ζ CAR #1046 und TCR #1178 sowie die neuen anti-NY-Eso-1 Rezeptor Varianten CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 und 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1678 auf T-Zellen exprimiert und mit den Zielzellen T21B kokultiviert. Als Kontrolle wurden CD28 CAR #1667 modifizierte T-Zellen und unmodifizierte T-Zellen mitgeführt. Des Weiteren wurden T2 Zellen als Kontrolle eingesetzt. Der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 induzierte eine IFN- γ Sekretion der T-Zellen (Abbildung 36). Allerdings war die in den Kulturüberstand freigesetzte IFN- γ Konzentration der CD28-CD3 ζ Zweiketten CAR #1666 T-Zellen geringer als die der TCR #1178 T-Zellen, CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen und CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Die 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1678 T-Zellen wiesen überraschenderweise keine IFN- γ Freisetzung auf. Es zeigte sich keine IFN- γ Sekretion der Rezeptor modifizierten T-Zellen bei Koinkubation mit T2 Zellen. Die unmodifizierten T-Zellen und CD28 CAR #1667 modifizierte T-Zellen sezernierten erwartungsgemäß weder bei Inkubation mit T2 noch mit T21B Zellen IFN- γ .

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Trennung der stimulatorischen Signale auf zwei CARs beim anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ spezifischen CAR die IFN- γ Freisetzung verringert im Vergleich zu Einketten CARs.

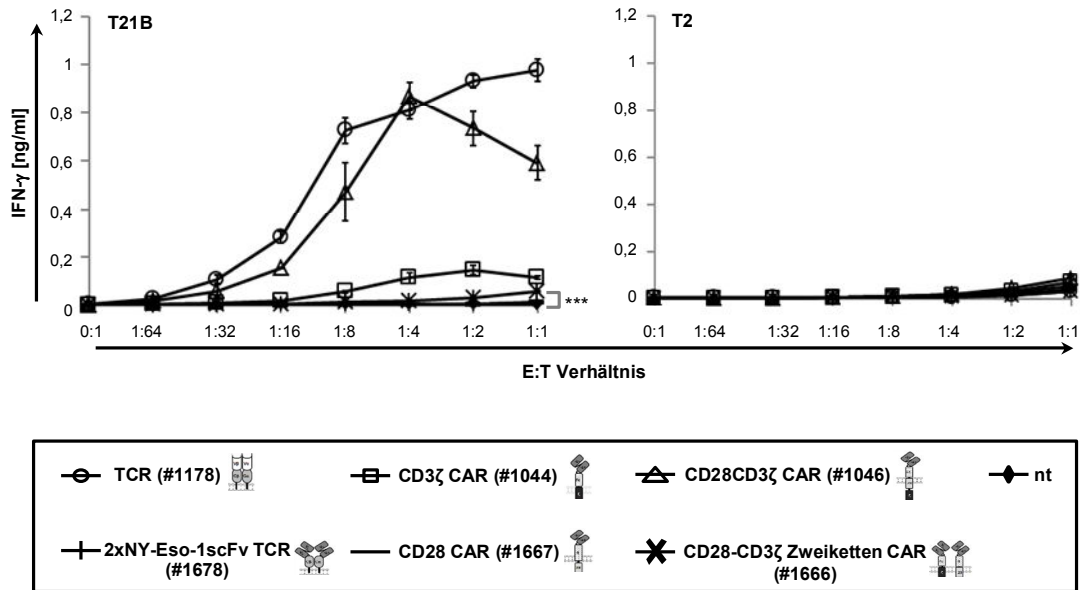


Abbildung 36 Die T-Zell Aktivierung des anti-NY-Eso-1 Zweiketten CAR und des 2xanti-NY-Eso-1scFv-TCR nach Antigenerkennung ist geringer als die der anderen anti-NY-Eso-1 Rezeptoren. Um die T-Zell Aktivierung der neuen anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ rekombinanten Rezeptor Varianten zu untersuchen, wurden die CARs CD3ζ CAR #1044, CD28CD3ζ CAR #1046 und TCR #1178 sowie die neuen anti-NY-Eso-1 Rezeptor Varianten CD28-CD3ζ Zweiketten CAR #1666 und 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR #1678 zur Expression in T-Zellen retroviral transduziert und pro Vertiefung $2,5 \times 10^4$ Rezeptor modifizierte T-Zellen mit $2,5 \times 10^4$ Zielzellen T2 (NY-Eso-1⁻) oder T21B (NY-Eso-1⁺) kokultiviert. Die Rezeptor modifizierten T-Zellen wurden verdünnt, so dass Effektorzell zu Zielzell Verhältnisse (E:T Verhältnis) von 1:1 bis 1:64 getestet wurden. Das E:T Verhältnis 0:1 repräsentiert $2,5 \times 10^4$ Zielzellen ohne T-Zellen. Als Vergleich dienten unmodifizierte (nt) T-Zellen. Die Rezeptor modifizierten T-Zellen #1044, #1046, #1178, #1666, #1667 und #1678 wurden auf die gleiche Gesamtzellzahl pro Vertiefung normiert. Die T2 (NY-Eso-1⁻) Zellen dienen als Kontrolle. Es wurde die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Triplikaten \pm SEM. Die Signifikanzen der Vergleiche wurden bestimmt mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test mit $p^{***} \leq 0,00001$. Im T-Test wurden die CD28-CD3ζCAR #1666 T-Zellen gegen nicht modifizierte T-Zellen verglichen.

5 Diskussion

Bei der adoptiven Immuntherapie erzielt die Rezeptor modifizierte T-Zell Therapie gegen Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) in klinischen Studien anhaltende Remissionen (Maude et al., 2014; Rapoport et al., 2015; Robbins et al., 2015; Singh et al., 2016). Bei den eingesetzten Immunrezeptoren werden unterschiedliche Rezeptorformate verwendet, um eine T-Zell Aktivierung nach Antigenerkennung zu induzieren. Der rekombinante TCR vermittelt das Signal wie der physiologische TCR im Rahmen eines TCR/CD3 Komplexes. Im Gegensatz dazu bedient sich der CAR der TCR Signaldomänen, die im intrazellulären Teil des CAR in Reihe fusioniert sind und somit eine andere räumliche Anordnung als die Signalketten des TCR aufweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede der T-Zell Aktivierung durch CAR und TCR Rezeptorformate zu erarbeiten. Hierfür wurden experimentelle Bedingungen auf Basis der gleichen Antigenerkennung im gleichen molekularen Kontext geschaffen, die einen Vergleich unter standardisierten Bedingungen ermöglichen.

Da der TCR eine MHC-abhängige Antigenerkennung aufweist, wurde für den CAR eine Antikörper-abgeleitete Bindedomäne generiert, die das Antigen im MHC erkennt. Die Antikörper-abgeleiteten scFv Bindedomänen 3M4E5 und FabT1 sind geeignete Antigenerkennungsstrukturen, da sie an NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid im HLA-A2 Kontext binden wie der anti-NY-Eso-1 TCR 1G4 (Stewart-Jones et al., 2009). HLA-A2 präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid wird in dieser Arbeit als Modell-Antigen verwendet. Darüber hinaus ist NY-Eso-1 eine interessante Zielstruktur, da es als Tumor-assoziiertes Antigen auf einer Vielzahl hämatologischer und solider Tumore überexprimiert wird und physiologisch nur in MHC I defizienten Keimzellen vorkommt (Chen et al., 1996). In dieser Arbeit wurden die anti-NY-Eso-1 scFv's 3M4E5 und FabT1 als Bindedomänen der CARs verwendet. Als TCR wurde der anti-NY-Eso-1 TCR 1G4 verwendet (Chen et al., 2005). Wir zeigten, dass die CARs mit den scFv Antikörper-abgeleiteten Bindedomänen 3M4E5 (#1044, #1046) und FabT1 (#1189, #1190) sowie der rekombinante 1G4 TCR #1178 nach Expression auf T-Zellen spezifisch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid im Kontext mit HLA-A2 binden. Dies wurde anhand einer Multimer Färbung nachgewiesen. Die Antigen vermittelte T-Zell Aktivierung ist spezifisch, da weder das NY-Eso-1₍₁₅₅₋₁₆₃₎ Peptid einer anderen NY-Eso-1 Sequenz im HLA-A2 Kontext noch das HLA-A2 einer NY-Eso-1 negativen Zelle erkannt werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass ein MHC-abhängiger CAR die Zielstruktur spezifisch bindet und eine T-Zell Aktivierung mit Freisetzung proinflamm-

matorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α sowie eine spezifische Zytolyse induzieren kann.

Der CD3 ζ CAR ähnelt dem TCR dahingehend, dass auch beim TCR der CD3 Komplex die primäre Signal-gebende Einheit bildet. Durch die Homodimerisierung des CD3 ζ CAR ist die Anordnung der CD3 ζ Ketten ähnlich der des TCR. Zudem ist der CD3 ζ CAR in der Lage, mit der endogenen CD3 ζ Kette zu heterodimerisieren und somit in den TCR/CD3 Komplex zu integrieren (Bridgeman et al., 2010). Der CD3 ζ CAR kann demnach den TCR Signalkomplex mit CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ zur T-Zell Aktivierung verwenden. Wir verglichen den CD3 ζ CAR mit dem TCR in Bezug auf das T-Zell Aktivierungspotenzial. TCR modifizierte T-Zellen induzieren eine höhere Zytolyse und haben eine niedrigere Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle als CD3 ζ CAR T-Zellen. Die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle wird hier definiert als die niedrigste NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigenmenge, die eine Sekretion des Zytokines über Hintergrund induziert. Diese Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle kennzeichnet im Gegensatz zur ED50 die Induktion der T-Zell Aktivierung in Abhängigkeit von der Antigendosis. Dies spielt eine besondere Rolle bei geringen Antigen-Mengen und beschreibt die Sensitivität des Rezeptors zu seinem Antigen. Dies ist in der Rezeptor modifizierten T-Zell Therapie von Bedeutung, um zwischen gesundem Gewebe und Tumorzellen zu differenzieren. Als Marker für die Rezeptor vermittelte T-Zell Aktivierung bestimmten wir die IFN- γ Freisetzung. Andere proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α verhalten sich wie IFN- γ . Wir nehmen deswegen an, dass die aus der IFN- γ Bestimmung gewonnenen Daten der Aktivierungsschwellen repräsentativ für andere proinflammatorische Zytokine sind.

Der 3M4E5 scFv CD3 ζ CAR #1044 hat eine höhere Affinität, exprimiert mehr CAR Moleküle auf der Oberfläche und bindet mehr NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Multimere als der 1G4 TCR #1178. Obwohl der TCR eine niedrigere Affinität hat und weniger Antigen bindet als der CD3 ζ CAR #1044, benötigen T-Zellen mit rekombinantem TCR eine geringere Anzahl modifizierter T-Zellen und weniger Antigen zur Induktion derselben IFN- γ Konzentration wie CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Um eine B7-CD28 Kostimulation auszuschließen, verwendeten wir die B7⁻ SK-MEL-37 NY-Eso-1 Zielzellen, die endogen prozessiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ HLA-A2 exprimieren und keine B7-CD28 Kostimulation induzieren. Die CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen induzieren auch ohne CD28 eine niedrigere T-Zell Aktivierung und induzieren eine niedrigere primäre Tumorzelleliminierung in vivo als die TCR #1178 modifizierten T-Zellen. Der CD3 ζ CAR scheint nach Antigenerkennung weniger effizient mit den nachgeordneten CD3

Signaleinheiten des TCR oder den Korezeptoren wie CD8 und CD28 zu interagieren als der rekombinante TCR #1178. Sollte beim CD3 ζ CAR die Rekrutierung der Signalkomplexe anders verlaufen wie beim TCR, stehen dem CAR die CD3 Untereinheiten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ für die Signalamplifikation möglicherweise nicht zur Verfügung. Zudem könnte bei der CAR-MHC Interaktion die Assoziation des CD8 Korezeptors fehlen. Dadurch kommt die CD8 assoziierte Lck Kinase nicht wie beim TCR in räumliche Nähe der ITAMs des CD3 ζ , was die höhere Aktivierungsschwelle der CD3 ζ CAR T-Zell begründen könnte (Casas et al., 2014).

Wir untersuchten den Einfluss des B7-CD28 kostimulatorischen Effekts auf die TCR #1178 und CD3 ζ CAR #1044 induzierte T-Zell Aktivierung und zeigten, dass die B7 Liganden der Zielzelle mit endogenem CD28 auf CAR T-Zellen interagieren können, da die IFN- γ Freisetzung und zytolytische Aktivität der CAR modifizierten T-Zelle in Gegenwart von B7 Molekülen verstärkt ist. Die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle der TCR #1178 modifizierten T-Zellen ist bei den B7⁺ Tumorzellen gegenüber den CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen stärker erniedrigt als bei den B7⁻ Tumorzellen. Der physiologische TCR/CD3 Komplex erfährt durch die Bindung des CD28 Korezeptors an dessen Liganden eine Verstärkung der T-Zell Antwort, da die CD28-B7 Interaktion zu einer erhöhten TCR-CD3 Dichte in der interagierenden Region der Synapse führt (Viola et al., 1999). Allerdings induzieren TCR modifizierte T-Zellen auch ohne CD28 Kostimulation eine höhere T-Zell Aktivierung und haben eine niedrigere Aktivierungsschwelle als die CD3 ζ CAR #1044 modifizierten T-Zellen. Somit erhält der rekombinante TCR #1178 eine gesteigerte T-Zell Aktivierung gegenüber dem CD3 ζ CAR #1044 nicht nur durch das CD28 Signal, sondern auch durch die höhere TCR-CD3 Dichte im cSMAC der immunologischen Synapse. Demnach begünstigt der CD28 Korezeptor die Funktionalität des rekombinanten TCR #1178 und macht ihn noch sensitiver gegenüber dem Antigen.

Die CD28 kostimulatorische Domäne wurde in den CAR integriert, um die schwache T-Zell Aktivierung des CD3 ζ CAR zu verstärken (Finney et al., 1998). Der CD28CD3 ζ CAR #1046 besitzt eine gleich hohe Affinität wie der CD3 ζ CAR #1044, wird stärker auf T-Zellen exprimiert und bindet spezifisch das NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid im HLA-A2 Kontext. Die höhere CD28CD3 ζ CAR #1046 Expression kommt möglicherweise durch die CD28 Transmembrandomäne zustande, die den Rezeptor besser stabilisiert als die CD3 ζ Transmembrandomäne des CD3 ζ CAR #1044 (Savoldo et al., 2011). Unsere Untersuchungen der Antigen-abhängigen T-Zell Aktivierung zeigen eine höhere IFN- γ Freisetzung bei niedrigerer Zellzahl der CD3 ζ CAR T-Zellen mit integrierter CD28

Domäne (#1046) gegenüber den CD3 ζ CAR #1044 T-Zellen. Die integrierte CD28 Domäne im CAR löst eine stärkere IFN- γ Freisetzung aus als die endogene CD28 Kostimulation der CAR T-Zellen nach Interaktion mit B7⁺ Tumorzellen. Allerdings nimmt die kostimulatorische CD28 Domäne im CAR keinen Einfluss auf die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle, da sowohl der CD3 ζ CAR #1044 als auch der CD28CD3 ζ CAR #1046 bei B7⁺ oder bei B7⁻ NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎⁺ Zielzellen bei gleicher Antigendichte gleich effizient eine IFN- γ Freisetzung induzieren. Dieses wurde ebenfalls für die MHC-unabhängige CAR induzierte T-Zell Aktivierung beschrieben (Chmielewski et al., 2011).

TCR #1178 modifizierte T-Zellen haben eine niedrigere Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle und induzieren eine stärkere T-Zell Aktivierung als die CD28CD3 ζ CAR #1046 modifizierten T-Zellen unabhängig davon, ob B7 Liganden auf den Zielzellen exprimiert werden. Die Daten bestätigen, dass der TCR eine höhere Sensitivität zum Antigen hat als der CAR (Oren et al., 2014; Stone et al., 2014). Der TCR zeigt eine höhere Sensitivität als der CAR. Dieses ist auch der Fall, wenn der CD28CD3 ζ CAR #1046 das kostimulatorische Signal nach Antigenbindung erfährt. Dementsprechend induziert die CD28 kostimulatorische Domäne des CAR keine Erniedrigung der Antigen-abhängigen Aktivierungsschwelle, sondern steigert die Effektorfunktionen der CAR T-Zellen.

Der CD28CD3 ζ #1046 CAR induziert eine erhöhte Anzahl T_{EMRA} Zellen mit CD62L⁻ CD45RO⁻ Phänotyp, wohingegen bei TCR modifizierten T-Zellen eine höhere Anzahl T_{EM} Zellen mit CD62L⁻ CD45RO⁺ Phänotyp gefunden wurde. Das schnellere Altern der CD28CD3 ζ CAR T-Zellen könnte durch ein autonomes CD28 Signal mit gesteigerter Selbstamplifikation induziert werden, was in Übereinstimmung mit der hohen persistierenden Zellzahl der CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen in vivo steht. Dieser höhere T_{EMRA} Charakter der CD28CD3 ζ #1046 T-Zellen geht in vivo jedoch nicht mit einem kurzzeitigen Aktivitätsverlust einher, denn CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen persistieren 31 Tage im Mausmodell und sind nach dieser Zeit mit dem NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid restimulierbar. Niedrig affine anti-NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ CD28CD3 ζ CAR T-Zellen persistieren mehr als 30 Tage im Mausmodell und induzieren einen anti-Tumor Effekt gegen Antigen positive Zielzellen (Maus et al., 2016). Dies stützt unsere Beobachtung zur Restimulation und Persistenz der CD28CD3 ζ CAR #1046 T-Zellen.

Die Rezeptor induzierte T-Zell Antwort ändert sich im zeitlichen Verlauf, wobei die TCR #1178 modifizierten T-Zellen eine verstärkte Zytotoxizität induzieren, während die zytolytische Aktivität der CAR T-Zellen gegen Tumorzellen schwächer wurde. Das geht mit der höheren Anzahl T_{EM} Zellen in der TCR #1178 T-Zell Population einher. Gedächtnis T-Zellen haben größere Lipid Rafts als naive T-Zellen (Kumar et al., 2011). Eine Rezeptor Diffusion in oder aus diesen Rafts wird durch Ankerproteine inhibiert. Durch die niedrigere TCR Diffusion besteht eine längere Verweildauer in den Rafts, was eine höhere Rezeptor Aggregation im TCR Cluster begünstigt (Castro et al., 2014). Kommt es im TCR Cluster zu einer Antigen-induzierten Konformationsänderung des Rezeptors, kann dies auf alle TCRs im gleichen Cluster übertragen werden. Große Cluster profitieren von dieser Konformationsänderung, was mit einer Signalverstärkung einhergeht (Blanco und Alarcón, 2012). Somit sind TCR modifizierte T_{EM} Zellen effektiver in der Antigen-abhängigen T-Zell Aktivierung als TCR modifizierte naive T-Zellen. Die Formierung der Rafts scheint für den CAR anders zu sein, da dessen zytolytische Aktivität abnimmt bei Zunahme der Differenzierung zu T_{EMRA} Zellen.

Tabelle 2 Bindedomänen und ihre Eigenschaften

Binde-domäne	Antigen	Peptidsequenz	$K_{Ass.}$ mol ⁻¹ s ⁻¹	$K_{Dis.}$ s ⁻¹	K_D nM	Literatur
3M4E5	NY-Eso-1	SLLMWITQV	80.850	0,003620	46	Stewart-Jones et al., 2009
		SLLMWITQC	93.700	0,004225	47	
FabT1	NY-Eso-1	SLLMWITQV	249.000	0,000835	4	Stewart-Jones et al., 2009
		SLLMWITQC	138.375	0,000674	2	
1G4 TCR	NY-Eso-1	SLLMWITQV	53.425	0,078	1.460	Stewart-Jones et al., 2009
		SLLMWITQC	87.500	0,357	4.080	
DN	NY-Eso-1	SLLMWITQV	56.000	0,0401	715	Maus et al., 2016
		SLLMWITQC	90.100	0,0606	672	
F2	WT1 _{Db126}	RMFPNAPYL			400	Oren et al., 2014
F3	WT1 _{Db126}	RMFPNAPYL			30	Oren et al., 2014
m33	SIY	SIYRYYGL			30	Stone et al., 2014
m33 TCR	SIY	SIYRYYGL			30	Stone et al., 2014

Eine Erhöhung der Affinität des anti-NY-Eso-1 TCR auf supraphysiologische Bindungsaffinität führt zu einer Antigen-unabhängigen T-Zell Aktivierung aufgrund der NY-Eso-1 Peptid-unabhängigen Bindung an das MHC Rückgrat. Die Affinität für den anti-NY-Eso-1 TCR mit spezifischer Antigenerkennung liegt bei 450 nM bis 4 µM (Zhao et al., 2007). Unser anti-NY-Eso-1 TCR 1G4 hat eine Affinität von K_D 1.460 nM (Tabelle

2). Wir zeigten die Spezifität des 1G4 TCR #1178 für MHC präsentiertes NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid. Um den Einfluss der CAR Affinität bei der MHC-abhängigen Antigenerkennung zu definieren, untersuchten wir, ob eine Affinitätserhöhung der Bindedomäne des CAR einen Einfluss auf die Aktivierungsschwelle hat. Dazu nutzten wir die 4 nM affine FabT1 scFv Bindedomäne, welche nach Affinitätsmaturierung der 3M4E5 Bindedomäne erhalten wurde. Bei der Affinitätsmaturierung der 3M4E5 Bindedomäne wurden die Kernbindestrukturen zum NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beibehalten und die Interaktionen zu den C-terminalen Aminosäuren des NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptids verstärkt (Stewart-Jones et al., 2009). Diese affinitätsmaturierte FabT1 Bindedomäne ist in der NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎/HLA-A2 Bindung dem 1G4 TCR ähnlicher als die Bindung der 3M4E5 scFv Bindedomäne (Stewart-Jones et al., 2009).

Sowohl die niedriger affinen 3M4E5 ($K_D = 46$ nM) scFv CAR T-Zellen als auch die hoch affinen FabT1 ($K_D = 4$ nM) scFv CAR T-Zellen binden spezifisch NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Peptid beladene HLA-A2 Komplexe und induzieren eine Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- α sowie eine spezifische Zytolyse. Außerdem wurde zur T-Zell Aktivierung durch den hoch affinen FabT1 scFv CAR (CD3 ζ #1189, CD28CD3 ζ #1190) dieselbe Anzahl CAR T-Zellen zur IFN- γ Sekretion benötigt wie bei der Verwendung des nieder affineren 3M4E5 scFv CAR (CD3 ζ #1044, CD28CD3 ζ #1046). Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Willemsen et al. (2005) und Oren et al. (2014) die beschreiben, dass eine höhere Affinität des CAR eine Antigen-unabhängige T-Zell Aktivierung induziert. Jedoch bindet der von Willemsen et al. (2005) verwendete scFv Hyb3 stärker die α 1-Helix des MHC als der nieder affine G8 scFv (Hülsmeier et al., 2005). Bei Antikörper-abgeleiteten Bindedomänen hoher Affinität überwiegt die HLA Rückgrat Bindung und somit die Antigen-unabhängige T-Zell Aktivierung. Wir zeigten dagegen, dass bei einer peptidzentrierten Bindung auch mit hoher Affinität eine Antigen spezifische T-Zell Aktivierung induziert werden kann.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Affinität der Bindedomäne alleine oder in Kombination mit der CD28 Kostimulation keinen Einfluss auf die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle nimmt. Dies wird deutlich daran, dass die nieder affinen 3M4E5 scFv CAR T-Zellen und die höher affinen FabT1 CAR T-Zellen zur Induktion der IFN- γ Freisetzung die gleiche NY-Eso-1₍₁₅₇₋₁₆₅₎ Antigendichte benötigen. Die Antigen-abhängige Aktivierungsschwelle ist gleich, jedoch kann die Menge des freigesetzten IFN- γ bei den hoch affinen CAR T-Zellen höher sein als bei den nieder affinen CAR T-Zellen. Im Vergleich dazu haben 1G4 TCR #1178 T-Zellen eine

niedrigere Aktivierungsschwelle und induzieren eine höhere Antigen-abhängige T-Zell Aktivierung trotz geringerer Affinität als CAR modifizierte T-Zellen. Stone et al. (2014) bestätigen für den CAR, dass ein $V\alpha V\beta$ CD28CD3 ζ CAR und ein TCR mit gleicher $V\alpha V\beta$ Bindedomäne mit hoher Affinität (30nM) unterschiedliche T-Zell Aktivierungen aufweisen. Der dort verwendete CAR mit der $V\alpha V\beta$ Bindedomäne, die im gleichen Affinitätsbereich wie unsere nieder affine scFv Antikörper-abgeleitete Bindedomäne 3M4E5 liegt, zeigt eine höhere Expression auf T-Zellen; trotzdem induzieren die TCR modifizierten T-Zellen eine höhere T-Zell Aktivierung und haben eine niedrigere Aktivierungsschwelle.

Wir vermuten, dass die unterschiedlichen Aktivierungsschwellen der Rezeptoren eine strukturell bedingte Ursache haben. Im TCR Signalkomplex sind die Signal-gebenden Strukturen der CD3 ζ Kette und CD28 Kostimulation nebeneinander gelegen und nicht wie im CAR hintereinander geschaltet. Alvarez-Vallina und Hawkins beschrieben 1996 eine Koexpression zweier CARs auf einer T-Zelle. Wir untersuchten, ob eine Trennung der Signale eine TCR gleiche T-Zell Aktivierung induziert. Dazu konstruierten wir den CAR #1666, bei dem das CD3 ζ Primärsignal und das kostimulatorische CD28 Signal auf zwei CARs aufgeteilt wurde. Diese beiden CARs des #1666 werden koexprimiert auf einer T-Zelle. Außerdem wurden anti-NY-Eso-1scFv TCRs (#1678, #1679) konstruiert, bei denen auf die C α Domäne und die C β Domäne jeweils ein scFv gesetzt wurde (Gross et al., 1989).

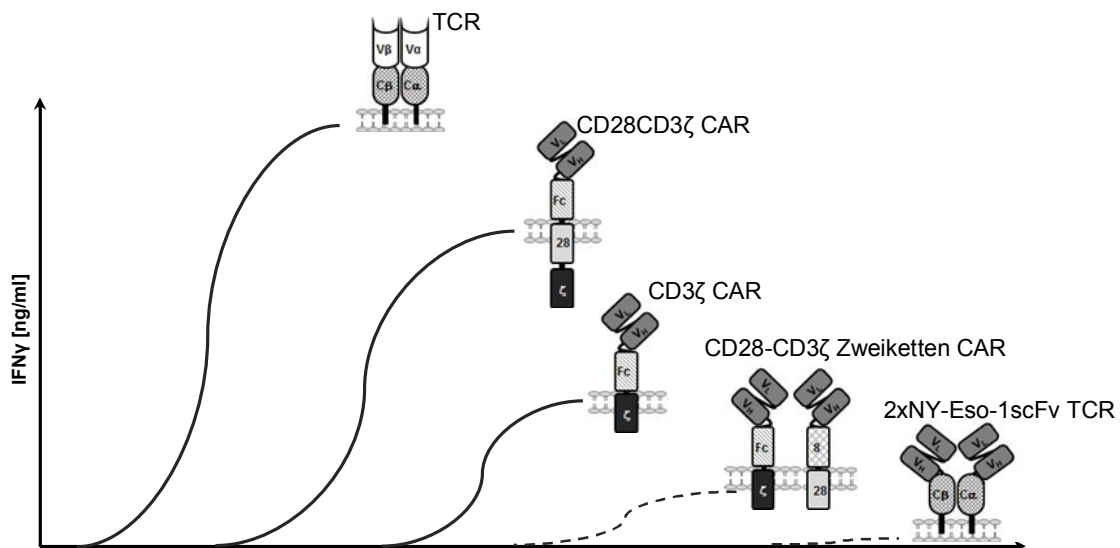


Abbildung 37 Schematische Darstellung der T-Zell Aktivierungsverschiebung. Die Koexpression zweier anti-NY-Eso-1 CARs mit CD3 ζ Primärsignal und dem kostimulatorischen CD28 Signal (CD28-CD3 ζ CAR #1666, gestrichelte Linie) oder die Koexpression der anti-NY-Eso-1 Antikörper-abgeleiteten scFv konstanten α (C α) Kette des TCR und anti-NY-Eso-1 Antikörper-abgeleiteten scFv konstanten β (C β) Kette des TCR (2xanti-NY-Eso-1 scFvTCR, gestrichelte Linie) führen zu einer Verschiebung der T-Zell Aktivierung. Vergleichend wird die T-Zell Aktivierung durch TCR, CD28CD3 ζ CAR und CD3 ζ CAR dargestellt.

Die Koexpression zweier CARs (#1666) mit CD3 ζ Primärsignal und dem kostimulatorischen CD28 Signal induziert jedoch eine niedrigere T-Zell Aktivierung als durch den CD28CD3 ζ CAR (#1046) mit kombinierter CD3 ζ und CD28 Signaldomäne (Abbildung 37).

Es zeigt sich insgesamt, dass MHC abhängige Antikörper-abgeleitete scFv Binde-domänen des CAR eine spezifische T-Zell Aktivierung induzieren und die Möglichkeit bieten, das Repertoire der CARs auf intrazelluläre Antigene zu erweitern. Demnach kann man den CAR in der Antigenerkennung TCR-ähnlich machen. Die beiden Rezeptorformate unterliegen jedoch unterschiedlichen Kinetiken, die unterschiedliche Aktivierungsschwellen und Aktivierungsstärken in T-Zellen induzieren. Die Integration der CD28 Kostimulation und Erhöhung der Affinität im CAR induziert keine Erniedrigung der Aktivierungsschwelle, allerdings verstärken diese Komponenten die CAR induzierte T-Zell Aktivierung. Vermutlich organisieren sich die CARs und der TCR in unterschiedliche Rafts und die Rekrutierung der CD3 Domänen sowie der Korezeptoren wie CD8 und CD28 ist unterschiedlich, was zu einer unterschiedlichen immunologischen Synapsenbildung führt. Dies ermöglicht dem rekombinanten TCR, trotz niedrigerer Rezeptormolekül Anzahl auf der Oberfläche und niedrigerer Affinität eine niedrigere Aktivierungsschwelle als der CAR zu haben. Zudem scheint der CAR aufgrund seiner hohen Affinität und höheren K_{Diss} nicht dem seriellen „Triggering“-Modell wie der TCR zu unterliegen. Auch dies würde begründen, warum der CAR mehr Antigen zur T-Zell Aktivierung benötigt als der TCR. Dem seriellen „Triggering“-Modell liegt zu Grunde, dass nieder affine TCRs durch eine geringe K_{Diss} das Antigen schneller wieder frei geben, so dass ein MHC Peptid Antigen seriell mit mehreren TCRs interagiert, was zu einer T-Zell Aktivierung führt (Valitutti et al., 1995; Blanco und Alarcón, 2012). Durch diese Sensitivität hat der TCR das Potential, intrazelluläre Antigene zu attackieren, die in niedriger Dichte exprimiert werden. Die Organisation der Rafts, Korezeptor Rekrutierung und Synapsenbildung ist meines Wissens für die CAR Rezeptorformate noch nicht bestimmt.

Da zytoplasmatisch exprimierte Tumor-assoziierte Antigene wie NY-Eso-1 für die adoptive T-Zell Therapie interessante Zielstrukturen darstellen, könnten MHC-abhängige CAR Rezeptoren in der adoptiven T-Zell Therapie eine Bedeutung erhalten. Für den therapeutischen Einsatz der rekombinanten Rezeptoren ist es wichtig, Autoreaktivität zu vermeiden und eine selektive Rezeptor induzierte T-Zell Antwort zu erzielen. Die höhere Aktivierungsschwelle der CAR modifizierten T-Zellen könnte sich als Vorteil zur Vermeidung einer „on-target off-organ“ T-Zell Aktivierung

erweisen, da eine niedrige Antigenexpression gesunder Gewebe zu keiner CAR T-Zell Aktivierung führt (Abbildung 38). Somit wären die MHC-abhängigen CAR Rezeptoren ebenfalls sehr interessant für andere Antigene als „Cancer-Testis“ Antigene, die auch auf gesunden Gewebszellen exprimiert werden. Ein weiterer Vorteil des CAR ist, dass es nicht wie beim TCR zum „Mispairing“ mit dem endogenen TCR kommt, was eine unspezifische T-Zell Aktivierung mit sich bringen kann (Schumacher, 2002).

Ein Nachteil des TCR Rezeptorformats liegt in der unspezifischen T-Zell Aktivierung durch hoch affine Bindedomänen (Stone und Kranz, 2013). Stone et al. (2014) zeigten allerdings, dass eine hoch affine V α V β Bindedomäne in einem CAR Format einsetzbar ist. Dieser V α V β -CD28CD3 ζ CAR (Abbildung 2) mit einer V α V β TCR-abgeleiteten Bindedomäne hoher Affinität ist funktional in CD4 und CD8 T-Zellen, während der TCR bestehend aus α - und β -Kette mit der gleichen 30nM V α V β Bindedomäne eine Peptid unabhängige T-Zell Aktivierung in vitro induziert und in vivo zu einer schnellen Depletion der CD8⁺ T-Zellen führt. Demnach erhöht das CAR Rezeptorformat durch seine höhere Aktivierungsschwelle die spezifische T-Zell Aktivierung.

Die Antikörper-abgeleiteten Bindedomänen der CARs werden aus Phagen Display Bibliotheken generiert, die primär nicht auf MHC-präsentierte Peptide ausgelegt sind und somit das Antigen Peptid-zentriert binden oder eine unspezifische MHC gerichtete Bindung induzieren können. Für Affinitätsmaturierungen sollten Antikörper-abgeleitete Fabs mit nanomolaren Affinitäten und Spezifität in Form hoher Peptid Bindung und niedriger MHC Bindung verwendet werden (Li et al., 2003). Bei der Fab Affinitätsmaturierung unserer verwendeten 4 nM FabT1 Bindedomäne wurde eine Aminosäuresequenz substituiert, welche die Bindung an das Antigen in Richtung des Peptids und weniger zum Rückgrat begünstigt (Stewart-Jones et al., 2009). Eine starke MHC Bindung könnte man durch gezielte Mutation reduzieren, was mit einer geringeren T-Zell Aktivierung einhergehen kann (Maus et al., 2016). Zusammenfassend zeigt sich, dass bei der CAR Erkennung mit einer Affinität ≥ 400 nM eine Aktivierungsobergrenze der T-Zellen erreicht wurde, was mit Aktivitätsverlust und abgeschwächter Zytolyse einhergeht (Oren et al., 2014; Maus et al., 2016).

Die adoptive T-Zell Studie mit anti-NY-Eso-1 TCR modifizierten T-Zellen erzielte über 2 Jahre andauernde Remissionen bei 50 % der behandelten Patienten (Rapoport et al., 2015). In 80 % der Fälle mit NY-Eso-1 Expression korrelierte die Progression mit dem Verlust der TCR modifizierten T-Zellen. Vielleicht würde der Einsatz von CAR T-Zellen bei NY-Eso-1 Überexpression das Ergebnis aufgrund einer längeren CAR T-Zellen Persistenz verbessern. Es ist nicht zu erwarten, dass die Integration der CD28

Domäne das Risiko einer „on-target off-organ“ Toxizität erhöht, da die CD28 Domäne die Aktivierungsschwelle des CAR nicht verändert.

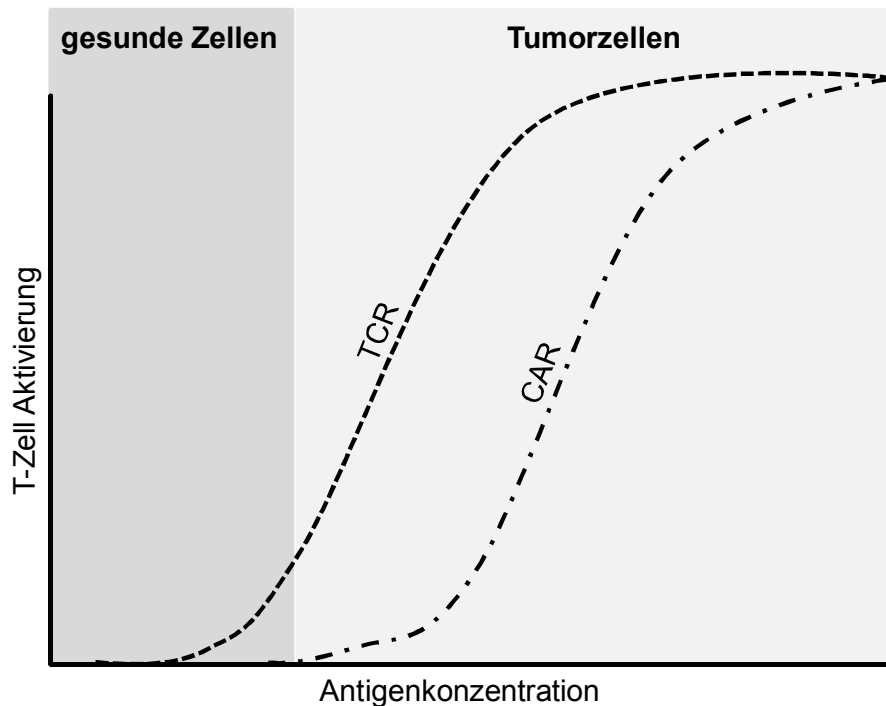


Abbildung 38 Schematische Darstellung des therapeutischen Wirkungsbereichs der Rezeptorformate TCR und CAR in Abhängigkeit der Antigendichte. Der TCR wird aufgrund seiner höheren Antigensensitivität bei geringeren Antigenkonzentrationen aktiviert als der CAR. Die CAR T-Zellen erkennen keine Zellen mit geringer Antigenkonzentration. Dies verhindert eine Reaktivität gegen gesunde Zellen mit niedriger Antigenexpression.

Das MHC-abhängige CAR Rezeptorformat kann sich als klinisch erfolgreiche adoptive T-Zell Therapie erweisen. Dieses könnte vor allem in den Fällen bedeutsam sein, in denen eine zu starke Antigenbindung zu einer T-Zell Aktivierung mit „on-target off-organ“ Toxizität führt (Abbildung 38). Hier kann das CAR Format durch seine hohe Aktivierungsschwelle selektiv für Tumorzellen mit hoher Antigendichte sein und folglich die Nebenwirkungen reduzieren. Bei geringer Antigenexpression, wie es z. B. auf NY-Eso-1 exprimierenden Tumorzellen vorkommen kann, und wenn das Antigen nicht auf gesunden Zellen exprimiert wird, ist eine TCR gerichtete T-Zell Therapie gegenüber CAR modifizierten T-Zellen zu bevorzugen.

6 Anhang

6.1 Expressionkassetten neu generierter CARs

6.1.1 pBullet-Lκ-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lκ-anti-NY-Eso-(3M4E5)scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1666 CAR, CD28-CD3ζ Zweiketten CAR)

```

                                kappa Leader
    ~~~~~
    NcoI
    ~~~~~
1   CCATGGATTT TCAGGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCCTCA GTCATAATGT
    GGTACCTAAA AGTCCACGTC TAAAAGTCGA AGGACGATTA GTCACGGAGT CAGTATTACA
                                anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
    kappa Leader
    ~~~~~
61  CTAGAATGGC GGAGGTGCAG CTGCTGGAGT CTGGCGGCGG ACTGGTGCAG CCTGGCGGCA
    GATCTTACCG CCTCCACGTC GACGACCTCA GACCGCCGCC TGACCACGTC GGACCGCCGT
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
121 GCCTGAGACT GAGCTGTGCC GCCAGCGGCT TCACCTTCAG CACCTACCAG ATGAGCTGGG
    CGGACTCTGA CTCGACACGG CGGTCGCCGA AGTGGAAGTC GTGGATGGTC TACTCGACCC
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
181 TGCGGCAGGC CCCTGGCAAG GGCCTGGAGT GGGTGTCCGG CATCGTGTCC AGCGGCGGCA
    ACGCCGTCCG GGGACCGTTC CCGGACCTCA CCCACAGGCC GTAGCACAGG TCGCCGCCGT
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
241 GCACCGCCTA CGCCGACAGC GTGAAGGGCA GGTTCACCAT CAGCCGGGAC AACAGCAAGA
    CGTGGCGGAT GCGGCTGTCG CACTTCCCCT CCAAGTGGTA GTCGGCCCTG TTGTCGTTCT
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
301 ACACCCTGTA CCTGCAGATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGTG
    TGTGGGACAT GGACGTCTAC TTGTCGGACT CTCGGCTCCT GTGGCGGCAC ATGATGACAC
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
361 CCGGCGAGCT GTCGCCCTAC TACGGCATGG ATGTGTGGGG CCAGGGCACC ACCGTGACAG
    GGCCGCTCGA CGACGGGATG ATGCCGTACC TACACACCCC GGTCCCCTGG TGGCACTGTC
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
421 TGAGCAGCGC CAAGACCACC CCAAGCTGG AGGAGGGCGA GTTCAGCGAG GCCAGAGTGC
    ACTCGTCGCG GTTCTGGTGG GGGTTCGACC TCCTCCCGCT CAAGTCGCTC CGGTCTCAGC
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
481 AGAGCGAGCT GACCCAGCCC AGAAGCGTGT CCGGCAGCCC TGGCCAGAGC GTGACCATCA
    TCTCGCTCGA CTGGGTCGGG TCTTCGCACA GGCCGTCGGG ACCGGTCTCG CACTGGTAGT
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
541 GCTGTACCGG CACCAGCAGA GATGTGGGCG GCTACAATA CGTGTCTCTGG TATCAGCAGC
    CGACATGGCC GTGGTCGTCT CTACACCCGC CGATGTTGAT GCACAGGACC ATAGTCGTCG
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
601 ACCCCGGCAA GGCCCCTAAG CTGATCATCC ACGACGTGAT CGAGAGAAGC AGCGGCGTGC
    TGGGGCCGTT CCGGGGATTC GACTAGTAGG TGCTGCACTA GCTCTCTTCG TCGCCGCACG
    anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
    ~~~~~
661 CCGACAGATT CAGCGGCAGC AAGAGCGGCA ACACCGCCAG CCTGACCATC TCTGGCCTCC
    GGCTGTCTAA GTCGCCGTCG TTCTCGCCGT TGTGGCGGTC GGACTGGTAG AGACCGGAGG
  
```

```

anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
~~~~~
721  AGGCCGAGGA CGAGGCCGAC TACTACTGCT GGAGCTTCGC CGGCAGCTAC TACGTGTTCG
TCCGGCTCCT GCTCCGGCTG ATGATGACGA CCTCGAAGCG GCCGTCGATG ATGCACAAGC
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~

anti-NY-Eso-1 scFv (3M4E5)
~~~~~
781  GCACCGGCAC CGACGTGACC GTGCTGGGCC AGCCCAAGGC CAACCCACAC GTGGATCCCG
CGTGGCCGTG GCTGCACTGG CACGACCCGG TCGGGTTCCG GTTGGGGTGT CACCTAGGGC
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
841  CCGAGCCCAA ATCTCCTGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC
GGCTCGGGTT TAGAGGACTG TTTTGTAGTGT GTACGGGTGG CACGGGTCGT GGACTTGAGG
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
901  TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
ACCCCCCTGG CAGTCAGAAG GAGAAGGGGG GTTTTGGGTT CCTGTGGGAG TACTAGAGGG
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
961  GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT
CCTGGGGACT CCAGTGTACG CACCACCACC TGCACCTCGGT GCTTCTGGGA CTCCAGTTCA
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1021 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC
AGTTGACCAT GCACCTGCCG CACCTCCACG TATTACGGTT CTGTTTCGGC GCCCTCCTCG
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1081 AGTACAACAG CACGTACCGG GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
TCATGTTGTC GTGCATGGCC CACCAGTCGC AGGAGTGGCA GGACGTGGTC CTGACCGACT
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1141 ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
TACCGTTCCT CATGTTACG TTCCAGAGGT TGTTTCGGGA GGGTCGGGGG TAGCTCTTTT
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1201 CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC
GGTAGAGGTT TCGGTTTCCC GTCGGGGCTC TTGGTGTCCA CATGTGGGAC GGGGGTAGGG
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1261 GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
CCCTACTCGA CTGGTTCTTG GTCCAGTCGG ACTGGACGGA CCAGTTCCG AAGATAGGGT
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1321 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACAC AAGACCACGC
CGCTGTAGCG GCACCTCAC CTCTCGTTAC CCGTCGGCCT CTTGTTGATG TTCTGGTGCC
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1381 CTCCCGTGCT GGACTIONGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCAC GTGGACAAGA
GAGGGCACGA CCTGAGGCTG CCGAGGAAGA AGGAGATGTC GTTCGAGTGG CACCTGTTCT
human IgG1-Fc (CH2-CH3)
~~~~~
1441 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
CGTCCACCGT CGTCCCCTTG CAGAAGAGTA CGAGGCACTA CGTACTCCGA GACGTGTTGG
human IgG1-Fc (CH2-CH3) human CD3 zeta (TM)
~~~~~
1501 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAAAA AGATCCCAA CTCTGCTACC
TGATGTGCGT CTTCTCGGAG AGGGACAGAG GCCCATTTTT TCTAGGGTTT GAGACGATGG
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
human CD3 zeta (TM)
~~~~~
1561 TGCTGGATGG AATCCTCTC ATCTATGGTG TCATTCTCAC TGCCTTGTTT CTGAGAGTGA
ACGACCTACC TTAGGAGAAG TAGATACCAC AGTAAGAGTG ACGGAACAAG GACTCTCACT
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1621 AGTTCAGCAG GAGCGCAGAC GCCCCGCGT ACCAGCAGGG CCAGAACCAG CTCTATAACG

```

```

TCAAGTCGTC CTCGCGTCTG CGGGGGCGCA TGGTCGTCCC GGTCTTGGTC GAGATATTGC
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1681 AGCTCAATCT AGGACGAAGA GAGGAGTACG ATGTTTTTGA CAAGAGACGT GGCCGGGACC
TCGAGTTAGA TCCTGCTTCT CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA CCGGCCCTGG
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1741 CTGAGATGGG GGGAAAGCCG AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC AATGAACTGC
GACTCTACCC CCCTTTCGGC TCTTCTTCT TGGGAGTCCT TCCGGACATG TTA CTGAGC
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1801 AGAAAGATAA GATGGCGGAG GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG CGCCGGAGGG
TCTTTCTATT CTACCGCTC CGGATGTCAC TCTAACCTA CTTTCCGCTC GCGGCCTCCC
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1861 GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC ACCTACGACG
CGTTCCCGT GCTACCGGAA ATGGTCCCAG AGTCATGTCG GTGGTTCCTG TGGATGCTGC
P2A-Peptid
~~~~~
human CD3 zeta Signaldomäne
~~~~~
1921 CCCTTACAT GCAGGCCCTG CCCCTCGCG GAAGCGGCGC CACGAACTTC TCTCTGTAA
GGGAAGTGTA CGTCCGGGAC GGGGAGCGC CTTCCGCGC GTGCTTGAAG AGAGACAATT
P2A-Peptid
~~~~~
kappa Leader
~~~~~
NcoI
~~~~~
1981 AGCAAGCAGG AGACGTGGAA GAAAACCCG GTCCCATGGA TTTTCAGGTG CAGATTTTCA
TCGTTGCTCC TCTGCACCTT CTTTTGGGGC CAGGGTACCT AAAAGTCCAC GTCTAAAAGT
kappa Leader
~~~~~
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2041 GCTTCCTGCT AATCAGTGCC TCAGTCATAA TGTCTAGAAT GCGGAGGTG CAGCTGCTGG
CGAAGGACGA TTAGTCACGG AGTCAGTATT ACAGATCTTA CCGCCTCCAC GTCGACGACC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2101 AGTCTGGAGG TGGACTGGTG CAGCCTGGAG GTAGCCTGAG ACTGAGCTGT GCCGCCAGCG
TCAGACCTCC ACCTGACCAC GTCGGACCTC CATCGGACTC TGA CTGACGACA CGGCGGTGCG
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2161 GATTACCTT CAGCACCTAC CAGATGAGCT GGGTGC GGCA GGCCTTGGT AAGGGACTGG
CTAAGTGGAA GTCGTGGATG GTCTACTCGA CCCACGCCGT CCGGGGACCA TTCCCTGACC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2221 AGTGGGTGTC CGGTATCGTG TCCAGCGGAG GTAGCACCGC CTACGCCGAC AGCGTGAAGG
TCACCCACAG GCCATAGCAC AGGTCGCCCTC CATCGTGGCG GATGCGGCTG TCGCACTTCC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2281 GAAGGTTTAC CATCAGCCGG GACAACAGCA AGAACACCCT GTACCTGCAG ATGAACAGCC
CTTCCAAGTG GTAGTCGGCC CTGTTGTCGT TCTTGTGGGA CATGGACGTC TACTTGTCCG
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2341 TGAGAGCCGA GGACACCGC GTGTACTACT GTGCCGGCGA GCTGCTGCC TACTACGGCA
ACTCTCGGCT CCTGTGGCG CACATGATGA CACGGCCGCT CGACGACGGG ATGATGCCGT
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2401 TGGATGTGTG GGGACAGGGT ACCACCGTGA CAGTGAGCAG CGCCAAGACC ACCCCCAAGC
ACCTACACAC CCCTGTCCCA TGGTGGCACT GTCACTCGTC GCGGTTCTGG TGGGGTTTCG
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2461 TGGAGGAGGG AGAGTTCAGC GAGGCCAGAG TGCAGAGCGA GCTGACCCAG CCCAGAAGCG
ACCTCCTCCC TCTCAAGTCG CTCCGGTCTC ACGTCTCGCT CGACTGGGTC GGGTCTTCGC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~

```

```

2521  TGTCCGGTAG CCCTGGACAG AGCGTGACCA TCAGCTGTAC CGGTACCAGC AGAGATGTGG
ACAGGCCATC GGGACCTGTC TCGACTGGT AGTCGACATG GCCATGGTCG TCTCTACACC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2581  GAGGTTACAA CTACGTGTCC TGGTATCAGC AGCACCCCGG AAAGGCCCT AAGCTGATCA
CTCCAATGTT GATGCACAGG ACCATAGTCG TCGTGGGGCC TTTCCGGGA TTCGACTAGT
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2641  TCCACGACGT GATCGAGAGA TCTAGCGGTG TGCCCGACAG ATTCAGCGGA AGCAAGAGCG
AGGTGCTGCA CTAGCTCTCT AGATCGCCAC ACGGGCTGTC TAAGTCGCCT TCGTTCTCGC
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2701  GTAACACCGC CTCTCTGACC ATCTCTGGAC TCCAGGCAGA GGACGAGGCA GACTACTACT
CATTGTGGCG GAGAGACTGG TAGAGACCTG AGGTCCGTCT CCTGCTCCGT CTGATGATGA
anti-NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2761  GCTGGAGCTT CGCTGGATCT TACTACGTGT TCGGAACCGG TACCGACGTG ACCGTGCTTG
CGACCTCGAA GCGACCTAGA ATGATGCACA AGCCTTGCC ATGGCTGCAC TGGCAGGAAC
MycTag
~~~~~
anti-NY-ES01scFv (3M4E5) MycTag
~~~~~
2821  GTCAGCCCAA GGCCAATCCA ACAGTGGAAC AAAAACTCAT CTCAGAAGAG GATCTGGAAC
CAGTCGGGTT CCGGTTAGGT TGTCACCTG TTTTGTGAGTA GAGTCTTCTC CTAGACCTTG
MycTag human CD8 Brückendomäne
~~~~~
2881  AAAAGCTCAT TTCAGAAGAA GATCTGGATC CTCTGAGCAA CTCCATCATG TACTTCAGCC
TTTTCGAGTA AAGTCTTCTT CTAGACCTAG GAGACTCGTT GAGGTAGTAC ATGAAGTCGG
human CD8 Brückendomäne
~~~~~
2941  ACTTCGTGCC GGTCTTCCTG CCAGCGAAGC CCACAACACTAC ACCAGCACCA CGACCACCAA
TGAAGCACGG CCAGAAGGAC GGTGCTTCG GGTGTTGATG TGGTCGTGGT GCTGGTGGTT
human CD8 Brückendomäne
~~~~~
3001  CACCAGCGCC AACCATCGCG TCGCAGCCTC TTTCCCTTAG ACCAGAGGCT TGTCGTCCAG
GTGGTCGCGG TTGGTAGCGC AGCGTCGGAG AAAGGGAATC TGGTCTCCGA ACAGCAGGTG
human CD8 TM
~~~~~
human CD8 Brückendomäne
~~~~~
3061  CAGCTGGAGG TGCAGTGCAC ACGAGAGGAC TTGACTTCGC TTGTGATATC TACATCTGGG
GTCGACCTCC ACGTCACGTG TGCTCTCCTG AACTGAAGCG AACACTATAG ATGTAGACCC
human CD8 TM
~~~~~
3121  CACCATTGGC TGGAACCTGT GGTGTCCTC TCCTGTCACT GGTTATCACC CTTTACTGCA
GTGGTAACCG ACCTTGAACA CCACAGGAAG AGGACAGTGA CCAATAGTGG GAAATGACGT
human CD8 TM
~~~~~
human CD28 Signaldomäne
~~~~~
3181  ACCACAGGAG TAAGAGGAGC AGGCTCCTGC ACAGTACTA CATGAACATG ACTCCACGAC
TGGTGTCTC ATTCTCCTCG TCCGAGGACG TGTCACTGAT GACTTGTAC TGAGGTGCTG
human CD28 Signaldomäne
~~~~~
3241  GTCCTGGACC AACCCGAAAG CATTACCAGC CCTATGCCCC CCCACGCGAC TTCGAGCCT
CAGGACCTGG TTGGCTTTC GTAATGGTCG GGATACGGG GGTGCGCTG AAGCGTCGGA
human CD28 Signaldomäne
~~~~~
XhoI
~~~~~
3301  ATCGCTCCTA ACTCGAG
TAGCGAGGAT TGAGCTC

```

6.1.2 pBullet-Lk-anti-NY-Eso-1 (3M4E5) scFv-MycTag-CD8-CD28 (#1667 CAR, CD28 CAR)

```

kappa leader
~~~~~
NcoI
~~~~~
1 CCATGGATTT TCAGGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCCTCA GTCATAATGT
  GGTACCTAAA AGTCCACGTC TAAAAGTCGA AGGACGATTA GTCACGGAGT CAGTATTACA
kappa leader
~~~~~

                                NY-ES01scFv (3M4E5)
                                ~~~~~
61 CTAGAATGGC GGAGGTGCAG CTGCTGGAGT CTGGAGGTGG ACTGGTGCAG CCTGGAGGTA
  GATCTTACCG CCTCCACGTC GACGACCTCA GACCTCCACC TGACCACGTC GGACCTCCAT
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
121 GCCTGAGACT GAGCTGTGCC GCCAGCGGAT TCACCTTCAG CACCTACCAG ATGAGCTGGG
  CGGACTCTGA CTCGACACGG CGGTCGCCTA AGTGGAAGTC GTGGATGGTC TACTCGACCC
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
181 TGCGGCAGGC CCCTGGTAA GACTGGAGT GGGTGTCCGG TATCGTGTCC AGCGGAGGTA
  ACGCCGTCCG GGGACCATC CCTGACCTCA CCCACAGGCC ATAGCACAGG TCGCCTCCAT
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
241 GCACCGCCTA CGCCGACAGC GTGAAGGGAA GGTTCACCAT CAGCCGGGAC AACAGCAAGA
  CGTGCGGGAT GCGGCTGTCG CACTTCCCTT CCAAGTGGTA GTCGGCCCTG TTGTCTTCT
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
301 ACACCCTGTA CCTGCAGATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGTG
  TGTGGGACAT GGACGTCTAC TTGTGGACT CTCGGCTCCT GTGGCGGCAC ATGATGACAC
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
361 CCGGCGAGCT GGTGCCCTAC TACGGCATGG ATGTGTGGGG ACAGGGTACC ACCGTGACAG
  GGCCGCTCGA CGACGGGATG ATGCCGTACC TACACACCC TGTCCCATGG TGGCACTGTC
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
421 TGAGCAGCGC CAAGACCACC CCAAGCTGG AGGAGGGAGA GTTCAGCGAG GCCAGAGTGC
  ACTCGTCGCG GTTCTGGTGG GGGTTCGACC TCCTCCCTCT CAAGTCGCTC CGGTCTCAGC
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
481 AGAGCGAGCT GACCCAGCCC AGAAGCGTGT CCGGTAGCCC TGGACAGAGC GTGACCATCA
  TCTCGCTCGA CTGGGTCGGG TCTTCGCACA GGCCATCGGG ACCTGTCTCG CACTGGTAGT
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
541 GCTGTACCGG TACCAGCAGA GATGTGGGAG GTTACAATA CGTGTCCCTG TATCAGCAGC
  CGACATGGCC ATGGTCTGCT CTACACCCTC CAATGTTGAT GCACAGGACC ATAGTCGTCTG
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
601 ACCCCGAAA GGCCCTAAG CTGATCATCC ACGACGTGAT CGAGAGATCT AGCGGTGTGC
  TGGGGCCTTT CCGGGGATTC GACTAGTAGG TGCTGACTA GCTCTCTAGA TCGCCACACG
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
661 CCGACAGATT CAGCGGAAGC AAGAGCGGTA ACACCGCTC TCTGACCATC TCTGGACTCC
  GGCTGTCTAA GTCGCCTTCG TTCTCGCCAT TGTGGCGGAG AGACTGGTAG AGACCTGAGG
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
721 AGGCAGAGGA CGAGGCAGAC TACTACTGCT GGAGCTTCGC TGGATCTTAC TACGTGTCTG
  TCCGTCTCCT GCTCCGTCTG ATGATGACGA CCTCGAAGCG ACCTAGAATG ATGCACAAGC
  NY-ES01scFv (3M4E5)
  ~~~~~
                                MycTag
                                ~~~~~
781 GAACCGGTAC CGACGTGACC GTGCTTGGTC AGCCCAAGGC CAATCCAACA GTGGAACAAA

```

```

CTTGGCCATG GCTGCACTGG CACGAACCAG TCGGGTCCG GTTAGGTTGT CACCTTGTTT
MycTag
~~~~~
                                MycTag
                                cd8hinge tm
841  AACTCATCTC AGAAGAGGAT CTGGAACAAA AGCTCATTTC AGAAGAAGAT CTGGATCCTC
TTGAGTAGAG TCTTCTCCTA GACCTTGTTT TCGAGTAAAG TCTTCTTCTA GACCTAGGAG
cd8hinge tm
~~~~~
901  TGAGCAACTC CATCATGTAC TTCAGCCACT TCGTGCCGGT CTTCTTGCCA GCGAAGCCCA
ACTCGTTGAG GTAGTACATG AAGTCGGTGA AGCACGGCCA GAAGGACGGT CGCTTCGGGT
cd8hinge tm
~~~~~
961  CAACTACACC AGCACCACGA CCACCAACAC CAGCGCCAAC CATCGCGTCG CAGCCTCTTT
GTTGATGTGG TCGTGGTGCT GGTGGTTGTG GTCGCGGTTG GTAGCGCAGC GTCGGAGAAA
cd8hinge tm
~~~~~
1021 CCCTTAGACC AGAGGCTTGT CGTCCAGCAG CTGGAGGTGC AGTGCACACG AGAGGACTTG
GGGAATCTGG TCTCCGAACA GCAGTCTGTC GACCTCCACG TCACGTGTGC TCTCCTGAAC
cd8hinge tm
~~~~~
1081 ACTTCGCTTG TGATATCTAC ATCTGGGCAC CATTGGCTGG AACTTGTGGT GTCCTTCTCC
TGAAGCGAAC ACTATAGATG TAGACCCGTG GTAACCGACC TTGAACACCA CAGGAAGAGG
cd8hinge tm
~~~~~
                                CD28 intra
1141 TGTCACTGGT TATCACCTT TACTGCAACC ACAGGAGTAA GAGGAGCAGG CTCCTGCACA
ACAGTGACCA ATAGTGGGAA ATGACGTTGG TGTCTCATT CTCCTCGTCC GAGGACGTGT
CD28 intra
~~~~~
1201 GTGACTACAT GAACATGACT CCACGACGTC CTGGACCAAC CCGAAAGCAT TACCAGCCCT
CACTGATGTA CTTGTACTGA GGTGCTGCAG GACCTGGTTG GGCTTTCGTA ATGGTCGGGA
CD28 intra
~~~~~
                                XhoI
1261 ATGCCCCCCC ACGCGACTTC GCAGCCTATC GTCCTAACT CGAG
TACGGGGGGG TGCCTGAAAG CGTCGGATAG CGAGGATTGA GCTC

```

6.1.3 pMP71-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-MycTag-C β 1G4TCR- P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1678 TCR, 2xanti-NY-Eso-1scFvTCR)

```

                                kappa leader
                                ~~~~~
NotI
~~~~~
1  GCGGCCGCAT GGATTTTCAG GTGCAGATTT TCAGCTTCCT GCTAATCAGT GCCTCAGTCA
CGCCGGCGTA CCTAAAAGTC CACGTCTAAA AGTCGAAGGA CGATTAGTCA CGGAGTCAGT
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
kappa leader
~~~~~
61  TAATGTCTAG AATGGCGGAG GTGCAGCTTC TGGAGAGTGG AGGAGGACTT GTGCAGCCTG
ATTACAGATC TTACCGCCTC CACGTGGAAG ACCTCTCACC TCCTCTGAA CACGTGGAC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~

```



```

121  GTGGTAGTCT AAGACTGAGC TGTGCCGCCA GCGGCTTAC CTTCAGCACC TACCAGATGA
      CACCATCAGA TTCTGACTCG ACACGGCGGT CGCCGAAGTG GAAGTCGTGG ATGGTCTACT
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
181  GCTGGGTGCG GCAGGCCCTT GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GTCCGGCATC GTGTCCAGCG
      CGACCCACGC CGTCCGGGGA CCGTTCCCGG ACCTCACCCA CAGGCCGTAG CACAGGTCGC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
241  GCGGCAGCAC CGCCTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGGTT CACCATCAGC CGGGACAACA
      CGCCGTCGTG GCGGATGCGG CTGTGCGACT TCCCCTCAA GTGGTAGTCG GCCCTGTTGT
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
301  GCAAGAACAC CCTGTACCTG CAGATGAACA GTCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT
      CGTTCTTGTG GGACATGGAC GTCTACTTGT CAGACTCTCG GCTCCTGTGG CGGCACATGA
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
361  ACTGTGCCGG AGAGCTGCTG CCCTACTACG GTATGGATGT GTGGGGACAG GGTACCACCG
      TGACACGGCC TCTCGACGAC GGGATGATGC CATACTACA CACCCTGTC CCATGGTGGC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
421  TGACAGTGAG TAGTGCCAAG ACCACCCCA AGCTGGAGGA GGGTGAGTTC AGTGAGGCCA
      ACTGTCACTC ATCACGGTTC TGGTGGGGGT TCGACCTCCT CCCACTCAAG TCACTCCGGT
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
481  GAGTGCAGAG TGAACCTACA CAGCCAAGAT CTGTGTCAGG AAGTCCTGGT CAGAGTGTGA
      CTCACGTCTC ACTTGAATGT GTCGGTTCTA GACACAGTCC TTCAGGACCA GTCTCACACT
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
541  CCATCAGTTG TACAGGAACC AGTAGAGATG TGGGAGGTTA CAACTACGTG TCTTGGTATC
      GGTAGTCAAC ATGTCCCTGG TCATCTCTAC ACCCTCCAAT GTTGATGCAC AGAACCATAG
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
601  AGCAGCACCC CGGTAAGGCC CTAAGCTGA TCATCCACGA CGTGATCGAG AGAAGTAGTG
      TCGTCTGGG GCCATTCCGG GGATTGACT AGTAGGTGCT GCACTAGCTC TCTTCATCAC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
661  GAGTGCCCGA CAGATTCAGT GGTAGTAAGA GTGGAAACAC CGCCAGTCTG ACCATCTCTG
      CTCACGGGCT GTCTAAGTCA CCATCATTCT CACCTTTGTG GCGGTCAGAC TGGTAGAGAC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
721  GTCTCCAGGC CGAGGACGAG GCCGACTACT ACTGCTGGAG TTTCCCGGA AGTTACTACG
      CAGAGGTCCG GCTCCTGCTC CGGCTGATGA TGACGACCTC AAAGCGGCCT TCAATGATGC
      MycTag
      ~
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
781  TGTTCCGAAC CGGAACCGAC GTGACCGTGC TGGGTCAGCC CAAGGCCAAC CCAACAGTGG
      ACAAGCCTTG GCCTTGGCTG CACTGGCAG ACCCAGTCGG GTTCCGGTTG GGTGTGACC
      MycTag          Serin Glycin linker
      ~~~~~
      MycTag
      ~~~~~
841  AACAAAACT TATCAGTGAA GAAGATCTGG AACAAAACT AATCTCAGAA GAAGATCTGG
      TTGTTTTGA ATAGTCACTT CTTCTAGACC TTGTTTTGA TTAGAGTCTT CTTCTAGACC
      Serin Glycin linker
      ~~~~~
      Constant Domain Beta
      ~~~~~
901  GAGGAGGTGG GAGTGGTGGT GGAGGATCAG GTGGTGGCGG ATCTGAAGAT CTTAAAAACG
      CTCCTCCACC CTCACCACCA CCTCCTAGTC CACCACCGCC TAGACTTCTA GAATTTTTGC
      Constant Domain Beta
      ~~~~~
961  TGTTCCACC AGAAGTCGCT GTATTTGAAC CATCAGAAGC AGAAATCTCT CACACCCAAA
      ACAAGGGTGG TCTTCAGCGA CATAAAGTGT GTAGTCTTCG TCTTTAGAGA GTGTGGGTTT
      Constant Domain Beta
      ~~~~~
1021 AGCCACACT GGTGTGCCTG GCAACAGGAT TCTACCCAGA CCACGTGGAA CTGAGTTGGT

```

```

TCCGGTGTGA CCACACGGAC CGTTGTCTTA AGATGGGTCT GGTGCACCTT GACTCAACCA
Constant Domain Beta
~~~~~
1081 GGGTGAATGG GAAGGAGGTG CACAGTGGAG TCAGCACAGA CCCGCAGCCC CTCAAGGAGC
CCCACTTACC CTTCTCCAC GTGTACCTC AGTCGTGTCT GGGCGTCGGG GAGTTCCTCG
Constant Domain Beta
~~~~~
1141 AGCCCGCCCT CAATGACTCC AGATACAGCC TGAGCAGCCG CCTGAGGGTC TCGGCCACCT
TCGGGCGGGA GTTACTGAGG TCTATGTCGG ACTCGTCGGC GGACTIONCAG AGCCGGTGG
Constant Domain Beta
~~~~~
1201 TCTGGCAGAA CCCCCGCAAC CACTTCCGCT GTCAAGTCCA GTTCTACGGG CTCTCGGAAA
AGACCGTCTT GGGGGCGTTG GTGAAGGCGA CAGTTCAGGT CAAGATGCC GAGAGCCTTT
Constant Domain Beta
~~~~~
1261 ATGACGAGTG GACCCAGGAT AGGGCCAAAC CTGTCACCCA GATCGTCAGC GCCGAGGCCT
TACTGCTCAC CTGGTCTTA TCCCGGTTT GACAGTGGGT CTAGCAGTCG CGGCTCCGGA
Constant Domain Beta
~~~~~
1321 GGGGTAGAGC AACTGTGGC TTCACCTCCG AGTCTTACCA GCAAGGGGTC CTGTCTGCCA
CCCCATCTCG TCTGACACCG AAGTGGAGGC TCAGAATGGT CGTTCCCAG GACAGACGGT
Constant Domain Beta
~~~~~
1381 CCATCCTCTA TGAGATCTTG CTAGGGAAGG CCACCTTGTG TGCCGTGCTG GTCAGTGCCC
GGTAGGAGAT ACTCTAGAAC GATCCCTTCC GGTGGAACAT ACGGCACGAC CAGTCACGGG
Constant Domain Beta
~~~~~
P2A
~~~~~
1441 TCGTGCTGAT GGCCATGGTC AAGAGAAAGG ATTCCAGAGG CGGAAGCGGC GCCACGAACT
AGCACGACTA CCGGTACCAG TTCTCTTTCC TAAGGTCTCC GCCTTCGCCG CGGTGCTTGA
P2A kappa leader
~~~~~
1501 TCTCTCTGTT AAAGCAAGCA GGAGACGTGG AAGAAAACCC CGGTCCCATG GATTTTCAGG
AGAGAGACAA TTTCGTTCGT CCTCTGCACC TTCTTTTGGG GCCAGGGTAC CTAAGTTC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
kappa leader
~~~~~
1561 TGCAGATTTT CAGCTTCCTG CTAATCAGTG CCTCAGTCAT AATGTCTAGA ATGGCGGAGG
ACGTCTAAAA GTCGAAGGAC GATTAGTCAC GGAGTCAGTA TTACAGATCT TACCGCTCC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1621 TGCAGCTGCT GGAGTCTGGC GCGGACTGG TGCAGCCTGG CGGCAGCCTG AACTGAGCT
ACGTCGACGA CCTCAGACCG CCGCCTGACC ACGTCGGACC GCCGTGGAC TCTGACTCGA
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1681 GTCCCGCCAG CGGCTTCACC TTCAGCACCT ACCAGATGAG CTGGGTGCGG CAGGCCCTG
CACGGCGGTC GCCGAAGTGG AAGTCGTGGA TGGTCTACTC GACCCACGCC GTCCGGGGAC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1741 GCAAGGGCCT GGAGTGGGTG TCCGGCATCG TGTCCAGCGG CGGCAGCACC GCCTACGCCG
CGTTCCCGGA CCTCACCAC AGGCCGTAGC ACAGGTCCG GCCGTGCTGG CGGATGCGGC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1801 ACAGCGTGAA GGCAGGTTT ACCATCAGCC GGGACAACAG CAAGAACACC CTGTACTTGC
TGTCGACTT CCCGTCCAAG TGGTAGTCGG CCCTGTTGTC GTTCTTGTGG GACATGGACG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1861 AGATGAACAG CCTGAGAGCC GAGGACACCG CCGTGTACTA CTGTGCCGCG GAGCTGCTGC
TCTACTTGTC GGACTIONCAG CTCCTGTGGC GGCACATGAT GACACGGCCG CTCGACGACG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1921 CCTACTACGG CATGGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACAGTGAGC AGCGCCAAGA
GGATGATGCC GTACCTACAC ACCCCGGTCC CGTGGTGGCA CTGTACTCG TCGCGTCTC

```

```

NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1981  CCACCCCAA GCTGGAGGAG GCGAGTTCA GCGAGGCAAG AGTGCAGAGT GAACTTACCC
      GGTGGGGGTT CGACCTCCTC CCGCTCAAGT CGCTCCGTTT TCACGTCTCA CTTGAATGGG
      NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2041  AGCCCAGAAG CGTGTCTGGA AGTCCTGGTC AGAGCGTGAC CATCAGCTGT ACCGGAACCA
      TCGGGTCTTC GCACAGACCT TCAGGACCAG TCTCGCACTG GTAGTCGACA TGGCCTTGGT
      NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2101  GCAGAGATGT GGGTGGATAC AACTACGTGT CCTGGTATCA GCAGCACCCC GGTAAGGCC
      CGTCTCTACA CCCACCTATG TTGATGCACA GGACCATAGT CGTCGTGGGG CCATTCCGGG
      NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2161  CTAAGCTGAT CATCCACGAC GTGATCGAGA GAAGCAGCGG AGTGCCCGAC AGATTACGCG
      GATTCGACTA GTAGGTGCTG CACTAGCTCT CTTCGTCGCC TCACGGGCTG TCTAAGTCGC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2221  GTAGCAAGAG CGGAAACACC GCCAGCCTGA CCATCTCTGG TCTCCAGGCC GAGGACGAGG
      CATCGTTCTC GCCTTTGTGG CGGTCGGACT GGTAGAGACC AGAGGTCCGG CTCCTGTCTC
      NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2281  CCGACTACTA CTGCTGGAGC TTCGCCGAA GCTACTACGT GTTCGGTACC GGAACCGACG
      GGCTGATGAT GACGACCTCG AAGCGCCCTT CGATGATGCA CAAGCCATGG CCTTGGCTGC
      2xFLAG tag
      ~~~~~
      NY-ES01scFv (3M4E5)
      ~~~~~
2341  TGACCGTGCT GGGTCAGCCC AAGGCCAACC CCACAGTGA CTACAAGGAT GATGATGATA
      ACTGGCACGA CCCAGTCGGG TTCCGGTTGG GGTGTCACCT GATGTTCTTA CTACTACTAT
      Serin Glycin linker
      ~~~~~
      2xFLAG tag
      ~~~~~
2401  AGGACTACAA GGACGATGAT GACAAGGGAG GTGGTGGATC GGGCGGTGGC GGATCGGGTG
      TCCTGATGTT CCTGCTACTA CTGTTCCCTC CACCACCTAG CCCGCCACCG CCTAGCCCAC
      Serin Glycin linker
      ~~~~~
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2461  GCGGAGGATC TAATATCCAG AACCTGACC CTGCCGTGTA CCAGCTGAGA GACTCTAAAT
      CGCCTCCTAG ATTATAGGTC TTGGGACTGG GACGGCACAT GGTGACTCT CTGAGATTTA
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2521  CCAGTGACAA GTCTGTCTGC CTATTCACCG ATTTTGATTC TCAAACAAAT GTGTCACAAA
      GGTCACTGTT CAGACAGACG GATAAGTGGC TAAACTAAG AGTTTGTFTA CACAGTGTTT
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2581  GTAAGGATTC TGATGTGTAT ATCACAGACA AACTGTGCT AGACATGAGG TCTATGGACT
      CATTCTAAG ACTACACATA TAGTGTCTGT TTTGACACGA TCTGTACTCC AGATACCTGA
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2641  TCAAGAGCAA CAGTGTGTG GCCTGGAGCA ACAAATCTGA CTTTGCATGT GCAAACGCCT
      AGTTCTCGTT GTCACGACAC CGGACCTCGT TGTTTAGACT GAAACGTACA CGTTTGCGGA
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2701  TCAACAACAG CATTATTCCA GAAGACACCT TCTTCCCAG CCCAGAAAGT TCCTGTGATG
      AGTTGTTGTC GTAATAAGGT CTTCTGTGGA AGAAGGGGTC GGGTCTTTCA AGGACACTAC
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2761  TCAAGCTGGT CGAGAAAAGC TTTGAAACAG ATACGAACCT AAACCTTCAA AACCTGTCAG
      AGTTCCACCA GCTCTTTTCG AAACCTTGTG TATGCTTGGG TTTGAAAGTT TTGGACAGTC
      Constant Domain alfa
      ~~~~~
2821  TGATTGGGTT CCGAATCCTC CTCCTGAAAG TGGCCGGGTT TAATCTGCTC ATGACGCTGC
      ACTAACCCTA GGCTTAGGAG GAGGACTTTC ACCGGCCCAA ATTAGACGAG TACTGCGACG

```

Constant Domain alfa

~~~~~

EcoRI

~~~~~

2881 GGCTGTGGTC CAGCTGAGAA TTC
CCGACACCAG GTCGACTCTT AAG

6.1.4 pMP71-Lk-anti-CEA(BW431/26)scFv-MycTag-C β 1G4TCR- P2A-Lk-anti-NY-Eso-1(3M4E5)scFv-FlagTag-C α 1G4TCR (#1679 TCR, 1xanti-NY-Eso-1scFvTCR)

kappa leader

~~~~~

NotI

~~~~~

1 GCGGCCGCAT GGATTTTCAG GTGCAGATTT TCAGCTTCCT GCTAATCAGT GCCTCAGTCA
CGCCGGCGTA CCTAAAAGTC CACGTCTAAA AGTCGAAGGA CGATTAGTCA CGGAGTCAGT
anti-CEAscFv BW431/26

~~~~~

kappa leader

~~~~~

61 TAATGTCTAG AGGTGTCCAC TCACAGGTCC AACTGCAGGA GTCAGGTCCA GGTCTTGTGA
ATTACAGATC TCCACAGGTG AGTGTCCAGG TTGACGTCCT CAGTCCAGGT CCAGAACACT
anti-CEAscFv BW431/26

121 GACCTAGCCA GACCCTGAGC CTGACCTGCA CCGTGTCTGG CTTACCACATC AGCAGTGGTT
CTGGATCGGT CTGGGACTCG GACTGGACGT GGCACAGACC GAAGTGGTAG TCGTCACCAA
anti-CEAscFv BW431/26

181 ATAGCTGGCA CTGGGTGAGA CAGCCACCTG GACGAGGTCT TGAGTGGATT GGATACATAC
TATCGACCGT GACCCACTCT GTCGGTGGAC CTGCTCCAGA ACTCACCTAA CCTATGTATG
anti-CEAscFv BW431/26

241 AGTACAGTGG TATCACTAAC TACAACCCCT CTCTCAAAAG TAGAGTGACA ATGCTGGTAG
TCATGTCACC ATAGTGATTG ATGTTGGGGA GAGAGTTTTC ATCTCACTGT TACGACCATC
anti-CEAscFv BW431/26

301 ACACCAGCAA GAACCAGTTC AGCCTGAGAC TCAGCAGCGT GACAGCCGCC GACACCGGCG
TGTGGTCGTT CTTGGTCAAG TCGGACTCTG AGTCGTCGCA CTGTCGGCGG CTGTGGCGCC
anti-CEAscFv BW431/26

361 TCTATTATTG TGCAAGAGAA GACTATGATT ACCACTGGTA CTTGATGTC TGGGGACAAG
AGATAATAAC ACGTTCTCTT CTGATACTAA TGGTGACCAT GAAGCTACAG ACCCCTGTTC
anti-CEAscFv BW431/26

421 GAACCACGGT CACAGTCTCT TCAGGAGGTG GTGGATCAGG AGGTGGTGA TCTGGTGGAG
CTTGGTGCCA GTGTCAGAGA AGTCCTCCAC CACCTAGTCC TCCACCACCT AGACCACCTC
anti-CEAscFv BW431/26

481 GTGGATCTGA TATCCAATT ACACAAAGTC CAAGTAGTCT TAGCGCAAGT GTGGGTGACA
CACCTAGACT ATAGTTGAA TGTGTTTCAG GTTCATCAGA ATCGCGTTCA CACCCACTGT
anti-CEAscFv BW431/26

541 GAGTGACCAT CACCTGTAGT ACCAGCTCGA GTGTAAGTTA CATGCACTGG TACCAGCAGA
CTCACTGGTA GTGGACATCA TGGTCGAGCT CACATTC AATGTACGTGACC ATGGTCGTCT
anti-CEAscFv BW431/26

601 AGCCAGGTAA GGCTCCAAAG CTGCTGATCT ACAGCACATC CAACCTGGCT TCTGGTGTGC
TCGGTCCATT CCGAGGTTTC GACGACTAGA TGTCGTGTAG GTTGACCGA AGACCACAGC

```

anti-CEAscFv BW431/26
~~~~~
661 CAAGCAGATT CAGCGGTAGC GGTAGCGGTA CCGACTTCAC CTTACCATC AGCAGCCTCC
GTTTCGTCTAA GTCGCCATCG CCATCGCCAT GGCTGAAGTG GAAGTGGTAG TCGTCGGAGG
anti-CEAscFv BW431/26
~~~~~
721 AGCCAGAGGA CATCGCCACC TACTACTGCC ATCAGTGGAG TAGTTATCCC ACGTTCCGCC
TCGGTCTCCT GTAGCGGTGG ATGATGACGG TAGTCACCTC ATCAATAGGG TGCAAGCCGG
MycTag
~~~~~
anti-CEAscFv BW431/26 MycTag
~~~~~
781 AAGGGACCAA GGTGGAGATC AAAGTGGAAC AAAAATAAT CTCAGAAGAA GATCTGGAAC
TTCCCTGGTT CCACCTCTAG TTTACCTTG TTTTGTGATA GAGTCTTCT CTAGACCTTG
Serin Glycin linker
~~~~~
MycTag
~~~~~
841 AAAAATCAT AAGTGAAGAG GATCTGGGTG GTGGTGGTAG TGGAGGAGGA GGAAGTGGTG
TTTTTGAGTA TTTACTTCTC CTAGACCAC CACCACCATC ACCTCCTCT CCTTACCAC
Serin Glycin linker
~~~~~
Constant Domain Beta
~~~~~
901 GTGGAGGATC TGAAGACCTT AAAAACGTGT TCCCACCAGA AGTCGCTGTG TTTGAACCAT
CACCTCCTAG ACTTCTGGAA TTTTGCACA AGGGTGGTCT TCAGCGACAC AAATTTGGTA
Constant Domain Beta
~~~~~
961 CAGAAGCAGA AATCTCCCAC ACCCAAAGG CCACACTGGT GTGCCTGGCC ACAGGCTTCT
GTCTTCTGCT TTAGAGGGTG TGGGTTTTCC GGTGTGACCA CACGGACCGG TGTCCGAAGA
Constant Domain Beta
~~~~~
1021 ACCCCGACCA CGTGGAGCTG AGCTGGTGGG TGAATGGGAA GGAGGTGCAC AGTGGGGTCA
TGGGGCTGGT GCACCTCGAC TCGACCACC ACTTACCCTT CCTCCACGTG TCACCCAGT
Constant Domain Beta
~~~~~
1081 GCACAGACCC GCAGCCCTC AAGGAGCAGC CCGCCCTCAA TGAATCCAGA TACAGCCTGA
CGTGTCTGGG CGTCGGGGAG TTCCTCGTCG GCGGGGAGTT ACTGAGGCTT ATGTCGGACT
Constant Domain Beta
~~~~~
1141 GCAGCCGCCT GAGGGTCTCG GCCACCTTCT GGCAGAACCC CCGCAACCAC TTCCGCTGTC
CGTCGGCGGA CTCCAGAGC CGGTGAAGA CCGTCTGGG GCGTGGTG AAGGCGACAG
Constant Domain Beta
~~~~~
1201 AAGTCCAGTT CTACGGGCTC TCGAAAATG ACGAGTGGAC CCAGGATAGG GCCAAACCTG
TTCAGGTCAA GATGCCCCGAG AGCCTTTTAC TGCTCACCTG GGTCTATCC CGGTTTGGAC
Constant Domain Beta
~~~~~
1261 TCACCCAGAT CGTCAGCGCC GAGGCTGGG GTAGAGCAGA CTGTGGCTTC ACCTCCGAGT
AGTGGGTCTA GCAGTCGCGG CTCCGACCC CATCTCGTCT GACACCGAAG TGGAGGCTCA
Constant Domain Beta
~~~~~
1321 CTTACCAGCA AGGGTCTCTG TCTGCCACCA TCCTCTATGA GATCTTGCTA GGAAGGCCA
GAATGGTCGT TCCCAGGAC AGACGGTGGT AGGAGATACT CTAGAACGAT CCCTTCCGGT
Constant Domain Beta
~~~~~
1381 CCTTGATGC CGTGCTGGT AGTGCCCTG TGCTGATGGC CATGGTCAAG AGAAAGGATT
GGAACATACG GCACGACCAG TCACGGGAGC ACGACTACCG GTACCAGTTC TCTTCTCAA
Constant Domain Beta
~~~~~
P2A
~~~~~
1441 CCAGAGGCGG AAGCGGCGCC ACGAACTTCT CTCTGTTAAA GCAAGCAGGA GACGTGGAAG
GGTCTCCGCC TTCGCCGCGG TGCTTGAAGA GAGACAATTT CGTTCGTCTT CTGCACCTT
P2A kappa leader
~~~~~
1501 AAAACCCCGG TCCCATGGAT TTTACGGTGC AGATTTTTCAG CTTCTGCTA ATCAGTGCCT

```

```

TTTTGGGGCC AGGGTACCTA AAAGTCCACG TCTAAAAGTC GAAGGACGAT TAGTCACGGA
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
kappa leader
~~~~~
1561 CAGTCATAAT GTCTAGAATG GCGGAGGTGC AGCTGCTGGA GTCTGGCGGC GGACTGGTGC
GTCAGTATTA CAGATCTTAC CGCCTCCACG TCGACGACCT CAGACCGCCG CCTGACCACG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1621 AGCCTGGCGG CAGCCTGAGA CTGAGCTGTG CCGCCAGCGG CTTACCTTC AGCACCTACC
TCGGACCGCC GTCGGACTCT GACTCGACAC GCGGTCGCC GAAGTGGAAAG TCGTGGATGG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1681 AGATGAGCTG GGTGCGGCAG GCCCCTGGCA AGGGCCTGGA GTGGGTGTCC GGCATCGTGT
TCTACTCGAC CCACGCCGTC CGGGGACCGT TCCCGGACCT CACCCACAGG CCGTAGCACA
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1741 CCAGCGGCGG CAGCACCGCC TACGCCGACA GCGTGAAGGG CAGGTTACC ATCAGCCGGG
GGTCGCCGCC GTCGTGGCGG ATGCGGCTGT CGCACTTCCC GTCCAAGTGG TAGTCGGCCC
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1801 ACAACAGCAA GAACACCCTG TACCTGCAGA TGAACAGCCT GAGAGCCGAG GACACCGCCG
TGTGTGCGTT CTTGTGGGAC ATGGACGTCT ACTTGTGCGA CTCTCGGCTC CTGTGGCGG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1861 TGTACTACTG TGCCGGCGAG CTGCTGCCCT ACTACGGCAT GGATGTGTGG GGCCAGGGCA
ACATGATGAC ACGGCCGCTC GACGACGGGA TGATGCCGTA CCTACACACC CCGTCCCGT
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1921 CCACCGTGAC AGTGAGCAGC GCCAAGACCA CCCCCAAGCT GGAGGAGGGC GAGTTCAGCG
GGTGGCACTG TCACTCGTCG CGGTTCTGGT GGGGGTTCGA CCTCCTCCG CTCAAGTCCG
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
1981 AGGCAAGAGT GCAGAGTGAA CTTACCCAGC CCAGAAGCGT GTCTGGAAGT CCTGGTCAGA
TCCGTTCTCA CGTCTCACTT GAATGGGTCG GGTCTTCGCA CAGACCTTCA GGACCAGTCT
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2041 GCGTGACCAT CAGCTGTACC GGAACCAGCA GAGATGTGGG TGGATACAAC TACGTGTCTT
CGCACTGGTA GTCGACATGG CCTTGGTCGT CTCTACACC ACCTATGTTG ATGCACAGGA
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2101 GGTATCAGCA GCACCCCGGT AAGGCCCTA AGCTGATCAT CCACGACGTG ATCGAGAGAA
CCATAGTCGT CGTGGGGCCA TTCCGGGGAT TCGACTAGTA GGTGCTGCAC TAGCTCTCTT
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2161 GCAGCGGAGT GCCCGACAGA TTCAGCGGTA GCAAGAGCGG AAACACCGCC AGCCTGACCA
CGTCGCCTCA CGGGCTGTCT AAGTCGCCAT CGTTCTCGCC TTTGTGGCGG TCGGACTGGT
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2221 TCTCTGGTCT CCAGGCCGAG GACGAGGCG ACTACTACTG CTGGAGCTTC GCCGGAAGCT
AGAGACCAGA GGTCCGGCTC CTGCTCCGGC TGATGATGAC GACCTCGAAG CGGCCTTCGA
NY-ES01scFv (3M4E5)
~~~~~
2281 ACTACGTGTT CGGTACCGGA ACCGACGTGA CCGTGCTGGG TCAGCCCAAG GCCAACCCCA
TGATGCACAA GCCATGGCCT TGGCTGCACT GGCACGACCC AGTCGGGTTT CGGTTGGGGT
2xFLAG tag
~~~~~
NY-ES01scFv (3M4E5) Serin Glycin linker
~~~~~
2341 CAGTGACTA CAAGGATGAT GATGATAAGG ACTACAAGGA CGATGATGAC AAGGGAGGTG
GTCACCTGAT GTTCTACTA CTAATATTCC TGATGTTTCT GCTACTACTG TTCCCTCCAC
Serin Glycin linker
~~~~~
Constant Domain alfa
~~~~~
2401 GTGGATCGGG CGGTGGCGGA TCGGGTGGCG GAGGATCTAA TATCCAGAAC CCTGACCCTG
CACCTAGCCC GCCACCGCCT AGCCACCGC CTCCTAGATT ATAGGTTTG GGAAGGGAC

```

```
Constant Domain alfa
~~~~~
2461 CCGTGTACCA GCTGAGAGAC TCTAAATCCA GTGACAAGTC TGTCTGCCTA TTCACCGATT
GGCACATGGT CGACTCTCTG AGATTTAGGT CACTGTTTCCAG ACAGACGGAT AAGTGGCTAA
Constant Domain alfa
~~~~~
2521 TTGATTCTCA AACAAATGTG TCACAAAGTA AGGATTCTGA TGTGTATATC ACAGACAAAA
AACTAAGAGT TTGTTTACAC AGTGTTTCAT TCCTAAGACT ACACATATAG TGTCTGTTTT
Constant Domain alfa
~~~~~
2581 CTGTGCTAGA CATGAGGTCT ATGGACTTCA AGAGCAACAG TGCTGTGGCC TGGAGCAACA
GACACGATCT GTACTCCAGA TACCTGAAGT TCTCGTTGTC ACGACACCGG ACCTCGTTGT
Constant Domain alfa
~~~~~
2641 AATCTGACTT TGCATGTGCA AACGCCTTCA ACAACAGCAT TATTCCAGAA GACACCTTCT
TTAGACTGAA ACGTACACGT TTGCGGAAGT TGTGTCGTA ATAAGGTCTT CTGTGGAAGA
Constant Domain alfa
~~~~~
2701 TCCCCAGCCC AGAAAGTTC TGTGATGTC AGCTGGTCGA GAAAAGCTTT GAAACAGATA
AGGGGTCGGG TCTTTCAAGG AACTACAGT TCGACCAGCT CTTTTCGAAA CTTTGTCTAT
Constant Domain alfa
~~~~~
2761 CGAACCTAAA CTTTCAAAC CTGTCAGTGA TTGGGTCCG AATCCTCCTC CTGAAAGTGG
GCTTGGATTT GAAAGTTTGG GACAGTCACT AACCCAAGGC TTAGGAGGAG GACTTTCACC
Constant Domain alfa
~~~~~
EcoRI
~~~~~
2821 CCGGGTTTAA TCTGCTCATG ACGCTGCGGC TGTGGTCCAG CTGAGAATTC G
GGCCCAAATT AGACGAGTAC TCGCAGCCG ACACCAGGTC GACTCTTAA G C
```

6.2 Retrovirale Expressionsvektoren

6.2.1 pBullet

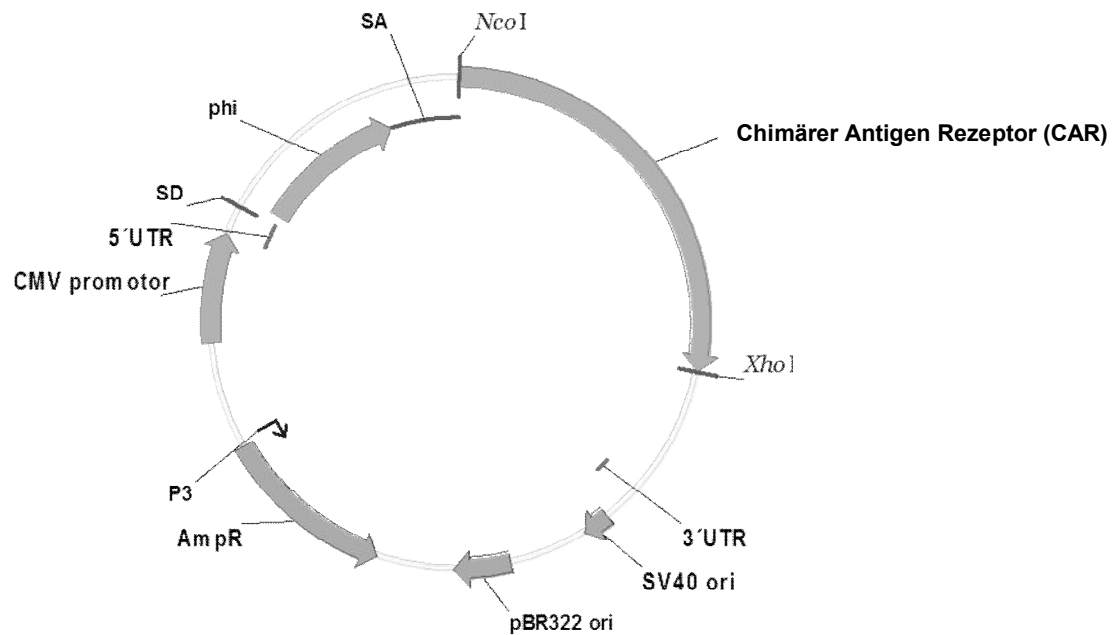


Abbildung 35: Chimärer Antigen-Rezeptor im Vektor pBullet. Der retrovirale Expressionsvektor pBullet ist abgeleitet von dem retroviralen Vektor pSTITCH (Weijtens et al., 1998). Er verfügt über das regulatorische Element SV40 ori sowie das Ampicillin-Resistenzgen (Amp^{R}). Die Vektorgöße des pBullet ohne CAR beträgt ~5,4 kb. Die Expressionskassette wird in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) zwischen den Restriktionsschnittstellen NcoI und XhoI eingefügt und steht unter der Kontrolle des CMV Promotors.

6.2.2 pMP71-wPRE

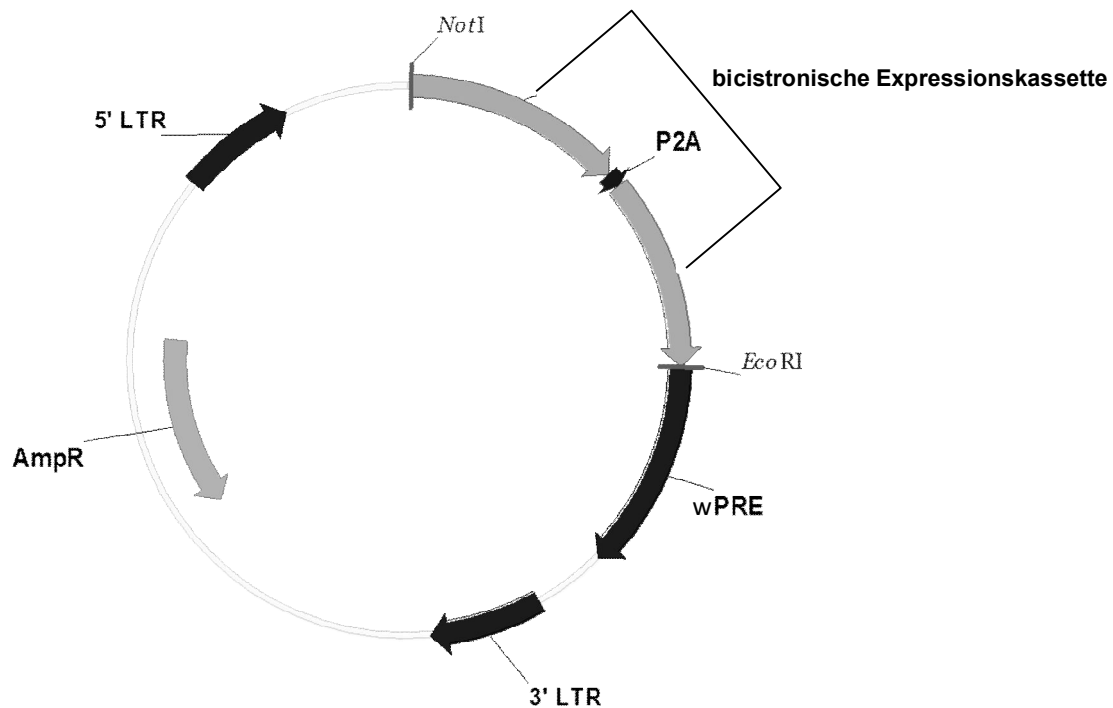


Abbildung 37: T-Zell Rezeptor im Vektor pMP71-wPRE. Der retroviral abgeleitete Expressionsvektor pMP71-wPRE enthält das posttranskriptionale regulatorische Element des Murmeltier Hepatitis Virus (wPRE), welches als 3'-Enhancer dient und an die Expressionskassette anschließt (Engels et al., 2003). Zudem verfügt der pMP71 über das Ampicillin-Resistenzgen (Amp^R). Die Vektorgröße des pMP71 ohne bicistronische Expressionskassette beträgt ~ 6,2 kb. Zur äquimolaren Translation sind die Ketten der bicistronischen Expressionskassette durch das 2A Peptid des Picornavirus (P2A) verbunden.

7 Literaturverzeichnis

- Aggen DH, Chervin AS, Schmitt TM, Engels B, Stone JD, Richman SA, ... Kranz DM. Single-chain V α V β T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains. *Gene Therapy*, 19(4), 365–74. (2012)
- Alvarez-Vallina L, & Hawking RE. Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *European Journal of Immunology*, 26(10), 2304–2309. (1996)
- Artyomov MN, Lis M, Devadas S, Davis MM, & Chakraborty AK. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 16916–21. (2010)
- Banuelos SJ, Shultz LD, Greiner DL, Burzenski LM, Gott B, Lyons BL, ... Appel MC. Rejection of human islets and human HLA-A2.1 transgenic mouse islets by alloreactive human lymphocytes in immunodeficient NOD-scid and NOD-Rag1 nullPrf1 null mice. *Clinical Immunology*, 112(3), 273–283. (2004)
- Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, & Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(1), 25–40. (2016)
- Beddoe T, Chen Z, Clements CS, Ely LK, Bushell SR, Vivian JP, ... Rossjohn J. Antigen Ligation Triggers a Conformational Change within the Constant Domain of the $\alpha\beta$ T Cell Receptor. *Immunity*, 30(6), 777–788. (2009)
- Blanco R, & Alarcón B. TCR nanoclusters as the framework for transmission of conformational changes and cooperativity. *Frontiers in Immunology*, 3. (2012)
- Boomer JS, & Green JM. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a002436. (2010)
- Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, Yeh R, Matsushita M, La Perle K, ... Sadelain M. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clinical Cancer Research*, 13(18), 5426–5435. (2007)
- Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, & Gilham DE. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3 transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6938–6949. (2010)
- Campi G, Varma R, & Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *Journal of Cell Biology*, 171(2), 1031–1036. (2005)
- Casas J, Brzostek J, Zarnitsyna VI, Hong J, Wei Q, Hoerter JAH, ... Gascoigne NRJ. Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nature Communications*, 5(5624), 1–11. (2014)
- Castro M, van Santen HM, Férez M, Alarcón B, Lythe G, & Molina-París C. Receptor pre-clustering and T cell responses: Insights into molecular mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 5(APR). (2014)
- Chen J, Stewart-Jones G, Bossi G, Lissin NM, Wooldridge L, Choi EML, ...

- Cerundolo V. Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(8), 1243–55. (2005)
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, ... Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1914–8. (1997)
- Chmielewski M, Hombach AA, & Abken H. CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirected T-cell attack. *Gene Therapy*, 18(1), 62–72. (2011)
- Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, & 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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(12), 7647–53. (2004)
- Cordoba SP, Choudhuri K, Zhang H, Bridge M, Basat AB, Dustin ML, & van der Merwe PA. The large ectodomains of CD45 and CD148 regulate their segregation from and inhibition of ligated T-cell receptor. *Blood*, 121(21), 4295–4302. (2013)
- Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, & Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews*, 257(1), 107–126. (2014)
- Ehrlich LIR, Ebert PJR, Krummel MF, Weiss A, & Davis MM. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity*, 17(6), 809–822. (2002)
- Emtage PCR, Lo ASY, Gomes EM, Liu DL, Gonzalo-Daganzo RM, & Junghans RP. Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: A preclinical evaluation. *Clinical Cancer Research*, 14(24), 8112–8122. (2008)
- Engels B, Cam H, Schüler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, ... Uckert W. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Human Gene Therapy*, 14(12), 1155–68. (2003)
- Eshhar Z, Waks T, Gross G, & Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 720–4. (1993)
- Fesnak AD, June CH, & Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 16(9), 566–81. (2016)
- Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, & Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *Journal of Immunology*, 161(6), 2791–2797. (1998)
- Gil D, Schamel WWA, Montoya M, Sánchez-Madrid F, & Alarcón B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 109(7), 901–12. (2002)

- Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, ... Old LJ. NY-Eso-1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen. *Advances in Cancer Research*, 95, 1–30. (2006)
- Gross G, Waks T, & Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 10024–10028. (1989)
- Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O’Neill A, ... Gilham DE. The Role of Extracellular Spacer Regions in the Optimal Design of Chimeric Immune Receptors. *Journal of Immunotherapy*, 28(3), 203–211. (2005)
- Gutierrez ME, Kummar S, & Giaccone G. Next generation oncology drug development: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(5), 259–265. (2009)
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. (1983)
- Harris DT, & Kranz DM. Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(3), 220–230. (2016)
- Haynes NM, Trapani JA, Teng MWL, Jackson JT, Cerruti L, Jane SM, ... Darcy PK. Rejection of Syngeneic Colon Carcinoma by CTLs Expressing Single-Chain Antibody Receptors Codelivering CD28 Costimulation. *The Journal of Immunology*, 169(10), 5780–5786. (2002)
- Hehlgans T, & Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1–20. (2005)
- Holler PD, Chlewicki LK, & Kranz DM. TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity. *Nature Immunology*, 4(1), 55–62. (2003)
- Holmes DS, & Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193–197. (1981)
- Holzinger A, Barden M, & Abken H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(12), 1–18. (2016)
- Hombach A a, Schildgen V, Heuser C, Finnern R, Gilham DE, & Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7), 4650–4657. (2007)
- Hombach A, Hombach A, & Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc “spacer” domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids “off-target” activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Therapy*, 17(10), 1206–121391. (2010)
- Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC, White DE, Butman JA, & Sherry RM. Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy. *Clinical Cancer Research*, 16(19), 4892–4898. (2010)
- Hülsmeier M, Chames P, Hillig RC, Stanfield RL, Held G, Coulie PG, ... Ziegler A. A

- major histocompatibility complex-peptide-restricted antibody and T cell receptor molecules recognize their target by distinct binding modes: Crystal structure of human leukocyte antigen (HLA)-A1-MAGE-A1 in complex with Fab-Hyb3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2972–2980. (2005)
- Irles C, Symons A, Michel F, Bakker TR, van der Merwe PA, & Acuto O. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nature Immunology*, 4(2), 189–97. (2003)
- Irvine DJ, Purbhoo M a, Krogsgaard M, & Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.*, 419(6909), 845–9. (2002)
- Itzhaki O, Hovav E, Ziporen Y, Levy D, Kubi A, Zikich D, ... Besser MJ. Establishment and large-scale expansion of minimally cultured “young” tumor infiltrating lymphocytes for adoptive transfer therapy. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 34(2), 212. (2011)
- Janardhan S V., Praveen K, Marks R, & Gajewski TF. Evidence implicating the Ras pathway in multiple CD28 costimulatory functions in CD4 + T cells. *PLoS ONE*, 6(9), e24931. (2011)
- Jenkins MR, & Griffiths GM. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 308–313. (2010)
- Jost LM, Kirkwood JM, & Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunological Methods*, 147(2), 153–165. (1992)
- Jungbluth A, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, ... Old LJ. Immunohistochemical analysis of NY-Eso-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *International Journal of Cancer*, 92(6), 856–60. (2001)
- Kersh EN. Fidelity of T Cell Activation Through Multistep T Cell Receptor Phosphorylation. *Science*, 281(5376), 572–575. (1998)
- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, ... Hwu P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(20 PART 1), 6106–6115. (2006)
- Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, & Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*, 31(1), 71–75. (2013)
- Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, ... Cooper LJJ. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Research*, 66(22), 10995–11004. (2006)
- Kumar R, Ferez M, Swamy M, Arechaga I, Rejas MT, Valpuesta JM, ... van Santen HM. Increased Sensitivity of Antigen-Experienced T Cells through the Enrichment of Oligomeric T Cell Receptor Complexes. *Immunity*, 35(3), 375–387. (2011)
- Kung P, Goldstein G, Reinherz E, & Schlossman S. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*. (1979)
- Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, ... Kurosawa Y. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions

- and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149(3), 960–968. (1987)
- Li Y, Li H, Yang F, Smith-Gill SJ, & Mariuzza RA. X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(6), 482–488. (2003)
- Lier RAW Van, Brouwer M, & Aarden LA. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. *European Journal of Immunology*, 18(1), 167–172. (1988)
- Makalowski J, & Abken H. Can redirected T cells outsmart aggressive melanoma? The promise and challenge of adoptive cell therapy. In: *Melanoma*, Chapter 10, Ed.: Mandi Murph, InTech, pp. 247 - 278, ISBN 978-953-51-2036-0 (2015)
- Maude SL, & Grupp SA. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*, 371(16), 1507–17. (2014)
- Maus MV, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Rivière I, ... Sadelain M. An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Molecular Therapy — Oncolytics*, 3(4), 16023. (2016)
- Mueller DL., Jenkins MK. and Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445–480 (1989)
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, & Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 263–273. (1986)
- Old LJ, & Chen Y-T. New Paths in Human Cancer Serology. *J. Exp. Med*, 187(8), 1163–1167. (1998)
- Oren R, Hod-Marco M, Haus-Cohen M, Thomas S, Blat D, Duvshani N, ... Reiter Y. Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(11), 5733–43. (2014)
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, & Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection (retroviral packaging cells/gene therapy). *Cell Biology*, 90(September), 8392–8396. (1993)
- Pohl C, Renner C, Schwonzen M, Sieber M, Lorenz P, Pfreundschuh M, & Diehl V. Anti-idiotype vaccine against Hodgkin's lymphoma: Induction of B- and T-cell immunity across species barriers against CD30 antigen by murine monoclonal internal image antibodies. *International Journal of Cancer*, 50(6), 958–967. (1992)
- Radvanyi LG, Bernatchez C, Zhang M, Fox PS, Miller P, Chacon J, ... Hwu P. Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research*, 18(24), 6758–6770. (2012)
- Rapoport AP, Stadtmauer E a, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, ... June CH. NY-Eso-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nature Medicine*, 21, 1–20. (2015)

- Redmond WL, Ruby CE, & Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical Reviews in Immunology*, 29(3), 187–201. (2009)
- Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, ... Rosenberg SA. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-Eso-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response. *Clinical Cancer Research*, 21(5), 1019–1027. (2015)
- Sanger F, & Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. (1975)
- Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, ... Dotti G. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1822–1826. (2011)
- Schumacher TNM. T-cell-receptoR gene therapy. *Nature Reviews Immunology*, 2(7), 512–519. (2002)
- Shinkai Y, Rathbun OGary, Lam K-P, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, ... Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5), 855–867. (1992)
- Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, & Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 5(8), 615–625. (2005)
- Singh N, Frey N V., Grupp SA, & Maude SL. CAR T Cell Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potential for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 17(6), 28. (2016)
- Song DG, Ye Q, Carpenito C, Poussin M, Wang LP, Ji C, ... Powell DJ. In vivo persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB). *Cancer Research*, 71(13), 4617–4627. (2011)
- Stewart-Jones G, Wadle A, Hombach A, Shenderov E, Held G, Fischer E, ... Nuber N. Rational development of high-affinity T-cell receptor-like antibodies. *Proc Natl Acad Sci*, 14106(10), 5784–5788. (2009)
- Stone JD, Harris DT, Soto CM, Chervin AS, Aggen DH, Roy EJ, & Kranz DM. A novel T cell receptor single-chain signaling complex mediates antigen-specific T cell activity and tumor control. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(11), 1163–1176. (2014)
- Stone JD, & Kranz DM. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies. *Frontiers in Immunology*, 4(8). (2013)
- Textor A, Listopad JJ, Wührmann L Le, Perez C, Kruschinski A, Chmielewski M, ... Charo J. Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFN γ . *Cancer Research*, 74(23), 6796–6805. (2014)
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, ... Press OW. Adoptive immunotherapy for indolent non-hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 112(6), 2261–2271. (2008)

- Trapani JA, & Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews. Immunology*, 2(10), 735–47. (2002)
- Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, & Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide–MHC complexes. *Nature*, 375(6527), 148–151. (1995)
- Van Rhee F, Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, ... Tricot G. NY-Eso-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*, 105(10), 3939–3944. (2005)
- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, & Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5402), 680–2. (1999)
- Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, ... Murata M. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells. *J Immunol.*, 194(3), 911–20. (2015)
- Weijtens MEM, Willemsen RA, Hart EH, & Bolhuis RLH. 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 Therapy*, 5(9), 1195–1203. (1998)
- Willemsen RA, Ronteltap C, Chames P, Debets R, & Bolhuis RLH. T Cell Retargeting with MHC Class I-Restricted Antibodies: The CD28 Costimulatory Domain Enhances Antigen-Specific Cytotoxicity and Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 174(12), 7853–7858. (2005)
- Winn HJ. Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts . *The Journal of Immunology*, 86(2), 228–239. (1961)
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, Decruz E, Noyer-Weidner M, ... Graham MW. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3469–3478. (1989)
- Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, ... Saito T. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature Immunology*, 6(12), 1253–62. (2005)
- Zah E, Lin M-Y, Silva-Benedict A, Jensen MC, & Chen YY. T cells expressing CD19/CD20 bi-specific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunology Research*, 4(6), 498–508. (2016)
- Zhao Y, Bennett AD, Zheng Z, Wang QJ, Robbins PF, Yu LYL, ... Morgan R a. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(9), 5845–54. (2007)
- WHO | Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/> (2015)

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Univ.-Professor Dr. Hinrich Abken für seine Unterstützung in jeder Phase meiner Dissertation. Die Zeit die er sich genommen hat um Ergebnisse zu diskutieren, die mir weitere Blickwinkel in unserem Arbeitsgebiet zeigten und so maßgeblich die Entwicklung meiner Forschungsarbeit vorantrieb. Zudem förderte er Eigenständigkeit und zeigte stets persönliches Verständnis, was ich nie als selbstverständlich sah und immer als etwas Besonderes sehen werde. Zu guter Letzt danke ich ihm für die akkurate Durchsicht des Manuskripts und die Erstellung des Gutachtens.

Herrn Univ.-Professor Dr. Norbert Koch danke ich besonders für seine entgegenkommende und unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens und für die Begutachtung der Arbeit.

Bei Herrn Univ.-Professor Dr. Sven Burgdorf und Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerd Bendas bedanke ich mich für Ihre Bereitschaft, in der Promotionskommission mitzuwirken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Gunter Rappl für die Hilfestellung bei der Durchführung der Zellsortierung sowie Nicole Riët für die Unterstützung bei den Mausversuchen.

Zu guter Letzt ...

Hier gilt mein Dank meiner Arbeitsgruppe, auch ehemaligen Kollegen, dass ihr diese für mich besondere Zeit über die Jahre zu etwas Unvergesslichem gemacht habt. Ihr gabt mir stets Inspirationen durch die fachlichen Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen. Ganz besonders danke ich Dana, die sich die Zeit genommen hat ihre praktischen Kenntnisse weiter zu geben und all ihre Kniffe & Tricks zeigte und das auf ihre charmante und humorvolle Art & Weise. Andreas danke ich dafür, dass er immer noch einen alternativen Weg darlegte um ans Ziel einer Fragestellung zu gelangen.

Lisa danke ich von Herzen für ihre offene und liebevolle Art, die immer wieder frischen Wind in den Laboralltag und auch unsere Freundschaft brachte. Dafür das du mir die Jahre freundschaftlich zur Seite standst.

Zudem danke ich meinen Freunden, den nahen, dass sie „Ming Stadt am Rhing“ zu dem geliebten Ort von „Heimat“ gemacht haben, der er heute ist und den fernen die mich in meiner „Heimat“ Köln mit Freude besucht haben. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Valérie und Katharina, die diese Freundschaft stets mit bester Laune, schönen Ausflügen und gutem Essen zu etwas einmaligem machten. Dafür das sie immer ein offenes Ohr für mich hatten, mich in jeder Situation unterstützt habt und mir Mut zu sprach.

Meiner Freundin Mirja danke ich von ganzem Herzen für ihre liebevolle Unterstützung in der Endphase meiner Arbeit. Unvergessen war diese Lebensphase für mich mit Astrid. Ihr danke ich dafür, dass sie immer mit ihrer einfühlsamen Art für mich da war und sich Zeit nahm. Vor allem in der Endphase war sie meine Stütze die mich durch fachliche Diskussionen und freundschaftliche Gespräche immer wieder motivierte und mir Kraft gab. Ich danke ihr sehr für die intensive Durchsicht meines Manuskripts.

Schlussendlich geht ein ganz persönlicher Dank an meine Familie, besonders meine Eltern und meinen Bruder. Dankbar bin ich für das innige Geschwisterband das sich während unseres Weges geknüpft hat und ich weiß, dass mein Kopf nicht das einzige ist auf den ich mich verlassen kann. Meinen Eltern danke ich für ihr endloses Vertrauen und ihre unermüdliche Unterstützung, was mir fortwährend den Rücken stärkte.

Ich bin dankbar dafür, dass ihr die ich meine Freunde und Familie nennen darf das Herz am rechten Fleck trägt.

DANKE

Eigene Publikationen

Makalowski J, Abken H. Adoptive cell therapy of melanoma: the challenges of targeting the beating heart. In: Melanoma: from early detection to treatment, Chapter 13, InTech, Ed.: Guy Huynh Thien Duc, ISBN 978-953-51-0961-7, pp 365 - 390 (2013)

Makalowski J, Abken H. Difficulties in targeting the beating heart: therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis in melanoma. In: Cancer Stem Cells. Chapter 33, Ed.: V. K. Rajasekhar, Wiley-Blackwell, p. 451 – 460, ISBN: 978-1-118-35616-6 (2014)

Makalowski J, Abken H. Can redirected T cells outsmart aggressive melanoma? The promise and challenge of adoptive cell therapy. In: Melanoma, Chapter 10, Ed.: Mandi Murph, InTech, pp. 247 - 278, ISBN 978-953-51-2036-0 (2015)

Holzinger A, **Makalowski J**, Abken H. Chimeric antigen receptor (CAR). Encyclopedia of Cancer, ed: M. Schwab, Springer Verlag, doi: 10.1007/978-3-642-27841-9_1096-4 (2015)

Warner K, Oberbeck S, Schrader A, Crispatzu G, Weit N, Mayer P, Neumann T, Pützer S, Pflug N, Varghese L, Thelen M, **Makalowski J**, Riet N, Rapp G, Altmüller J, Kotrová M, Stilgenbauer S, Hopfinger G, Dürig J, Haferlach T, Lanasa M, Hallek M, Mugiakakos D, von Bergwelt-Baildon M, Brüggemann M, Newrzela S, Abken H, Herling M. Aberrant effector functions of the memory-type T-PLL cells imply a leukemogenic cooperation of TCL1A with TCR signaling. (Manuskript)

Makalowski J, Hombach AA, Abken H. TCR engineered T cells exhibit a lower activation threshold than T cells engrafted with a CAR. (Manuskript)

