

# Erhöhung der Antigen-Selektivität von T-Zellen durch Koexpression chimärer Antigen- Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Tobias Riët aus Oberhausen

Berichterstatter: Prof. Dr. Hinrich Abken  
Prof. Dr. Jürgen Dohmen  
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Peter Kloppenburg  
Tag der Disputation: 24.11.2010

## Abstract

Adoptive immunotherapy with chimeric antigen receptor grafted, tumor-reactive T-cells is a promising strategy for treatment of progressive malignant diseases. However, modified T-cells showed insufficient selectivity for tumor cells in clinical studies. This lack of selectivity recently led to fatal side effects of CAR-grafted T-cells due to recognition of healthy cells and induction of massive autoaggression. Simultaneous recognition of two antigens by two different CARs is a possible way to solve this problem.

To address this issue, T-Lymphocytes with coexpression of two CARs with different specificities were studied in this thesis. These bispecific T-cells were generated by means of retroviral cotransduction of the individual CARs or transfer of a bicistronic gene expression cassette. CARs with a IgG<sub>1</sub> spacer domain show preferred dimerisation. Association of the CARs caused homodimer as well as heterodimer formation. The efficiency of T-cell activation is controlled by the configuration of CARs and, furthermore, was enhanced by use of the fused intracellular signaling domains of CD28 and CD3 $\zeta$ , compared to coexpression of individual CD28 and CD3 $\zeta$  CARs. Bispecific T-cells offered significantly enhanced selectivity for coexpressed antigens, increasing T-cell activation by binding of the second antigen. At the same time, the activation threshold of bispecific T-cells was increased, so that cells with a low antigen expression were not recognized any longer.

By use of this strategy, CAR modified T-cells are desensitized to healthy cells with a single antigen and provided with recognition of antigen patterns. Hence, coexpression of two CARs with different specificities can outmatch the modification of T-cells with a single CAR, offering improved selectivity of a targeted adoptive T-cell therapy.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Molekulare Therapien .....	1
1.2 Zelluläre Immuntherapien .....	3
1.3 Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) .....	6
1.4 Vorteile der adoptiven T-Zell-Therapie .....	10
1.5 Nachteile der adoptiven T-Zell-Therapie.....	13
1.6 Optimierung der CAR-vermittelten Immuntherapie.....	16
1.7 Zielsetzung .....	19
<b>2. Material .....</b>	<b>21</b>
2.1 Stammlösungen und Puffer .....	21
2.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.3 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze .....	23
2.4 Bakterienstämme.....	24
2.5 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze .....	24
2.6 Zelllinien .....	26
2.7 Primäre Zellen .....	29
2.8 Antikörper und Proteine .....	29
2.8.1 Primärantikörper, nicht konjugiert .....	29
2.8.2 Primärantikörper, konjugiert .....	30
2.8.3 Sekundärantikörper, konjugiert .....	32
2.8.4 Proteine und Fusionsproteine .....	32
2.9 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer.....	33
2.10 Oligonukleotide .....	34
2.10.1 Klonierungsprimer, CAR-P2A in pCR2.1.....	34
2.10.2 Klonierungsprimer, ErbB2-eGFP .....	34
2.10.3 Sequenzierungsprimer, CAR-P2A in pCR2.1.....	35
2.10.4 Sequenzierungsprimer, ErbB2-eGFP.....	36
2.11 Vektoren .....	38

2.11.1	Retrovirale pBullet Expressionsvektoren.....	40
2.11.2	Retrovirale pQCXIN/H Expressionsvektoren.....	42
2.11.3	Retrovirale pMP71-wPRE Expressionsvektoren .....	43
2.11.4	Sonstige Expressionsvektoren.....	45
2.11.5	pCR®2.1 Klonierungsvektoren.....	45
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>48</b>
3.1	Präparation von Plasmid-DNS.....	48
3.1.1	Midi-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule .....	48
3.1.2	Mini-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule .....	48
3.1.3	Schnellpräparation von Plasmid-DNS nach der Koch- (boiling) Methode .....	49
3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	50
3.2.1	Photometrische Bestimmung .....	50
3.2.2	Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden.....	50
3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	50
3.4	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose .....	51
3.5	Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNS .....	51
3.5.1	Spaltung der doppelsträngigen DNS durch Restriktions- Endonukleasen .....	51
3.5.2	Ligation von DNS-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNS-Ligase.....	52
3.6	Bakterienkultur.....	52
3.6.1	Herstellung chemokompetenter E.coli DH5α Bakterien .....	52
3.6.2	Transformation kompetenter E.coli DH5α Bakterien .....	54
3.7	Polymerase-Kettenreaktion .....	54
3.8	Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode .....	56
3.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	57
3.10	Western Blot.....	58
3.11	Sandwich-ELISA.....	59
3.12	Zellkultur .....	61

3.12.1	Kulturbedingungen.....	61
3.12.2	Passagieren adhärenter Zellkulturen .....	62
3.12.3	Lymphozyten-Separation mittels Dichte-Zentrifugation.....	62
3.12.4	Transfektion von Tumorzellen der Linie 293T .....	63
3.12.5	Generierung stabil transfizierter Zellen .....	64
3.12.6	Retrovirale Transduktion peripherer Blutlymphozyten.....	65
3.12.7	Kryokonservierung von Zellen.....	66
3.12.8	Herstellung von Zell-Lysaten.....	67
3.13	Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analysen.....	67
3.14	Magnetische Zellseparation MACS®.....	68
3.14.1	Indirekte Separation von T-Lymphozyten mittels Depletion ....	68
3.14.2	Direkte Separation CAR-exprimierender T-Zellen mittels Anreicherung.....	69
3.15	Produktion monoklonaler Antikörper.....	70
3.15.1	Reinigung und Konzentration von Antikörpern und Proteinen aus Zellkulturüberständen.....	70
3.15.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen....	71
3.16	Kultivierung auf oberflächengebundenen Antikörpern .....	72
3.17	Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen .....	74
3.18	XTT-basierender Viabilitätstest.....	74
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
4.1	Funktionelle Komplementation koexprimierter chimärer Antigen- Rezeptoren.....	76
4.1.1	Komplementierung der CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3ζ und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 .....	76
4.1.2	Komplementierung der CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 .....	81
4.1.3	Komplementierung der CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3ζ und #961 BW431/26scFv-Fc-CD3ζTM-CD28-CD3ζ .....	84
4.2	Generierung ErbB2 und CEA exprimierender Tumorzelllinien.....	88
4.3	Klonierung des ErbB2-eGFP Expressionsvektors .....	90
4.4	Charakterisierung des Proteins ErbB2-eGFP .....	92
4.5	Nachweis der CAR Koexpression.....	93

4.6	Zell-vermittelte Aktivierung koexprimierter CAR .....	95
4.6.1	Antigen-spezifische Zytolyse von Tumorzellen .....	95
4.6.2	Antigen-induzierte Zytokin-Sekretion .....	98
4.7	Physikalische Assoziation chimärer Antigen-Rezeptoren .....	100
4.8	Klonierung des Plasmids pMP71-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A- BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262) .....	104
4.9	Funktionelle Charakterisierung koexprimierter CAR #1262 .....	108
4.9.1	Koexpression der CAR.....	108
4.9.2	Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	111
4.10	Kinetik der #710, #1156 und #1262 CAR-vermittelten Aktivierung ....	114
4.11	Klonierung des Plasmids pMP71-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ - P2A-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ (#1263).....	121
4.12	Funktionelle Charakterisierung koexprimierter CAR #1263 .....	125
4.12.1	Koexpression der CAR.....	125
4.12.2	Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	129
4.13	Kinetik der CAR #607, #714 und #1263 vermittelten Aktivierung .....	132
4.14	Generierung von Tumorzelllinien mit unterschiedlicher ErbB2 Expressionsdichte .....	139
4.15	Zell-vermittelte Aktivierung durch die koexprimierten CAR #1263.....	141
4.15.1	Antigen-spezifische Zytolyse von Tumorzellen .....	141
4.15.2	CAR-vermittelte IFN- $\gamma$ -Sekretion.....	145
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>148</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>159</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>160</b>
7.1	DNS-Sequenz des Fusionsproteins ErbB2-eGFP (#1192) .....	160
7.2	DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassetten .....	164
7.2.1	pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk- BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262) .....	164
7.2.2	pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk- BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ (#1263) .....	170
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>177</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Modularer Aufbau eines CAR .....	7
Abbildung 2:	CAR-vermittelte Effektorfunktionen genetisch modifizierter T-Zellen.....	9
Tabelle 1:	Spezifität ausgewählter CAR .....	10
Abbildung 3:	Überblick über das Konzept der zellulären adoptiven Immuntherapie .....	12
Abbildung 4:	Rekombinante Immunrezeptoren im Vektor pBullet.....	41
Abbildung 5:	Retrovirale pQXCIN/H Vektoren .....	42
Abbildung 6:	Retrovirale pMP71 Vektoren .....	43
Abbildung 7:	Klonierungsprodukte im Vektor pCR®2.1 .....	47
Abbildung 8:	Tritrationsschema für die Bestimmung der Aktivierungskinetik .....	73
Abbildung 9:	Zweidimensionale Tritration zur Simulation heterogener Antigendichte .....	73
Abbildung 10:	Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #537 und #637.....	77
Abbildung 11:	Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	78
Abbildung 12:	Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	80
Abbildung 13:	Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #637 und #710.....	81
Abbildung 14:	Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	83
Abbildung 15:	Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #435 und #961.....	85
Abbildung 16:	Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR .....	87
Abbildung 17:	Zellklone der Linien MC38 und C15A3 mit stabiler ErbB2-Expression .....	89
Abbildung 18:	Generierung der Expressionskassette für das Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP .....	91
Abbildung 19:	Expression des ErbB2-eGFP Proteins in 293T Zellen .....	92
Abbildung 20:	CAR Koexpression in T-Zellen.....	94



Abbildung 21: CEA und ErbB2 Expression der Tumorzellen MC38 und C15A3.....	95
Abbildung 22: Antigen-spezifische Zytolyse durch funktionelle Interaktion....	97
Abbildung 23: Antigen-induzierte Zytokin-Sekretion modifizierter T-Zellen....	99
Abbildung 24: Nachweis der CAR-Dimere und -Monomere.....	101
Abbildung 25: Nachweis der CAR-Heterodimere.....	103
Abbildung 26: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 in pMP71 (#1262) .....	107
Abbildung 27: Antigen-Bindung der koexprimierten CAR #1262 .....	109
Abbildung 28: Expression der CAR in humanen T-Zellen (#1262) .....	110
Abbildung 29: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1262 .....	113
Abbildung 30: CAR #710, #1156 und #1262 vermittelte T-Zell-Aktivierung .	116
Tabelle 2: Antigenkonzentration zur CAR #710, #1156 und #1262 vermittelten T-Zell-Aktivierung .....	117
Abbildung 31: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit koexprimierten CAR #1262 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration .....	119
Abbildung 32: Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1262 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration...	119
Tabelle 3: Schwellenwerte der Antigenkonzentrationen zur Aktivierung der T-Zellen mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ .....	120
Abbildung 33: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 in pMP71 (#1263) .....	124
Abbildung 34: Antigen-Bindung der koexprimierten CAR #1263 .....	126
Abbildung 35: Koexpression der CAR in humanen T-Zellen (#1263).....	128
Abbildung 36: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1263 .....	131
Abbildung 37: CAR #607, #714 und #1263 vermittelte T-Zell-Aktivierung...	134
Tabelle 4: Antigenkonzentration zur CAR #607, #714 und #1263 vermittelten T-Zell-Aktivierung .....	135

Abbildung 38: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit koexprimierten CAR #1263 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration .....	137
Abbildung 39: Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1263 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration...	137
Tabelle 5: Schwellenwerte der Antigenkonzentrationen zur Aktivierung der T-Zellen mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ .....	138
Abbildung 40: ErbB2 Expression der MC38.B2 und C15A3.C2R Subklone .....	140
Abbildung 41: Antigenexpression der verwendeten Zielzellen.....	143
Abbildung 42: Antigen-vermittelte Zytolyse von Tumorzellen mit unterschiedlicher Antigenexpression .....	144
Abbildung 43: IFN- $\gamma$ Sekretion modifizierter T-Zellen durch Tumorzellen mit unterschiedlicher Antigenexpression.....	147

## Abkürzungsverzeichnis

<b>7-AAD</b>	7-Amino-Actinomycin D
<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AML</b>	<i>engl.</i> : Acute Myeloid Leukemia
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Ampicillin-Resistenzgen
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>ATCC</b>	<i>engl.</i> : American type culture collection
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>B-CLL</b>	<i>engl.</i> : Chronic Lymphocytic B-Cell Leukemia
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>BSM</b>	bovines submaxillares Mucin
<b>CA19-9</b>	Carbo-Anhydrat 19-9
<b>CA72-4</b>	Carbo-Anhydrat 72-4
<b>CAR</b>	chimärer Antigen-Rezeptor
<b>CD</b>	<i>engl.</i> : Cluster of differentiation
<b>CEA</b>	<i>engl.</i> : Carcinoembryonic antigen
<b>C<sub>H2/3</sub></b>	<i>engl.</i> : constant region 2/3 of heavy chain
<b>cfu</b>	<i>engl.</i> : Kolony forming unit
<b>CMV</b>	<i>engl.</i> : Cytomegalovirus
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>ddNTP</b>	di-Desoxynukleotid-Triphosphat
<b>D-MEM</b>	<i>engl.</i> : Dulbecco's modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleotid-Triphosphat
<b>DR4/5</b>	<i>engl.</i> : Death Receptor 4/5
<b>ECL</b>	Elektrochemilumineszenz
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure

<b>(e)GFP</b>	<i>engl.</i> : (enhanced) Green Fluorescent Protein
<b>ELISA</b>	<i>engl.</i> : Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>ErbB2</b>	Her2/neu; <i>engl.</i> : human epidermal growth factor receptor B2
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	Durchflusszytometrie; <i>engl.</i> : Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FasL</b>	Fas Ligand
<b>Fc</b>	<i>engl.</i> : crystallisable Fragment
<b>FcεRI</b>	Fc-Epsilon-Rezeptor I
<b>FCS</b>	<i>engl.</i> : Fetal calf serum
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>g</b>	Erdbeschleunigung, <i>engl.</i> : gravitational acceleration
<b>gag</b>	<i>engl.</i> : group-specific antigen
<b>GvHD</b>	<i>engl.</i> : Graft-versus-Host Disease
<b>HCl</b>	Hydrochlorid, Salzsäure
<b>HEK</b>	<i>engl.</i> : Human embryonic Kidney (-Cell)
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
<b>HRP</b>	<i>engl.</i> : Horseradish Peroxidase
<b>Hyg<sup>R</sup></b>	Hygromycin-B-Resistenzgen
<b>IC</b>	<i>engl.</i> : Intracellular (Domain)
<b>IFN-γ</b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL-2/10</b>	Interleukin 2/10
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<b>IRES</b>	<i>engl.</i> : Intraribosomal Entry Side
<b>kb</b>	kilo-Basenpaare
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>kDa</b>	kilo-Dalton

<b>LB</b>	<i>engl.:</i> Lysogeny broth
<b>Lk</b>	<i>engl.:</i> Kappa Leader (peptide)
<b>LTR</b>	<i>engl.:</i> Long Terminal Repeat
<b>MACS®</b>	<i>engl.:</i> Magnetic Activated Cell Sorting
<b>MFI</b>	<i>engl.:</i> Mean Fluorescence Intensity
<b>MHC</b>	<i>engl.:</i> Major Histocompatibility Complex
<b>MOPS</b>	20mM-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 5mMNa-Acetat, 1mM EDTA, pH 7
<b>mRNA</b>	<i>engl.:</i> messenger Ribonucleic Acid
<b>MSV</b>	Maus Sarkoma Virus
<b>MWCO</b>	<i>engl.:</i> Molecular Weight Cut Off
<b>NCI</b>	<i>engl.:</i> National Cancer Institute (USA)
<b>Neo<sup>R</sup></b>	Neomycin-Resistenzgen
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin-Lymphom
<b>NSCLC</b>	<i>engl.:</i> Non-Small-Cell-Lung-Cancer
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>ori</b>	<i>engl.:</i> origin of replication
<b>P2A</b>	2A-Peptid des Picornavirus
<b>PBL</b>	Periphere Blutlymphozyten
<b>PBMC</b>	<i>engl.:</i> Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>PBS</b>	<i>engl.:</i> Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	<i>engl.:</i> Polymerase Chain Reaction
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PIPES</b>	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
<b>PMS</b>	Phenazin Methosulfat
<b>POD</b>	Peroxidase (vgl. →HRP)
<b>pol</b>	(Reverse Transkriptase) Polymerase
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>rpm</b>	<i>engl.:</i> revolutions per minute
<b>RPMI</b>	<i>engl.:</i> Roswell Park Memorial Institute Medium
<b>RT</b>	Raumtemperatur

<b>scFv</b>	<i>engl.:</i> single chain fragment of variable region
<b>SDS</b>	<i>engl.:</i> Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SDS-Page</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>TAA</b>	Tumor-assoziiertes Antigen
<b>TAE</b>	Tris-HCl/ Acetat/ EDTA Puffer
<b>TAG-72</b>	Tumorantigen 72 (vgl. →CA72.4)
<b>TBS</b>	<i>engl.:</i> Tris-buffered Saline (vgl.→Tris)
<b>TCR</b>	<i>engl.:</i> T-Cell Receptor
<b>TGF-β</b>	<i>engl.:</i> Transforming Growth Factor Beta
<b>TIL</b>	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
<b>TM</b>	Transmembran (-Domäne)
<b>TNF</b>	Tumornekrose Faktor
<b>TRAIL</b>	<i>engl.:</i> TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	<i>engl.:</i> Unit
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VEGF</b>	<i>engl.:</i> Vascular Endothelial Growth Factor
<b>V<sub>H/L</sub></b>	<i>engl.:</i> variable region of heavy/light chain
<b>WHO</b>	<i>engl.:</i> World Health Organization
<b>XTT</b>	Natrium3'-[1-[(Phenylamino)Karbonyl]-3,4-Tetrazolium]-bis(4-Methoxy-6-Nitro)Benzensulfonsäurehydrat

# 1. Einleitung

Die mit 60% aller Todesfälle pro Jahr weltweit häufigste Todesursache stellen Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems, Diabetes, chronische Atemwegserkrankungen und die neoplastischen Erkrankungen dar. Nachdem bis Anfang der 1990er Jahre der Anteil der neoplastischen Erkrankungen aufgrund von verbesserter Diagnostik und steigender Lebenserwartung stieg (Koh 1991), wurde in den Industrieländern eine Stagnation und in einigen Bereichen eine Abnahme der Sterberate beobachtet (NCI, cancer trends progress report 2009/2010). Insbesondere in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Lohnniveau erwartet die Weltgesundheitsorganisation WHO jedoch eine kontinuierliche Zunahme an Krebstoten von 5,5 Millionen im Jahr 2005 bis auf 8,9 Millionen im Jahr 2030 (WHO, 2007). Dabei werden 90% aller Todesfälle durch die Therapieresistenz metastasierender Tumoren verursacht (Fidler 2002; Fidler 2003). Die wichtigsten Aufgaben zur erfolgreichen Bekämpfung neoplastischer Erkrankungen sind die Prävention, die diagnostische Früherkennung und die effiziente therapeutische Behandlung. Zu den klassischen therapeutischen Maßnahmen zählen bisher die chirurgische Versorgung, die Bestrahlung und die zytostatische Chemotherapie. Die operative Entfernung hat sich insbesondere bei spät metastasierenden soliden Tumoren bewährt, ist jedoch bei früh metastasierenden Tumoren, beim Befall lebenswichtiger Organe und Leukämien ungeeignet. Da neoplastische Erkrankungen eine unlimitierte Proliferation maligne transformierter somatischer Zellen darstellt, sind wenige residuale Tumorzellen ausreichend, um eine Remission der Krankheit nach initial erfolgter Therapie auszulösen.

## 1.1 Molekulare Therapien

Die Chemo- und Bestrahlungstherapien beruhen auf gezielter Bekämpfung sich schnell teilender Zellen. Transformierte Zellen haben im Vergleich zu gesunden Zellen ein eingeschränktes Regenerationsvermögen und sind sensitiver gegenüber Strahlungsschäden der DNS. Daher wird die Bestrahlung häufig als Begleittherapie zur operativen Entfernung eingesetzt. Der Einsatz von

Zytostatika in der Chemotherapie wirkt ausschließlich auf Zellen mit einer hohen Proliferationsrate und verursacht so ebenfalls die Eliminierung neoplastisch transformierter Zellen. Der Nachteil der klassischen Chemo- und Strahlentherapie ist deren hohe systemische Toxizität. Durch die hohe Strahlendosis, die notwendig ist, um möglichst viele Tumorzellen zu erreichen, werden auch gesunde Zellen eliminiert, so dass klinisch relevante Nebenwirkungen auftreten (Berkey 2010). Diese umfassen Hautveränderungen und chronischen Erschöpfungszustände, Beeinträchtigungen des Verdauungstraktes, Haarausfall, eine Organschädigung je nach lokaler Behandlung und Langzeiteffekte wie Unfruchtbarkeit. Ein ebenso breites Spektrum unerwünschter Wirkungen verursachen die zytostatischen Chemotherapeutika (Schuell et al. 2005; Weiss 2010; Curigliano et al. 2010). Insbesondere gesunde Zellen mit hoher Zellverdopplung, wie Schleimhautepithelzellen, Haarfollikelzellen und Zellen, die an der Hämatopoese beteiligt sind, werden eliminiert. Neben den für die Bestrahlung beschriebenen Symptomen kommt es zu einer Schädigung des Immunsystems. Da metastasierende Tumore mit zunehmender Behandlungsdauer resistent gegenüber diesen klassischen Therapien werden, mussten Behandlungsstrategien entwickelt werden, die das Immunsystem als Effektoren gegen Tumorzellen rekrutieren (Dexter und Leith 1986; Schor 2009).

Durch die Identifikation sogenannter Tumor-assoziiertes Antigene (TAA) und von Proteinen, welche bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen, konnte die Spezifität der Tumorerkennung deutlich erhöht werden. Mit Hilfe dieser neuen Zielstrukturen wurden einerseits spezifische Inhibitoren generiert, die in zielgerichteten Therapien eingesetzt werden. Zu den momentan eingesetzten zielgerichteten Therapeutika (Gutierrez et al. 2009; Biswas und Eisen 2009) zählen beispielsweise die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren Imatinib und Gefitinib oder Angiogenese-Inhibitoren wie der VEGF-spezifische monoklonale Antikörper Bevacizumab. Andererseits führte die Generierung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für Tumorantigene sind, zur Entwicklung der Antikörper-gerichteten Therapien. Hierbei werden den Patienten Antikörper wie beispielsweise Rituximab (Anderson et al. 1997) verabreicht, die an das Antigen des Tumors binden und mit Hilfe des



körpereigenen Immunsystems eine spezifische Zytolyse der transformierten Zellen bewirken. Zytokine wie Interleukin-2, das in der Tumortherapie eingesetzt wird (Atkins et al. 1986; Rosenberg et al. 1998), können mit Antikörpern zu Immunzytokinen fusioniert werden und eine Verstärkung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität bewirken (Davis und Gillies 2003). Weitere Antikörper-gerichtete Therapien stellen Verknüpfungen TAA-spezifischer Antikörper mit Toxinen, Enzymen, Chemo- oder Strahlentherapeutika und Pharmazeutika dar, die nach spezifischer Bindung an Tumorzellen internalisieren und zur Eliminierung der Tumorzellen führen. Insgesamt wird durch die Strategie der Antikörper-gerichteten Therapien die Toxizität systemisch verabreichter Therapeutika durch die Akkumulation am Tumor verringert. Aufgrund der hohen Spezifität stellt diese Therapieform eine den Standardtherapien an Verträglichkeit überlegene Behandlungsmethode dar. Eine Wirksamkeit in vielen Neoplasien wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) hängt allerdings von Faktoren wie der Expression bestimmter Tumorantigene ab.

## 1.2 Zelluläre Immuntherapien

Mit zellulären Immuntherapien versucht man, die Immunzellen des Patienten als Therapeutika einzusetzen, so dass eine zytolytische Eliminierung der Tumorzellen bewirkt wird. Dabei erhofft man sich insbesondere durch die Nutzung der lytischen Aktivität und des Aufspürens von residualen Tumorzellen Vorteile bei früh metastasierenden Tumoren. Der adoptive Transfer von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) war eine der ersten Entwicklungen zu dieser Strategie (Grimm et al. 1982). Dabei wurden autologe Lymphozyten von Tumorpatienten *ex vivo* mit Hilfe von Interleukin-2 expandiert und dem Patienten injiziert. Die Nachteile des Verfahrens sind hohe Toxizität, geringe Akkumulation am Tumor und die Inhibition transferierter Zellen im Tumormilieu.

Der Transfer allogener T-Zellen stellt eine weitere Methode zur zellulären Therapie von Tumorerkrankungen dar. Allogene T-Zellen werden beispielsweise aus dem peripheren Blut eines Spenders gewonnen und *ex vivo* in Gegenwart

von IL-2 oder Tumorantigen-spezifisch mit Tumorzellen des Empfängers expandiert. Damit werden zytotoxische Immunzellen vermehrt, die über eine polyklonale Spezifität gegenüber den Tumorzellen des Empfängers verfügen. Insbesondere nach hämatopoetischer Stammzelltherapie hat sich diese Therapieform als wirksam erwiesen, um eine anhaltende Remission zu erzielen. Mit der *ex vivo* Expansion allogener Immunzellen wurden allerdings auch sogenannte HLA-alloreaktive Zellen vermehrt, die im Empfänger zur Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) führten. Das Risiko für eine GvHD, bei der die Spenderzellen das gesunde Gewebe des Empfängers angreifen, wird vor allem durch unterschiedliche HLA-Klasse II Antigene erhöht. Zur Vermeidung einer GvHD werden alloreaktive Zellen vor dem adoptiven Transfer depletiert. Weitere Nachteile dieser Methode sind eine unbekannte Spezifität gegen die Empfängerzellen und damit das Risiko von Nebenwirkungen sowie einer eingeschränkten Wirksamkeit. Ähnlich dem Mechanismus der beschriebenen LAK-Zellen können aber auch allogene, nicht HLA-identische, zytotoxische Zellen in einer Tumorthherapie eingesetzt werden. Die Nachteile ergeben sich aus der Möglichkeit einer GvHD sowie der geringen Akkumulation am Tumor.

Eine Weiterentwicklung der *ex vivo* Expansion von weitgehend Tumorspezifischen Immunzellen ist die adoptive Therapie mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL). Dabei werden die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) den Tumorkläsionen entnommen, *ex vivo* expandiert und in großer Anzahl dem Patienten zurückgegeben. Erste Studien haben jedoch gezeigt, dass das Erkennungspotential von verwendeten unselektierten Immunzellen nicht ausreichte, um Standard-Immuntherapien zu verbessern (Rosenberg et al. 1993). Daher wurde während der Expansion die Tumorantigen-Spezifität der Immunzellen durch Kultivierung in Gegenwart von Zellen der Tumorkläsion selektiert. Diese adoptive Immuntherapie erreichte mit einer unterstützenden Zytokintherapie eine hohe durchschnittliche Ansprechrate und erwies sich damit als wirkungsvolle und vielversprechende Behandlungsform metastasierender maligner Melanome (Dudley et al. 2008). Ein Nachteil dieser Strategie stellt die limitierte Anzahl der Zellen dar, die aus Tumoren isoliert werden können. Insbesondere bei Leukämien, die keine Biopsien von Tumorkläsionen zu diesem

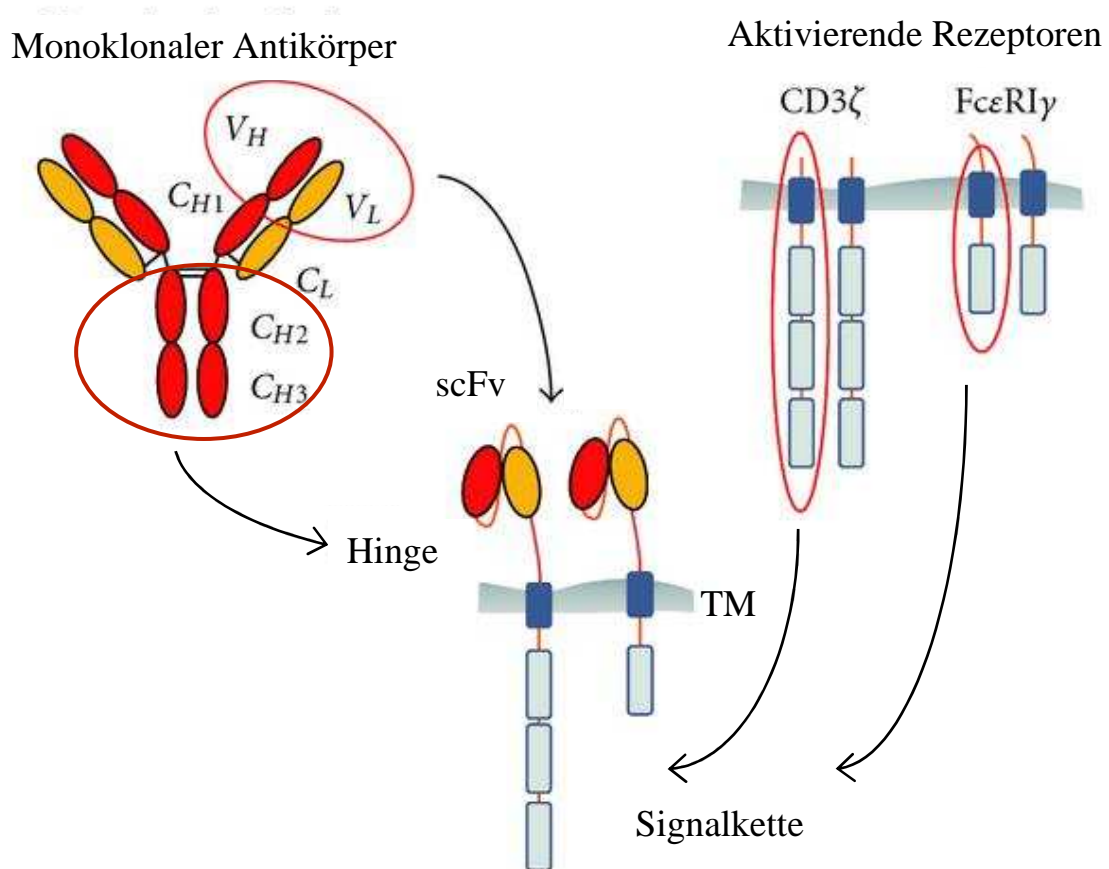
Zweck ermöglichen, wie auch in vielen soliden Tumoren, ist die Inzidenz von Tumorantigen-spezifischen T-Lymphozyten äußerst gering.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Strategie entworfen, bei der polyklonale T-Zellen des Patienten *ex vivo* modifiziert werden, um ihnen Spezifität gegen ein bestimmtes Tumorantigen zu verleihen. Bei dieser adoptiven Immuntherapie werden die T-Lymphozyten mit Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) ausgestattet. Dazu werden die Expressionskassetten rekombinanter TCR mit Hilfe der retroviralen Transduktion in T-Lymphozyten eingebracht. Der rekombinante TCR verfügt über eine Spezifität für Peptide bestimmter Tumor-assoziiierter Proteine, die sie über die MHC-vermittelte Antigenpräsentation binden. Kommt es zu einer Kreuzvernetzung der TCR-Komplexe, wird eine T-Zell-Aktivierung vermittelt und eine Antigen-spezifische Zytolyse der Tumorzelle induziert. Mit Hilfe von zytotoxischen T-Lymphozyten, die diese rekombinanten Rezeptoren exprimierten, wurden in der präklinischen Evaluationsphase erfolgversprechende Ergebnisse erzielt (Brentjens et al. 2003), die in klinischen Studien bestätigt werden konnten (Morgan et al. 2006). Durch die Verwendung genetisch modifizierter, Tumorantigen-spezifischer TCR wird einerseits die Spezifität für Tumorzellen erhöht, andererseits gibt es auch Nachteile dieses Konzeptes, die sich aus der MHC-restringierten Antigenpräsentation erklären. Tumorzellen können der Überwachung des Immunsystems durch unzureichende Expression und/oder Dysregulation der Funktion einzelner Komponenten des MHC-Klasse I Komplexes sowie weiterer Proteine, die an der Prozessierung und dem Transport von Peptiden beteiligt sind (Khong und Restifo 2002), entgehen. Des Weiteren kann die Spezifität der TCR-modifizierten T-Zellen durch den endogenen TCR beeinflusst werden. Der Mechanismus ist auf den heterodimeren Aufbau des TCR zurückzuführen. Auf der Zelloberfläche können sich neben den Heterodimeren des nativen endogenen TCR und den rekombinanten TAA-spezifischen TCR-Heterodimeren auch Heterodimere ausbilden, die aus endogenen und rekombinanten TCR-Untereinheiten bestehen. Diese Fehlpaarung kann zu einer unerwünschten und unbekanntem Spezifität der T-Zellen führen und setzt außerdem die Expressionsdichte von TCR der gewünschten Spezifität herab (Schumacher

2002). Daher werden zurzeit intensiv Mechanismen zur Verhinderung dieser Heterodimere erforscht (Govers et al. 2010).

### 1.3 Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR)

T-Zellen können genetisch zur Expression des Antikörper-basierenden chimären Antigen-Rezeptors CAR modifiziert werden, um T-Zellen eine Antikörper-ähnliche Spezifität zu verleihen. Durch Kreuzvernetzung der CAR erfolgt eine Signaltransduktion, die zur Aktivierung der T-Zellen und zur Ausführung von Effektorfunktionen wie Antigen-spezifische Zytolyse und Zytokinsekretion führt (Gross et al. 1989; Gross und Eshhar 1992). Der CAR vermittelt T-Lymphozyten Tumorantigen-spezifisch Effektorfunktionen und wird daher auch als Immunrezeptor bezeichnet. Chimäre Antigen-Rezeptoren wurden Ende der 1980er Jahre entwickelt. Im Gegensatz zu TCR-modifizierten T-Zellen können CAR-exprimierende T-Zellen Tumor-assoziierte Antigene unabhängig von der MHC-restringierten Antigenpräsentation erkennen. Somit ist die Erkennung von Tumorzellen, die eine dysregulierte MHC-Präsentation aufweisen, gewährleistet. Die erste Variante der CAR bestand aus den konstanten TCR-Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, welche mit den variablen Antikörper-Domänen der schweren und leichten Kette  $V_H$  und  $V_L$  eines Antikörpers fusioniert waren. Die Expression zweier Proteinuntereinheiten erforderte den Transfer einer bicistronischen Genkassette, welcher zu dieser Zeit sehr ineffizient war. Durch die Verwendung der TCR-Domänen erreichte man die Assoziation mit dem TCR-Komplex, war jedoch auf das Signal der TCR-Signaldomänen festgelegt. Diese Probleme wurden durch die Fusion der variablen Antikörper-Domänen zu einer Einzelkettenbindedomäne (scFv) und dem modularen Aufbau der zweiten CAR-Generation gelöst. Bis heute entspricht der Aufbau chimärer Antigen-Rezeptoren diesem Grundprinzip (Abb.1).



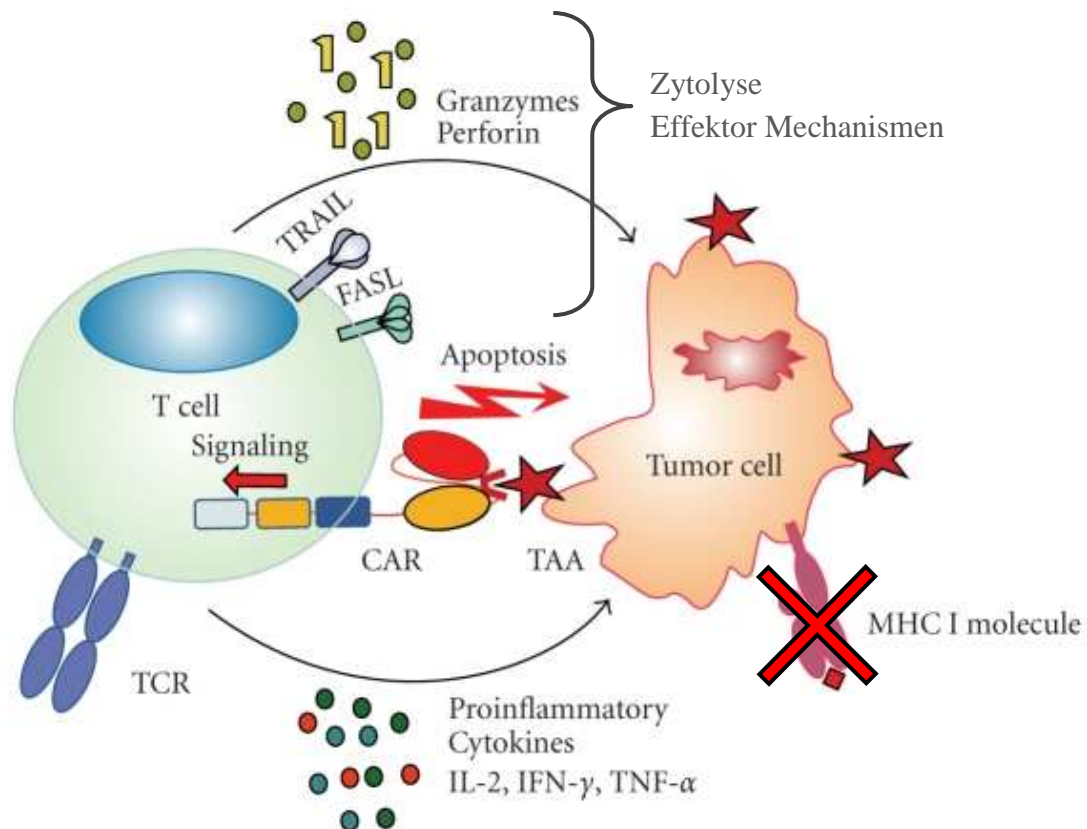
**Abbildung 1: Modularer Aufbau eines CAR**

CAR bestehen aus einer Bindedomäne, einem extrazellulären Gelenk- (hinge) und Überbrückungselement (spacer), einer Transmembran Region (TM) und der intrazellulären Signaldomäne. Die Einzelkettenbindedomäne (scFv) ist von einem monoklonalen Antikörper abgeleitet. Die Signaldomänen stammen aus TCR-Komplex Signaldomänen und/oder kostimulatorischen Molekülen. (Modifiziert aus Cartellieri et al. 2010)

Zur Generierung der Einzelkettenbindedomäne (scFv) der CAR werden die DNS Sequenzen der variablen Domänen  $V_H$  und  $V_L$  eines Antikörpers fusioniert. Die Einzelkettenbindedomäne ist mit einer intrazellulären Signaldomäne verknüpft, die aus dem TCR-Protein CD3 $\zeta$  der T-Zellen oder dem Fc $\epsilon$ RI Fc-Rezeptor der Mastzellen stammt. Bei der Kombination mehrerer Signaldomänen wird meist die Transmembrandomäne der membranproximalen Signaldomäne eingesetzt, kann jedoch auch durch Transmembrandomänen anderer Proteine ausgetauscht werden. Zur Verknüpfung dieser drei Domänen wird im extrazellulären Teil häufig eine Brückendomäne verwendet, die dem Protein zusätzliche Stabilität durch

Dimerisierung mit Hilfe von Disulfidbrücken sowie Flexibilität bei der Antigenbindung verleiht. Bei den hier verwendeten Immunrezeptoren stammt die Brückendomäne von der schweren Kette der konstanten Domäne des humanen IgG<sub>1</sub> (C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>). Die Expression erfolgt bevorzugt durch retro- oder lentivirale Vektoren, in welche die fusionierte DNS dieser Proteindomänen zusammen mit der DNS für das N-terminale Signalpeptid Kappa ( $\kappa$ -leader oder L $\kappa$ ) kloniert wird. T-Zellen, die chimäre Antigen-Rezeptoren exprimieren, werden auch als „T-bodies“ bezeichnet.

Der Aufbau chimärer Antigen-Rezeptoren der dritten Generation ist eine Weiterentwicklung dahingehend, dass zu der aktivierenden Signaldomäne eine oder mehr Signaldomänen mit kostimulatorischer Funktion zu einer intrazellulären Domäne fusioniert werden, so dass mit spezifischer Bindung an das entsprechende Antigen ein kostimulatorisches Signal generiert wird. Dieses führt zu verstärkter Proliferation, Sekretion weiterer Immunzytokine wie Interleukin-2 oder einer vermehrten Differenzierung zu Gedächtniszellen (Abb.2). Mit der Kombination kostimulatorischer Signaldomänen kann das häufige Fehlen der entsprechenden Liganden auf Tumorzellen kompensiert und eine Anergie durch unvollständige Aktivierung der T-Zelle verhindert werden.



**Abbildung 2: CAR-vermittelte Effektorfunktionen genetisch modifizierter T-Zellen**

Die Tumorerkennung der T-Zelle durch die Bindung des CAR an das Tumor-assoziierte Antigen führt zur MHC-unabhängigen T-Zell-Aktivierung. Zytotoxische T-Zellen eliminieren Tumorzellen durch Sekretion von Perforin und Granzym sowie durch FasL und TRAIL vermittelte Apoptose Signale. Zusätzlich werden proinflammatorische Zytokine sezerniert, die stimulierend auf weitere Immunzellen wirken. (Modifiziert aus Cartellieri et al. 2010)

Durch Verwendung verschiedener scFv Spezifitäten können auch nicht klassische T-Zell-Antigene wie Carbohydrate erkannt und mit einer Vielzahl von gewünschten Effektorfunktionen durch Kombination von Bindedomänen und Signaldomänen verbunden werden (Tabelle 1). Mit Hilfe von zytotoxischen T-Lymphozyten, die chimäre Antigen-Rezeptoren exprimierten, wurden in der präklinischen Evaluationsphase erfolgversprechende Ergebnisse erzielt (Hombach et al. 2006), die zum Teil in klinischen Studien bestätigt werden konnten (Kershaw et al. 2006).

Antigen Spezifität	Signaldomäne	Neoplasie	Referenzen
CEA	CD3 $\zeta$ / Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	Karzinome des Urogenitaltraktes, Karzinome des Gastrointestinaltraktes, Mammakarzinom etc.	(Gilham et al. 2002)
CEA	CD28.CD3 $\zeta$		(Hombach et al. 2001)
CEA	CD3 $\zeta$ .CD134		(Koehler et al. 2007)
CEA	CD137.CD3 $\zeta$		
CD19	CD3 $\zeta$	B-CLL, NHL, AML	(Marin et al. 2007),
CD19	DAP10		(Imai und Campana 2005)
CD19	CD28.CD3 $\zeta$		(Loskog et al. 2006)
CD19	CD137.CD3 $\zeta$		
CD19	CD244.CD3 $\zeta$		
CD30	CD3 $\zeta$	Hodgkin-Lymphom	(Hombach et al. 1998)
ErbB2 (HER2/neu)	CD3 $\zeta$ / Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	Mammakarzinom, Urogenital- und Gastrokarzinome	(Stancovski et al. 1993)
ErbB2 (HER2/neu)	CD28.CD3 $\zeta$		(Chmielewski et al. 2004)
TAG-72 (CA72-4)	CD28.CD3 $\zeta$	Pankreaskarzinom	(Hombach et al. 1997)
TAG-72 (CA72-4)	CD28.CD134.CD3 $\zeta$		
TAG-72 (CA72-4)	CD28.CD137.CD3 $\zeta$		
HMW-MAA	CD3 $\zeta$	Malignes Melanom	(Reinhold et al. 1999)

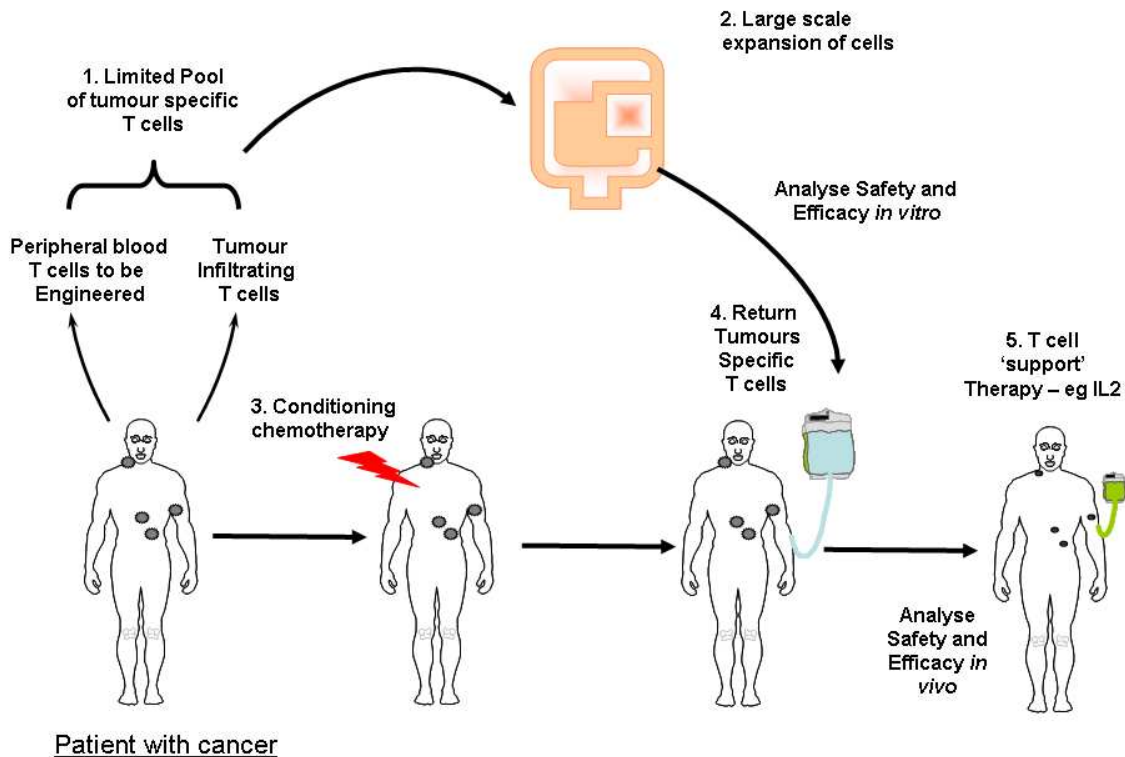
Tabelle 1: Spezifität ausgewählter CAR

## 1.4 Vorteile der adoptiven T-Zell-Therapie

Im Gegensatz zu den klassischen Tumortherapien kann die Zell-Spezifität bei einer adoptiven T-Zell-Therapie definiert werden. Das ist sowohl durch eine Selektion isolierter TIL durch Bindung an Tumorzellen des Patienten als auch durch die genetische Modifikation von T-Zellen zur Expression rekombinanter TCR oder CAR zu erreichen. Es ist das Ziel, durch definiert spezifische T-Zellen die systemische Toxizität der therapeutischen Behandlung zu verringern. Dabei verhindert die Verwendung autologer T-Zellen eine GvHD durch alloreaktive T-Zellen, wie sie nach allogener Stammzelltransplantation häufig auftritt. Die zytotoxischen Lymphozyten sind im Gegensatz zu molekularen Therapeutika in



der Lage, Gewebe aktiv zu penetrieren (von Andrian und Mackay 2000). Deshalb wird erwartet, dass zelluläre Therapeutika insbesondere bei soliden Tumoren eine verbesserte Wirksamkeit erreichen. Durch die Fähigkeit von T-Zellen zur Zielsuche („Homing“) wird die systemische Toxizität verringert und die anti-Tumor Antwort durch lokale Akkumulation erhöht (Mora und von Andrian 2006). T-Zellen, die rekombinante TCR exprimieren, können durch die Kreuzaktivierung eine unzureichende Präsentation von Tumor-assoziierten-Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) kompensieren. Die dadurch fehlende Aktivierung, Proliferation und Persistenz von T-Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors sowie das Ausbleiben pro-inflammatorischer Mechanismen (Speiser et al. 1997) kann in einer Therapie mit TCR-modifizierten T-Zellen umgangen werden. Während bei der zielgerichteten molekularen Therapie eine definierte inhibitorische oder toxische Wirkung erzielt wird, vermitteln TAA-spezifische T-Zellen ein breites Spektrum an Effektorfunktionen. Neben der Antigen-spezifischen Zytolyse durch Granzym/Perforin und TRAIL/FasL sezernieren die aktivierten T-Zellen pro-inflammatorische Zytokine. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 aktivieren lokal weitere Zellen des Immunsystems. So gelangen Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und weitere Lymphozyten in das Tumorgewebe und erhöhen die Wirksamkeit der Immunantwort (Schroder et al. 2004; Hehlhans und Pfeffer 2005; Smith 1988). Zudem bewirkt die Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen deren Proliferation und damit eine Amplifikation der anti-Tumor Antwort (Beecham et al. 2000; Haynes et al. 2002; Redmond et al. 2009). Dieses Spektrum der Effektorfunktionen kann durch den modularen Aufbau eines CAR mit zusätzlichen Signaldomänen verstärkt werden, insbesondere die Proliferation, die Aktivierung des Immunsystems und die Persistenz der T-Zellen. Einen weiteren Vorteil stellt die vergleichsweise lange Lebenszeit von T-Zellen dar. Während molekulare Therapeutika eine Halbwertszeit von mehreren Tagen bis wenigen Stunden aufweisen (LoBuglio et al. 1989), können T-Zellen 100 Tage und länger *in vivo* persistieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit der Differenzierung zu Gedächtniszellen, nimmt man an, dass die Spezifität gegen das Tumorantigen über Jahre aufrechterhalten wird (Blaese et al. 1995; Mitsuyasu et al. 2000).



**Abbildung 3: Überblick über das Konzept der zellulären adoptiven Immuntherapie**

(Aus Hawkins et al. 2010)

T-Zellen können mit rekombinanten Immunrezeptoren definierter Affinität ausgestattet werden. Im Gegensatz zu natürlich vorkommenden TCR mit einer Affinität von  $K_D = 100 \mu\text{M}$  bis  $0,1 \mu\text{M}$  können rekombinante TCR mit einer Affinität von bis zu  $K_D = 10^{-8} \text{ M}$  generiert werden (Foote und Eisen 2000). Die Affinität kann durch Verwendung der Antikörper-basierenden CAR auf bis zu  $K_D = 10^{-11} \text{ M}$  erhöht werden. Dadurch wird die Therapie insbesondere bei niedrig exprimierten TAA deutlich effizienter und wirkt einem Entkommen von Tumorzellen mit geringer Expression des Tumorantigens entgegen. Chimäre Antigen-Rezeptoren aktivieren T-Zellen unabhängig von der MHC-Antigenpräsentation. Daher können Tumorzellen, die eine Dysregulation der Funktion einzelner Komponenten des MHC-Klasse I Komplexes sowie weiterer an der Prozessierung und dem Transport von Peptiden beteiligten Proteine entwickeln, einer Erkennung durch CAR-exprimierende T-Zellen nicht entgehen. Darüber hinaus kann bei chimären Antigen-Reptoren durch die Fusion kostimulatorischer Signaldomänen eine fehlende Kostimulation aufrechterhalten werden, wenn Tumorzellen die Expression kostimulatorischer

Liganden verlieren. Somit wird eine mögliche Anergie modifizierter T-Zellen unterbunden und eine Modifikation der Effektorfunktionen durch Kostimulation erreicht. Wie in (Dudley et al. 2008) beschrieben, eignen sich zelluläre Therapien zur Kombination mit klassischen Chemo- oder Strahlentherapien, da sie aufgrund der geringen systemischen Toxizität nur eine geringe zusätzliche Belastung des Patienten darstellen. Ein Überblick über das Konzept der adoptiven zellulären Immuntherapie vermittelt Abbildung 3.

## 1.5 Nachteile der adoptiven T-Zell-Therapie

Obwohl die adoptive zelluläre Immuntherapie den klassischen und zielgerichteten molekularen Therapien in vielerlei Hinsicht überlegen ist, haben sich bei der präklinischen Evaluation in Tiermodellen und bei klinischen Studien deutliche Risiken gezeigt. Durch die Verwendung autologer TIL mit selektionierter Spezifität wurde einerseits ein wirksames Therapeutikum erschlossen, jedoch ist die Isolation der TIL aufwendig, TIL sind sehr selten, da sie solide Tumore nur in geringer Zahl infiltrieren, und befinden sich in einem anergen Stadium. Daher lassen sich TIL nur schwer aktivieren und zu einer therapeutisch wirksamen Zellzahl expandieren. Einige weitere Probleme ergeben sich aus der Konstruktion der rekombinanten Immunrezeptoren. Da rekombinante TCR in Untereinheiten exprimiert werden und dabei Heterodimere mit den Untereinheiten des endogenen TCR bilden können, entstehen neben den gewünschten Paarungen solche mit unbekannter Spezifität. Wurden bisher in klinischen Studien keine Nebenwirkungen aufgrund solcher Fehlpaarungen entdeckt (Johnson et al. 2009; Morgan et al. 2006), so beobachtete man jedoch in Tierversuchen einige Fälle letaler off-target Toxizität, die durch eine Fehlpaarung der endogenen und rekombinanten TCR-Untereinheiten verursacht wurden (Bendle et al. 2010). Außerdem wird durch die Fehlpaarung von endogenem und rekombinanten TCR-Untereinheiten die Expressionsdichte der TAA-spezifischen TCR und damit die Avidität der T-Zellen herab gesetzt. Im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor besteht der CAR aus monomeren Untereinheiten, die bei Bildung der Immunsynapse in den TCR-Komplex integriert werden. Daran ist die CD3 $\zeta$ -Transmembrandomäne beteiligt,

die den CAR durch Dimerisierungsstellen mit dem TCR-Komplex stabilisiert und dadurch eine effizientere Antigen-spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten erreicht wird (Bridgeman et al. 2010). Es wurde jedoch ausgeschlossen, dass die Bindung des TCR an den entsprechenden MHC/Peptid-Komplex zur CAR-vermittelten Aktivierung führt.

Die Immunogenität des rekombinanten Moleküls CAR wird unter anderem durch die Bindedomäne bestimmt, die von einem monoklonalen Antikörper nicht humaner Herkunft stammt. Daher können Patienten im Verlauf einer CAR-basierenden T-Zell-Therapie idiotypische Antikörper gegen die Bindedomäne entwickeln. Es kommt zur Eliminierung CAR-exprimierender T-Zellen durch das Immunsystem und einer geringen Therapieeffizienz. Zur Vermeidung einer Immunerkennung CAR-modifizierter T-Zellen muss deshalb die Bindedomäne humanisiert werden. Bei einer zellulären Behandlung muss wie bei den zielgerichteten Therapien die individuelle Eignung für jeden Patienten festgestellt werden. Für die Therapie mit genetisch modifizierten T-Zellen muss in aufwendigen Studien festgestellt werden, welches Tumorantigen beim jeweiligen Patienten als Zielantigen geeignet ist, um zu verifizieren, dass es auf den Tumorzellen homogen exprimiert wird. Bei der Auswahl heterogen exprimierter Antigene können Tumorzellen, die einen Verlust des Antigens entwickelt haben, der Erkennung durch modifizierte T-Zellen entgehen. Aufgrund der Tatsache, dass viele Tumorantigene Autoantigene sind, d.h. auf gesunden Zellen exprimiert werden, ergeben sich weitere Risiken einer CAR-basierenden Therapie. Der Schwellenwert zur Aktivierung CAR-modifizierter T-Zellen ist sowohl von der Dichte des spezifischen Antigens als auch von der Affinität der verwendeten Bindedomäne abhängig. T-Zellen mit einem hochaffinen CAR können somit gesunde Zellen mit geringer Antigendichte erkennen und diesen gegenüber Zytotoxizität vermitteln. Diese off-target Toxizität hat in einigen klinischen Studien zu schwersten Nebenwirkungen geführt, weil das gewählte Zielantigen in niedriger Dichte von gesundem Gewebe exprimiert wurde. Die off-target Toxizität führte zu Schädigungen durch Lebertoxizität (Lamers et al. 2004) bis hin zu Zytokinstürmen mit Todesfolge (Morgan et al. 2010; Brentjens et al. 2010). Aufgrund dieser Vorfälle ist es bei adoptiven zellulären Therapien erforderlich, Antigenexpressionsprofile zu erstellen.

Gleichzeitig muss sorgfältig abgewägt werden, welche Affinität die verwendeten CAR aufweisen. Sehr hohe Affinitäten erhöhen das Risiko einer off-target Toxizität und können durch sehr stark exprimierte Tumorantigene und eine hohe Tumorlast verstärkt zu AICD (activation induced cell death) der T-Zellen führen. Dagegen vermitteln geringe Affinitäten durch geringere Kreuzvernetzung eine weniger starke Aktivierung. Zudem erhöht sich das Risiko eines Rückfalls durch eine Antigen-modulierenden Immunselektion. Tumorzellen mit einer niedrigen Expression oder dem Verlust des Antigens erfahren einen Selektionsvorteil, da sie der Erkennung durch CAR-modifizierte T-Zellen entkommen. Des Weiteren hat sich *in vitro* gezeigt, dass stark glykosylierte Tumorantigene wie Carbo-Anhydrate oder Antigen mit geringer Mobilität, wie z.B. das auf Melanomen exprimierter Protein HMW-MAA (high molecular weight melanoma associated antigen) eine geringere Bindung aufweisen, als wenig modifizierte und mobile Polypeptidantigene wie z.B. ErbB2. Die Auswahl eines Carbohydrat-Antigens als Zielantigen für eine zelluläre Therapie kann somit zu einer geringeren Effizienz der Behandlung führen. Während bei TCR-modifizierten T-Zellen die häufig auftretende Dysregulation der MHC-Antigenpräsentation zum Tumor escape führt, können CAR-modifizierte T-Zellen bei unzureichender Antigenexpression möglicherweise nicht ausreichend aktiviert werden. Da sie ausschließlich MHC-unabhängig stimuliert werden, können sie keine Antigen-Kreuzpräsentation durch Stromazellen und Antigenpräsentation durch eingewanderte Antigen-präsentierende Zellen erfahren. Durch eine geringe Expression der Rezeptoren CD95 oder DR4/DR5 und die dadurch verminderte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber FasL- oder TRAIL-vermittelter Apoptose kann es zu einer Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber zytotoxischen T-Zellen kommen (Kershaw et al. 2005). Weitere Nachteile der zellulären Therapie ergeben sich aus der Differenzierung der verwendeten T-Zellen. Nach der Entnahme autologer T-Zellen müssen diese stark expandiert werden, um ausreichend hohe Zellzahlen für eine wirksame Behandlung zu gewinnen. Durch diese Prozedur werden die T-Zellen soweit differenziert, dass sie einerseits über hohe zytotoxische Eigenschaften verfügen. Andererseits können diese T-Zellen nur schwach proliferieren, verfügen über eingeschränkte

Homing-Fähigkeiten in die umliegenden sekundären Lymphorgane, supprimieren die Expression kostimulatorischer Rezeptoren und persistieren aufgrund fortgeschrittener Alterung nicht lange. Durch den Einsatz solcher terminal differenzierter T-Zellen wird die Wirksamkeit einer Therapie im Hinblick auf einen Langzeiteffekt stark verringert.

Die häufigste Ursache der eingeschränkten Wirksamkeit einer zellulären Immuntherapie ist der immunsuppressive Einfluss des Tumormilieus. In diesem Mikromilieu sezernieren Stromazellen immunsuppressiv wirkende Faktoren wie TGF- $\beta$ , IL-10, VEGF sowie reaktive Sauerstoffspezies und bewirken eine Tumor-induzierte Immunsuppression (Gorelik et al. 2002; Petersson et al. 1998). Durch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) wird am Tumor eine Suppression Tumor-spezifischer T-Lymphozyten erreicht (Nomura und Sakaguchi 2005). Der immunsuppressive Einfluss des Tumormilieus treibt die zytotoxischen T-Zellen in Anergie und Apoptose, so dass deren Akkumulation am Tumor nicht zur Eliminierung des Tumors führt.

Adoptive T-Zell-Therapien sind individualisierte Therapien. Daher müssen anhand des individuellen genetischen Hintergrunds eines Patienten Behandlungsstrategien entwickelt werden, welche sowohl die Therapieansprache optimieren als auch das Nebenwirkungsprofil minimieren. Aus diesem Grund erfordern zelluläre Therapien einen höheren Aufwand als die klassischen oder zielgerichteten molekularen Therapien.

## 1.6 Optimierung der CAR-vermittelten Immuntherapie

In zahlreichen präklinischen Modellen wurde die CAR-vermittelte Immuntherapie evaluiert und in klinischen Studien bestätigt (Emtage et al. 2008; Park et al. 2007). Die Therapieform wird derzeit hinsichtlich einer Vermeidung von off-target Toxizität, einer gezielten Kontrolle CAR-modifizierter T-Zellen in Patienten und einer verbesserten Wirksamkeit der Therapie optimiert.

Aufgrund der in klinischen Studien aufgetretenen schweren Nebenwirkungen sind Optimierungen besonders im Hinblick auf die Vermeidung von off-target Toxizität erforderlich. Dazu zählt die sorgfältige Erstellung von

Antigenexpressionsprofilen gesunder Zellen. Damit sollen geeignete Zielantigene identifiziert werden, die eine hohe homogene Expression im Tumor aufweisen aber in gesundem Gewebe nicht exprimiert werden. Weitere Maßnahmen sind die Abstimmung der Antigen-spezifischen Aktivierungsschwellen durch Auswahl des Epitops des TAA und/oder der Affinität der Einzelkettenbindedomäne auf das spezifische Zielantigen (Hombach et al. 2007; Chmielewski et al. 2004). Durch die Möglichkeit einer transienten CAR-Expression mittels eines mRNA-Elektrotransfers kann eine mögliche Autoreaktivität zeitlich limitiert werden (Birkholz et al. 2009). Eine Erhöhung der Tumorspezifität könnte durch den Einsatz von T-Zellen mit koexprimierten CAR unterschiedlicher Spezifität gewährleistet werden, wodurch Antigenmuster als Zielstruktur erschlossen werden (Alvarez-Vallina und Hawkins 1996). Mit dieser Strategie könnte darüber hinaus eine Minimierung der Therapieresistenz erreicht werden, wenn Tumorzellen die Expression des Zielantigens verlieren.

Weitere Entwicklungen befassen sich mit einer gezielten Eliminierung CAR-modifizierter T-Zellen. Induzierbare „Selbstmord-Gene“ können in CAR-exprimierende T-Zellen eingebracht werden und im Fall von off-target Toxizität durch Applikation von Prodrugs zu einer Eliminierung dieser Zellen genutzt werden (de Witte et al. 2008). Eine Alternative dazu stellt die Komplement-vermittelte Depletion CAR-exprimierender T-Zellen dar. Dabei werden Epitop-tags in den chimären Antigen-Rezeptor eingebracht. Mit der Applikation von lysierenden Antikörpern, die an das Epitop-tag binden, soll das Komplementsystem des Patienten aktiviert und die Eliminierung der CAR-exprimierenden T-Zellen gewährleistet werden (Kieback et al. 2008).

Es wird eine Vielzahl von Strategien entwickelt, durch die eine verbesserte Effizienz der Behandlungen erreicht werden soll. Mit Hilfe von Weiterentwicklungen der Protokolle zur *ex vivo* Expansion soll einerseits eine Erhöhung verfügbarer Mengen adoptiver T-Zellen generiert werden (Lamers et al. 2008). Dabei ermöglicht die Expansion von T-Zellen in Zellkulturbeuteln eine hohe Ausgangszellzahl und reduziert außerdem die notwendigen Verdopplungen, um eine für die Therapie erforderliche Menge bereitzustellen. Mit einer optimalen *ex vivo* Aktivierung kann andererseits die Persistenz

transferierter adoptiver T-Zellen verlängert werden, indem Zellen mit frühen Differenzierungsstadien injiziert werden (Gattinoni et al. 2005; Klebanoff et al. 2005). Durch die Expansion in Anwesenheit von Interleukin 15 wurden zentrale T-Gedächtniszellen ( $T_{(CM)}$ ) generiert, die eine verbesserte Migration zu lymphoiden Geweben und Extravasation aus peripheren Blutgefäßen aufweisen. Die Koexpression anti-apoptotischer Proteine in transferierten modifizierten T-Zellen kann zur Desensibilisierung bezüglich des AICD oder immunsuppressiver Einflüsse des Tumormilieus und damit zur verbesserten Persistenz beitragen (Eaton et al. 2002). Weitere Signaldomänen kostimulatorischer Rezeptoren, wie CD134 oder CD137 können in CAR fusioniert werden, um eine Erhöhung der Resistenz gegen AICD und eine verbesserte Proliferation und Ausbildung von Gedächtniszellen bewirken zu können (Pulè et al. 2005; Wang et al. 2007).

Die Tumor-vermittelte Immunsuppression kann durch Präkonditionierungstherapien minimiert werden. Eine nicht-myeloablative Therapie mit den zytostatischen Chemotherapeutika Fludarabin und Zyklophosphamid in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung deletiert die Lymphozyten des Patienten einschließlich der immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen. Durch die Lymphodepletion werden außerdem Zellen eliminiert, die Zytokine wie IL-7 und IL-15 konsumieren, das zu einer verbesserten homöostatischen Aktivierung der adoptiven T-Zellen führt (Gattinoni, Finkelstein, et al. 2005). Zudem zeigen Stromazellen durch diese Behandlung eine erhöhte Antigenpräsentation durch die Erhöhung nekrotischer Tumorzellen. In Kombination mit hoch dosierter myeloablativer Ganzkörperbestrahlung kann eine weitere Verbesserung der therapeutischen Effizienz erreicht werden (Dudley et al. 2008).



## 1.7 Zielsetzung

Die Expression eines chimären Antigen-Rezeptors (CAR) verleiht T-Zellen eine MHC-unabhängige Spezifität. Jedoch muss das bisherige Konzept der zellulären Therapie mit CAR-modifizierten T-Zellen sowohl im Hinblick auf die Effizienz als auch im Hinblick auf die Sicherheit der Behandlung dringend verbessert werden. T-Zellen mit der Expression eines CAR verfügen über eine nicht ausreichende Spezifität gegenüber Tumorzellen. In klinischen Studien hat sich gezeigt, dass das Targeting Tumor-assoziiertes Antigene mit der Erkennung gesunder Zellen mit geringer Expression und mit einer off-target Toxizität assoziiert ist. Zudem sind CAR-exprimierende T-Zellen gegenüber Tumorzellen mit Verlust des Zielantigens unwirksam. Die Erkennung von zwei Antigenen kann eine Erhöhung der Spezifität für Tumorzellen und damit eine Lösung des Problems darstellen.

In dieser Arbeit wird der Lösungsansatz der Expression eines zweiten CAR anderer Spezifität verfolgt, um Tumor-typische Antigenmuster zur selektiven Unterscheidung zwischen Tumorzellen und gesundem Gewebe zu nutzen. Außerdem soll durch die Expression eines zweiten CAR die Tumorspezifität im Fall eines Antigenverlustes aufrechterhalten bleiben. Aufgrund des modularen Aufbaus kann mit Hilfe der Koexpression von CAR eine Kombination unterschiedlicher Tumorantigene erkannt werden. Durch die Verwendung verschiedener Signaldomänen könnten zudem Effektorfunktionen kombiniert und bei Erkennung Tumor-typischer Antigenmuster komplementiert werden. Limitierungen in der Durchführung könnten sich dadurch ergeben, dass mit Einführung eines zweiten CAR Effektorfunktionen nicht vorhersehbar geändert werden. Die Erhöhung der Selektivität kann zudem eine Veränderung der Antigen-abhängigen Aktivierung der T-Zellen zur Folge haben.

Die experimentellen Untersuchungen befassen sich mit der Transduktion von T-Zellen zur Koexpression zweier verschieden spezifischer CAR. Mit Hilfe exprimierter Signaldomänen der Moleküle CD3 $\zeta$  und CD28 soll der Einfluss einer funktionellen Komplementation in der Antigen-vermittelten T-Zell-Aktivierung ermittelt werden. Dabei ist von besonderem Interesse, ob die T-

Zellen mit verschiedenen CAR zwischen Zellen mit unterschiedlicher Antigendichte differenzieren.

Durch dieses Konzept wird erwartet, dass Risiken durch die Erkennung gesunder Zellen gemindert werden. Eine effiziente T-Zell-Aktivierung soll die Eliminierung von Tumorzellen bei stark heterogener Antigenexpression gewährleisten. Die kurative Wirksamkeit einer Therapie könnte verbessert werden, da Tumorzellen durch den Verlust eines Zielantigens nicht mehr der Erkennung durch T-Zellen mit zwei CAR entgehen.

## 2. Material

### 2.1 Stammlösungen und Puffer

#### 10x PBS

1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, eingestellt mit HCl auf pH 7,2 bis 7,4

#### PBS/T

1x PBS, 0,1% (v/v) Tween®-20 (Merck, Darmstadt)

#### Tris-HCl

10 mM Tris, eingestellt mit HCl auf pH 8,4 bis 9

#### 10x TBS

0,5 M Tris, 1,5 mM NaCl, eingestellt mit HCl auf pH 7,4

#### TBS/T

1x TBS 0,1% (v/v) Tween®-20 (Merck, Darmstadt)

#### 50 x TAE-Puffer

2M Tris, 1M 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)

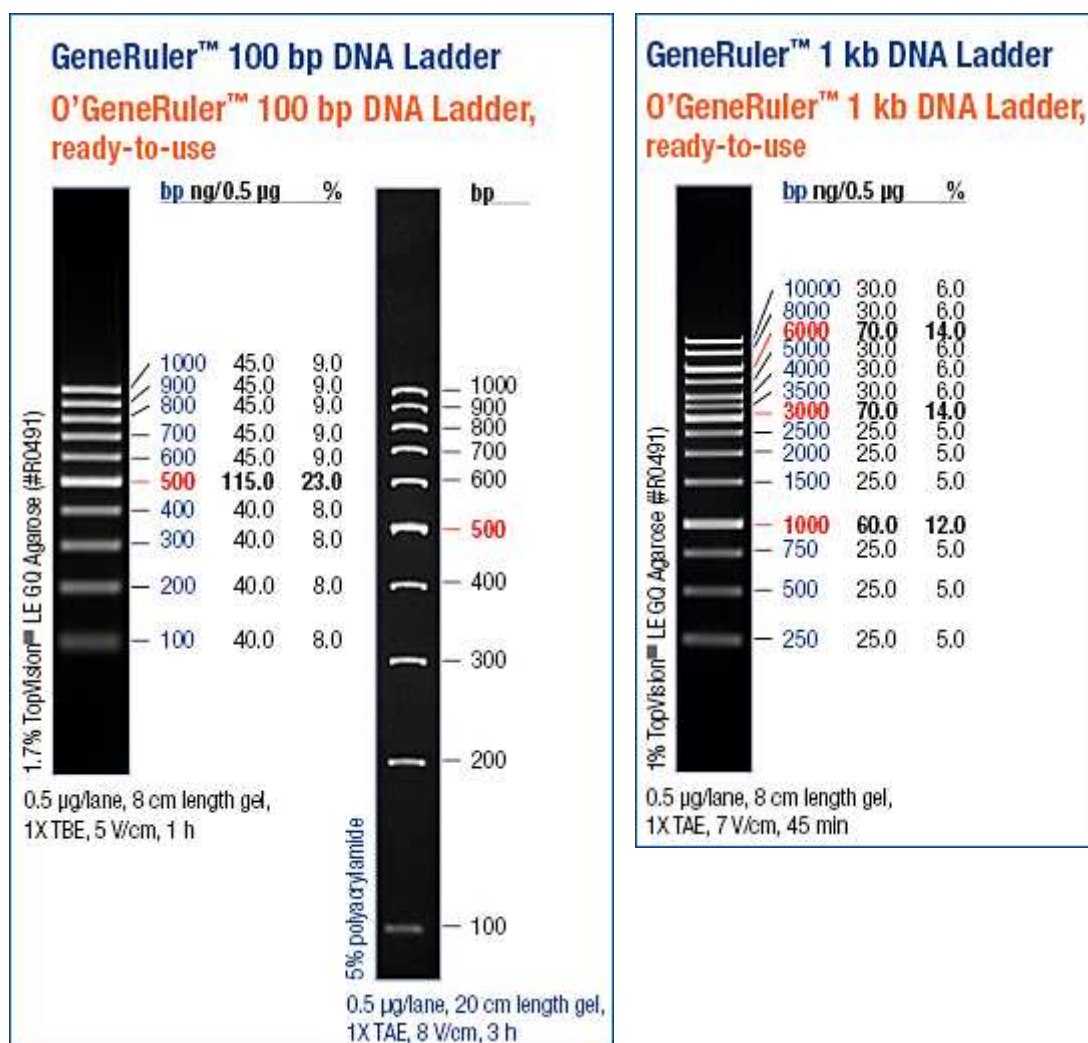
### Gel-Beladungspuffer

„6x DNA loading dye“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60 mM EDTA

### Größen- und Massenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

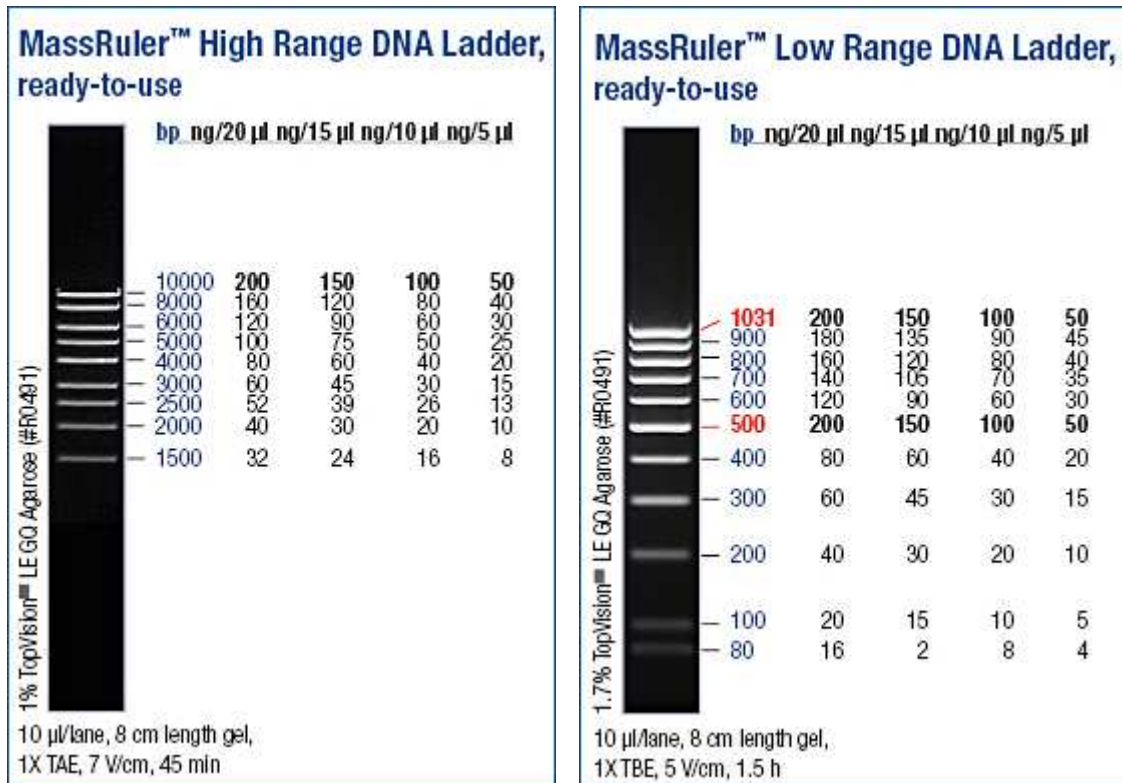
DNS-Größenstandard, „ready-to-use“, (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

- GeneRuler™ 100bp DNS Ladder, #SM0243
- GeneRuler™ 1kb DNS Ladder, #SM0313



DNS-Massenstandards, „ready-to-use“, (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

- MassRuler™ DNS Ladder, high range, #SM0393
- MassRuler™ DNS Ladder, low range, #SM0383



### 2.3 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze

Alle Nährmedien wurden vor dem Gebrauch 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) wurden steril filtriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### LB-Medium

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

#### LB-Agar

1l LB-Medium; 15 g Bacto-Agar

### Ampicillin

Stammlösung 100 mg/ml Ampicillin (Merck/Calbiochem, Darmstadt), 100 µg/ml (1:1000) zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme eingesetzt

### Kanamycin

Stammlösung 25 mg/ml Kanamycin (Merck/Calbiochem, Darmstadt), 50 µg/ml (1:500) zur Selektion Kanamycin-resistenter Bakterienstämme eingesetzt

### X-Gal

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

### IPTG

Stammlösung 0,1 M IPTG (Bio-Rad Laboratories, München) in ddH<sub>2</sub>O, eingesetzt für die Blau/Weiß-Selektion 50 µl pro 10cm LB-Agar-Kulturplatte

## **2.4 Bakterienstämme**

### E.coli DH5α

(Woodcock et al., 1989) F-, end A1, hsd R17 (rk-, mk-) sup E44, thi-1, lambda-, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15

## **2.5 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze**

### RPMI 1640 Medium

(Produkt Code 61870-010, GIBCO / Invitrogen GmbH, Darmstadt), Formulierung ohne HEPES Puffer, mit GlutaMAX™ und Phenolrot

D-MEM Medium

(Produkt Code 61965-026, GIBCO / Invitrogen GmbH, Darmstadt), „High Glucose“ Formulierung ohne HEPES Puffer, mit GlutaMAX™ und Phenolrot

Fetales Kälberserum (FCS)

(Biochrom KG, Berlin; PAA Laboratories GmbH, Cölbe; PAN Biotech, Aidenbach)

Penicillin-Streptomycin

100-fach Formulierung, 10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin (GIBCO / Invitrogen GmbH, Darmstadt)

Neomycin / G418

Stammlösung 100 mg/ml G418 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in ddH<sub>2</sub>O, 0,1 bis 2 mg/ml eingesetzt zur Selektion Neomycin-resistenter Zellen

Hygromycin

HygroGold™ Stammlösung 100 mg/ml (Invivogen, Toulouse, Frankreich), 50 bis 200 µg/ml eingesetzt zur Selektion Hygromycin-resistenter Zellen

Amphotericin B

Fungizone® 100-fach Stammlösung 250 mg/ml Amphotericin B (GIBCO / Invitrogen GmbH, Darmstadt)

Tiamulin

Stammlösung 10 mg/ml Tiamulin Fumarat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 1xPBS, 10 µg/ml (1:1000) eingesetzt zur Mykoplasmen-Prophylaxe

### Minocyclin

Stammlösung 5 mg/ml Minocyclin Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 1x PBS, 5 µg/ml (1:1000) eingesetzt zur Mykoplasmen-Prophylaxe

### Interleukin 2

Stammlösung  $1,8 \times 10^6$  IU/ml IL-2 aus Proleukin® (Chiron / Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) in ddH<sub>2</sub>O, 100 bis 1000 IU/ml eingesetzt zur Kultivierung von PBL

## **2.6 Zelllinien**

### HEK 293T

(Pear et al. 1993)

Derivat von HEK 293-Zellen, exprimieren das SV40 large T-Antigen (CRL-11268™; ATCC, Rockville, USA)

### HEK 293T - #978

(nicht publiziert)

Derivat von HEK 293T-Zellen, sezernieren das CEA-spezifische Fusionsprotein #978 SCA431scFv-Fc

### HEK 293T - #1192

(in dieser Arbeit generiert)

Derivat von HEK 293T-Zellen, sezernieren das Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP



MC38

(Lafreniere und Rosenberg 1986)

Methylcholanthrene induzierte Maus Kolon-Adenokarzinomzellen, zur Verfügung gestellt von Dr. M. Neumaier, Universität Heidelberg

MC38.B2

(in dieser Arbeit generiert)

Derivat von MC38 Zellen, exprimieren humanes ErbB2

MC38.B2.III.C1 und MC38.B2.IV.H12

(in dieser Arbeit generiert)

Derivate von MC38.B2 Zellen, exprimieren humanes ErbB2

C15A3

(Robbins et al. 1991)

Derivat von MC38, exprimieren humanes CEA, zur Verfügung gestellt von Dr. M. Neumaier, Universität Heidelberg

C15A3.C2R

(in dieser Arbeit generiert)

Derivat von C15A3 Zellen, exprimieren humanes ErbB2

C15A3.C2R.E1, C15A3.C2R.C1 und C15A3.C2R.A7

(in dieser Arbeit generiert)

Derivat von C15A3.C2R Zellen, exprimieren humanes ErbB2

H498

(Park et al. 1987)

Humane kolorektale Adenokarzinomzellen (CCL-254™; ATCC, Rockville, USA), sekretiert u.a. CA19-9

OKT3

(Kung et al. 1982)

Maus Hybridomzellen (CRL-8001™; ATCC, Rockville, USA), sezernieren den human-CD3-spezifischen Antikörper OKT3

15E8

(Van Lier, Brouwer und Aarden 1988)

Maus Hybridomzellen, sezernieren den human-CD28-spezifischen Antikörper 15E8, zur Verfügung gestellt von Dr. Van Lier, NCB Amsterdam, Niederlande

NS19-9

(Koprowski et al. 1979)

Maus Hybridomzellen (HB-8059™; ATCC, Rockville, USA) sezernieren den human-CA19-9-spezifischen Antikörper 1116-NS19-9

BW2064/36

(Kaulen et al. 1993)

Maus Hybridomzellen, sezernieren den anti-BW431/26 Idiotyp-Antikörper BW2064/36, zur Verfügung gestellt von Dr. K Bosslet, Behring-Werke, Marburg

BW2064/399

(Kaulen et al. 1993)

Maus Hybridomzellen, sezernieren den anti-BW431/26 Idiotyp-Antikörper BW2064/399, zur Verfügung gestellt von Dr. K Bosslet, Behring-Werke, Marburg

## 2.7 Primäre Zellen

### Humane periphere Blutlymphozyten (PBL)

Lymphozyten wurden mittels Dichtezentrifugation aus sogenannten „buffy coats“ (Leukozytenkonzentraten) isoliert und stammen von gesunden, zufällig ausgesuchten Spendern der Blutbank der Universität zu Köln oder Düsseldorf

## 2.8 Antikörper und Proteine

### 2.8.1 Primärantikörper, nicht konjugiert

#### Goat anti-human IgG<sub>1</sub>-UNLB

Polyklonaler human-IgG<sub>1</sub>-spezifischer Ziegenantikörper (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA)

#### Mouse IgG<sub>1</sub> isotype control

Monoklonaler IgG<sub>1</sub> Mausantikörper (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA), Klon-Nr.: 15H6

#### OKT3

Monoklonaler human-CD3-spezifischer Mausantikörper (Hybridomzellen), IgG<sub>2a</sub> Isotyp

#### 15E8

Monoklonaler human-CD28-spezifischer Mausantikörper (Hybridomzellen), IgG<sub>1</sub> Isotyp

BW2064/36

Monoklonaler BW431/26scFv-spezifischer Idiotyp-Mausantikörper  
(Hybridomzellen), IgG<sub>1</sub> Isotyp

BW2064/399

Monoklonaler BW431/26scFv-spezifischer Idiotyp-Mausantikörper  
(Hybridomzellen), IgG<sub>1</sub> Isotyp

NS19-9

Monoklonaler human-CA19-9-spezifischer Mausantikörper (Hybridomzellen),  
IgG<sub>1</sub> Isotyp

Mouse anti-human Interferon- $\gamma$

Monoklonaler human-IFN- $\gamma$ -spezifischer Mausantikörper (BD PharMingen,  
Hamburg), Klon-Nr.: NIB42, IgG<sub>1</sub> Isotyp

Mouse anti-human Interleukin-2

Monoklonaler human-IL-2-spezifischer Mausantikörper (BD PharMingen,  
Hamburg), Klon-Nr.: 5344.111, IgG<sub>1</sub> Isotyp

Anti-c-ErbB2/c-Neu (Ab-5) Mouse mAb (TA-1)

Monoklonaler human-ErbB2-spezifischer Mausantikörper (Merck Calbiochem,  
Darmstadt), Klon-Nr.: TA-1, IgG<sub>1</sub> Isotyp

## 2.8.2 Primärantikörper, konjugiert

Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG ( $\gamma$  chain specific), PE-labeled

Polyklonaler PE-gekoppelter human-IgG<sub>1</sub>-spezifischer Mausantikörper  
(Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA), Maus-Ig absorbiert

Biotin Mouse Anti-Human IL-2

Monoklonaler Biotin-gekoppelter human-IL-2-spezifischer Mausantikörper (BD PharMingen, Hamburg), Klon-Nr.: B33.2, IgG<sub>1</sub> Isotyp

Anti-Human Interferon-γ monoclonal antibody, biotin-labeled

Monoklonaler Biotin-gekoppelter human-IFN-γ-spezifischer Mausantikörper (Thermo Pierce Endogen, Rockfort, IL, USA), Klon-Nr.: B133.5, IgG<sub>1</sub> Isotyp

GFP antibody (Biotin)

Polyklonaler Biotin-gekoppelter GFP-spezifischer Ziegenantikörper (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)

APC Mouse Anti-Human CD3

Monoklonaler APC-gekoppelter human-CD3-spezifischer Mausantikörper (BD PharMingen, Hamburg), Klon-Nr.: HIT3a, IgG<sub>2a</sub> Isotyp

Monoclonal Mouse Anti-Human CD3/FITC

Monoklonaler FITC-gekoppelter human-CD3-spezifischer Mausantikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark), Klon-Nr.: UCHT1, IgG<sub>1</sub> Isotyp

PE Anti-human CD340 (erbB2/HER-2) Antibody

Monoklonaler PE-gekoppelter human-ErbB2-spezifischer Mausantikörper (Biolegend, San Diego, CA, USA), Klon-Nr.: 24D2, IgG<sub>1</sub> Isotyp

Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP

Polyklonaler Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter human-IgG-spezifischer Kaninchenantikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark)

### 2.8.3 Sekundärantikörper, konjugiert

#### Goat Anti-Mouse IgG1 ( $\gamma$ 1 chain specific), PE-labeled

Polyklonaler PE-gekoppelter Maus-IgG<sub>1</sub>-spezifischer Ziegenantikörper (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham USA), human Ig absorbiert

### 2.8.4 Proteine und Fusionsproteine

#### rekombinantes humanes IFN- $\gamma$

Stammlösung 200 ng/ml Imukin® Interferon- $\gamma$  1b (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Schweiz)

#### Interleukin 2

Stammlösung  $1,8 \times 10^6$  IU/ml IL-2 aus Proleukin® (Chiron / Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) in ddH<sub>2</sub>O

#### CA19-9

Kulturüberstände von H498 Zellen

#### SCA431scFv-Fc (#978)

Kulturüberstände von HEK 293T - #978 Zellen, CEA-spezifisches Fusionsprotein, SCA431 ist ein murinisiertes Derivat der humanisierten Einzelkettenbindedomäne BW431/26, fusioniert mit human IgG<sub>1</sub>-Fc

#### ErbB2-eGFP (#1192)

Kulturüberstände von HEK 293T - #1192 Zellen, Fusionsprotein aus extrazellulärer humaner ErbB2 Domäne und eGFP, (Generierung s. Kap?)

### Recombinant Human ErbB2/HER2 Fc Chimera

Rekombinantes Fusionsprotein aus humanem ErbB2 und der humanen IgG<sub>1</sub>-Fc-Domäne, C-terminales 6xHis-Tag (R&D Systems GmbH, Wiesbaden)

### Mucin from bovine submaxillary glands

BSM Typ I-S, Stammlösung 10 mg/ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in PBS

### Streptavidin-POD conjugate

Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

### Albumin from bovine serum

BSA lyophilisiert, ≥ 96% Reinheit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

## **2.9 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer**

Die folgenden Restriktionsenzyme (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) wurden zu analytischen und präparativen Zwecken verwendet:

BamHI, BclI, BglII, EcoRI, HindIII, NcoI, NotI, PvuI, Scal, Sall, XbaI, XhoI

Die eingesetzten SuRE/Cut Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) lagen als 10fach Konzentrat vor und hatten folgende Zusammensetzung:

- Puffer A: 330 mM Tris-Acetat, 660 mM K-Acetat, 100 mM Mg-Acetat, 5 mM Dithiothreitol; pH 7.9
- Puffer B: 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, 10 mM 2-MercaptoEtOH; pH 8,0
- Puffer H: 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, 1 M Dithioerythritol; pH 7,5
- Puffer L: 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5

- Puffer M: 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl, 10 mM Dithioerythritol; pH 7,5

## 2.10 Oligonukleotide

(Eurofins MWG-Operon, Ebersberg)

### 2.10.1 Klonierungsprimer, CAR-P2A in pCR2.1

#### Not-noNcoI-Lk-S

Hybridisiert mit kappa-leader DNS (fett), fügt 5' NotI-Restriktionsschnittstelle ein  
[5'-ACGTAGCGGCCGC**CATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGC**-3']

#### Zeta-P2A-NcoI-AS

Hybridisiert mit dem 3'-Ende der DNS für die CD3ζ Signaldomäne (fett), fügt die DNS für das 2A Peptid des Picornavirus sowie eine 3' NcoI-Restriktionsschnittstelle ein

[5'-ACGTACCATGGGACCGGGGTTTTCTTCCACGTCTCCTGCTTGCTTT-  
AACAGAGAGAAGTTCGTGGCGCCGCTTCC**GCGAGGGGGCAGGGCC-**  
**TGCATGTGAAGGGC**-3']

### 2.10.2 Klonierungsprimer, ErbB2-eGFP

#### eGFP-NcoI-S (#595)

Hybridisiert mit dem 5'-Ende der DNS für eGFP (fett), fügt eine 5' NcoI-Restriktionsschnittstelle ein

[5'-CTGATCCC**ATGGTGAGCAAGGGCGAGG**-3']

#### eGFP-BclI-AS (#586)

Hybridisiert mit dem 3'-Ende der DNS für eGFP (fett), fügt eine 3' BclI-Restriktionsschnittstelle ein

[5'-GATCGGTGATC**ATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG**-3']



ErbB2-NotI-S (#583)

Hybridisiert mit dem 5'-Ende der DNS für humanes ErbB2 (fett), fügt eine 5' NotI-Restriktionsschnittstelle ein

[5'-ATCTAGCGGCCGC**ATGGAGCTGGCGGCCTTGT**-3']

ErbB2-NcoI-AS (#594)

Hybridisiert mit dem 3'-Ende der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2 (fett), fügt eine 5' NcoI-Restriktionsschnittstelle ein

[5'-GACCTACCATGG**CCGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGC**-3']

### 2.10.3 Sequenzierungsprimer, CAR-P2A in pCR2.1

SeqFc-AS (#76)

Sequenzierung der DNS für die Einzelkettenbindedomäne in CAR, hybridisiert mit dem komplementären DNS Strang für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne

[5'-CGGTCCCCCAGGAGTTCAGGTGC-2']

IgGSE5 (#78)

Sequenzierung der DNS für die Transmembran- und Signaldomänen in CAR, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne

[5'-TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA-3']

hIgG-Seq-5 (#127)

Sequenzierung der DNS für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne in CAR, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne

[5'-CAACTGGTACGTGGACGGCG-3']

hlgG-Seq-AS (#128)

Sequenzierung der DNS für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne in CAR, hybridisiert mit dem komplementären DNS Strang für die humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne  
[5'-CATTGCTCTCCCACTCCACGG-3']

M13(Forward)-20 (#186)

Sequenzierung der DNS für Insertionen im Plasmid pCR2.1, hybridisiert mit dem komplementären DNS Strang des Plasmids pCR2.1  
[5'-GTAAAACGACGGCCAG-3']

M13Reverse (#460)

Sequenzierung der DNS für Insertionen im Plasmid pCR2.1, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang des Plasmids pCR2.1  
[5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3']

#### 2.10.4 Sequenzierungsprimer, ErbB2-eGFP

eGFPseq-AS (#357)

Sequenzierung der DNS für eGFP, hybridisiert mit dem komplementären DNS Strang für das Plasmid pQCXIH  
[5'-TTTACGTCGCCGTCCAGCTCGA-3']

c-ErbB2-S (#457)

Sequenzierung der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für das Plasmid pQCXIH  
[5'-ATGGAGCTGGCGGCCT-3']

c-ErbB2-S2 (#458)

Sequenzierung der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für humanes ErbB2

[5'-GGACGAATTCTGCACAATGG-3']

c-ErbB2 5-AS (#476)

Sequenzierung der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2, hybridisiert mit dem komplementären DNS Strang für eGFP

[5'-CTCGGGACTGGCAGGGAG-3']

c-ErbB2-S3 (#602)

Sequenzierung der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für humanes ErbB2

[5'-GATAGACACCAACCGCTCTC-3']

c-ErbB2-S4 (#603)

Sequenzierung der DNS für den extrazellulären Teil des humanen ErbB2, hybridisiert mit dem kodierenden DNS Strang für humanes ErbB2

[5'-CAGCCTTGCCCCATCAACT-3']

## 2.11 Vektoren

Für die Expression der Immunrezeptoren #435, #537, #607, #637, #710, #714 und #961 wurden Expressionsvektoren verwendet, die sich vom retroviralen Expressionsvektor pBullet ableiten. Sie verfügen neben den regulatorischen Elementen (SV40 ori) und dem Resistenzgen ( $Amp^R$ ) über eine Expressionskassette, die unter der Kontrolle der CMV-Promotorsequenz steht. Der Vektor pBullet leitet sich vom pStitch-Vektor ab, dem zwei NcoI- und eine XhoI-Restriktionsstelle deletiert wurden (Weijtens et al., 1998).

Der Immunrezeptor #1156 wurde mit Hilfe des retroviralen Vektors pQCXIN (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) exprimiert. Dieser Vektor verfügt neben regulatorischen Elementen (SV40 ori) und dem Resistenzgen ( $Amp^R$ ) über eine bicistronische Expressionskassette, welche die Koexpression des Resistenzgens G418/Neo<sup>R</sup> über eines intraribosomale Eintrittsstelle (IRES) ermöglicht. Die Expressionskassette befindet sich unter der Kontrolle des CMV Typ-1 Enhancers und des MSV Promotors in einer Hybrid 5'-LTR. Zudem zählen Vektoren der pQCXI-Serie zu den sogenannten selbst-inaktivierenden Vektoren, da nach einer Transduktion während der reversen Transkription ein Austausch des 5'-LTR durch den inaktivierten 3'-LTR erfolgt. Dadurch wird eine Reduktion der sogenannten Promotorinterferenz und eine effizientere Expression erreicht.

Zur gleichzeitigen Expression von zwei Immunrezeptoren (#1262 und #1263) wurde der retrovirale Vektor pMP71-wPRE verwendet. Dieser Vektor verfügt neben regulatorischen Elementen (SV40 ori) und dem Resistenzgen ( $Amp^R$ ) über ein post-transkriptionales regulatorisches Element des Murmeltier Hepatitis Virus (wPRE), welches als 3'-Enhancer fungiert und damit die Expression der bicistronischen Kassette verstärkt. (Engels et al., 2003).

Das Fusionsprotein ErbB2-eGFP (#1192) wurde mit Hilfe des retroviralen Vektors pQCXIH (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) stabil exprimiert. Dieser Vektor der pQCXI-Serie unterscheidet sich vom Vektor pQCXIN (s. oben) lediglich durch die Expression einer IRES-verknüpften Hygromycin B Resistenz ( $HygroB^R$ ).

Die stabile Expression des humanen ErbB2 (#1066) in den Zellklonen der Linie MC38 wurde durch die Verwendung des Vektors pCMV5 erreicht. pCMV5 basiert auf dem Vektor pBR322 und verfügt neben regulatorischen Elementen (SV40 ori) und dem Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>) über einen CMV-Promotor, der die Expression der Genkassette reguliert.

Die Klonierung von Zwischenprodukten zur Generierung der bicistronischen Expressionskassette zweier CAR wurde mit Hilfe des Plasmids pCR®2.1 durchgeführt, welches Bestandteil des TA-Cloning®-Kits ist (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Dieser Vektor liegt in linearisierter Form vor und verfügt über 5' T-Überhänge, mit Hilfe derer man PCR-amplifizierte DNS ohne vorherige Erzeugung kohäsiver überlappender Enden mittels Restriktionsspaltung ligiert. Die dafür notwendigen 3'-A-Überhänge wurden durch die Verwendung geeigneter Polymerasen (z.B. Taq) generiert. Der Vektor verfügt über zwei Resistenz-Gene zur Selektion mit Ampicillin oder Kanamycin sowie eine Expressionskassette für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase (LacZ). Bei erfolgreicher Insertion eines PCR-Produktes, wurde das LacZ Gen unterbrochen und die Hydrolyse von X-Gal zu einem Indigofarbstoff konnte nicht mehr stattfinden, so dass Kolonien mit erfolgreicher Insertion von solchen mit re-ligierten Plasmiden durch die sogenannte Blau-Weiß-Selektion unterschieden werden konnten.

Die Generierung retroviraler Gen-Taxis zur Transduktion proliferierender Lymphozyten wurde mit Hilfe der Plasmide pHIT60 und pCOLT erreicht. Diese Vektoren kodieren für die viralen Proteine gag (Gruppen spezifische Antigene) und pol (Reverse Transkriptase Polymerase) des murinen Moloney Leukämie Virus (M-MuLV) sowie dem Hüllprotein env des Gibbon Affen Leukämie Virus (GALV). Zusammen mit den retroviralen Expressionsvektoren konnten so mittels Kotransfektion replikationsdefiziente Retroviren generiert werden, die in der Lage waren, Lymphozyten zu infizieren und die Expressionskassette für Immunrezeptoren oder Fusionsproteine in das Wirtsgenom zu integrieren (Weijtens et al., 1998).

### 2.11.1 Retrovirale pBullet Expressionsvektoren

#### pBullet-Lk-CC49scFv-Fc-CD3 $\zeta$ (#435)

(Hombach et al. 1997)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human TAG-72 (CA72-4) spezifischen Mausantikörpers CC49, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD3 $\zeta$  Transmembran- und Signaldomäne

#### pBullet-Lk-NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$ (#537)

(Heuser et al. 2003)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CA19-9/Muc1 spezifischen Mausantikörpers 1116-NS19-9, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD3 $\zeta$  Transmembran- und Signaldomäne

#### pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ (#607)

(Hombach et al. 2001)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3 $\zeta$  Signaldomäne

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

(Hombach et al. 2001)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne

#### pBullet-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ (#710)

(Chmielewski et al. 2004)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human ErbB2 spezifischen Mausantikörpers C6-B1D2, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD3 $\zeta$  Transmembran- und Signaldomäne

pBullet-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  (#714)

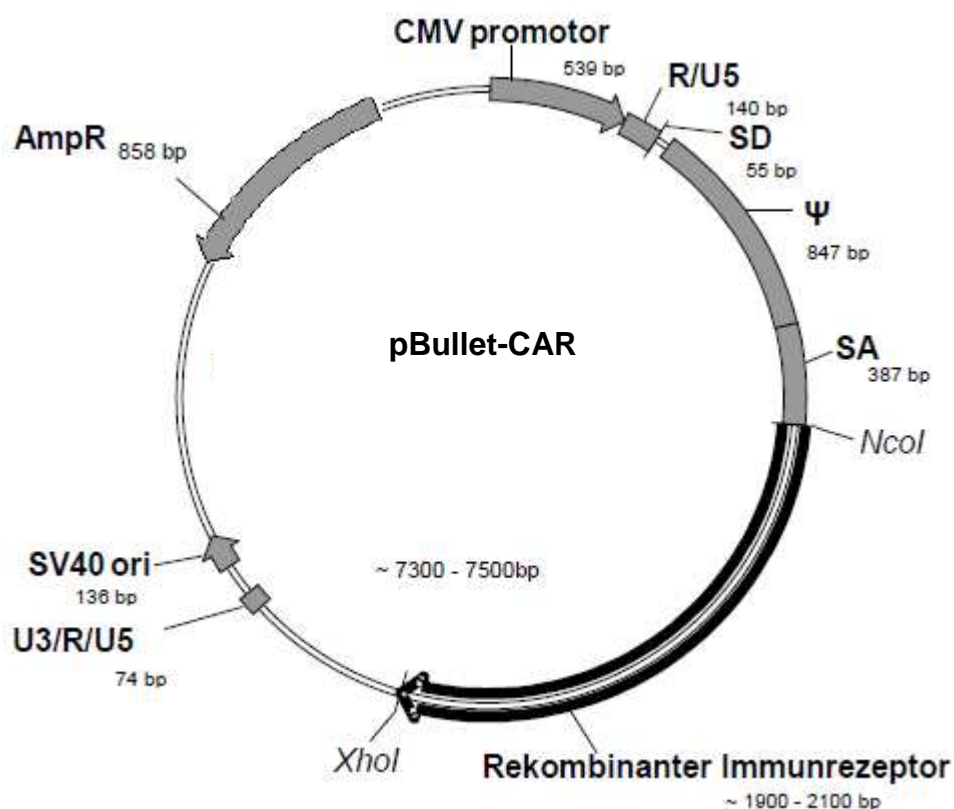
(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human ErbB2 spezifischen Mausantikörpers C6-B1D2, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3 $\zeta$  Signaldomäne

pBullet-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  (#961)

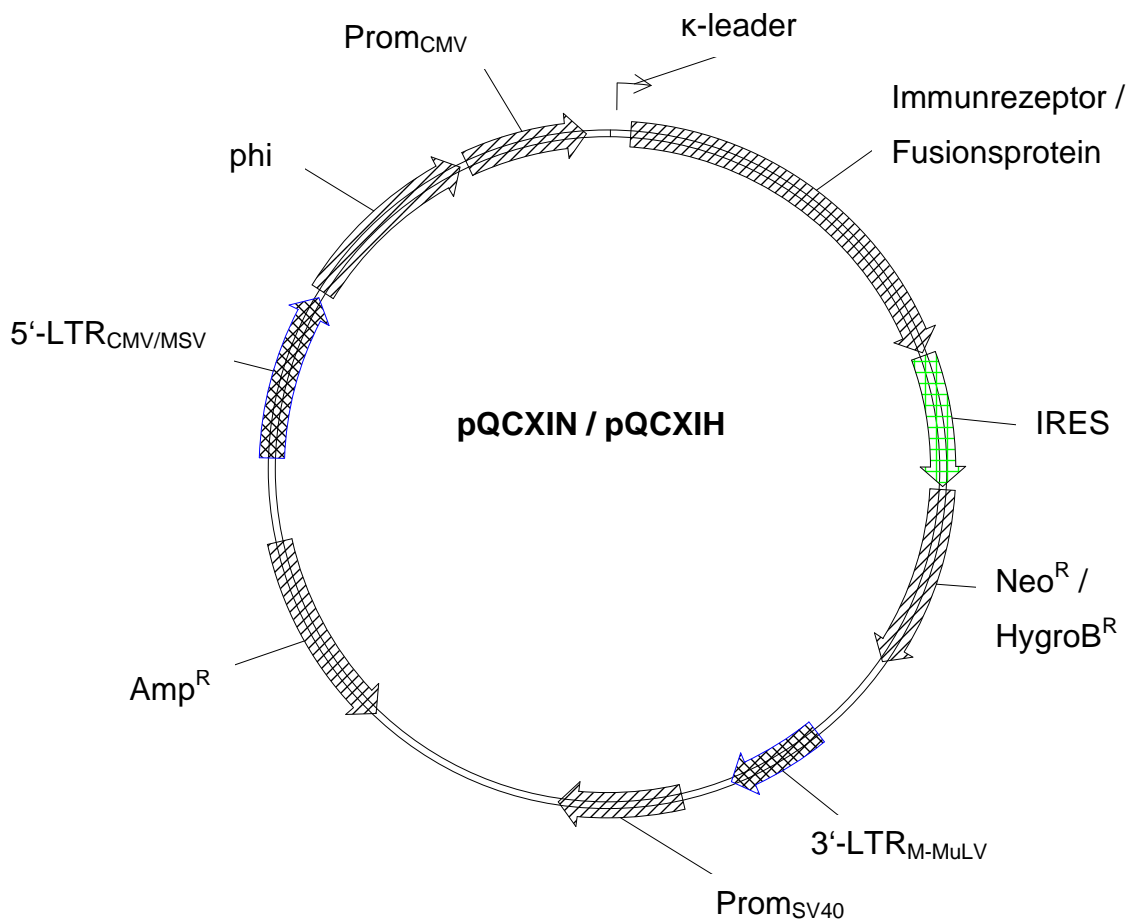
(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne, humaner CD28 Signaldomäne und N-terminaler CD3 $\zeta$  Signaldomäne

**Abbildung 4: Rekombinante Immunrezeptoren im Vektor pBullet**

In der Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors wurde die DNS für die rekombinanten Immunrezeptoren in die Multiple Klonierungsstelle MCS zwischen den Restriktionsschnittstellen NcoI und XhoI eingefügt. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 5406 bp.

## 2.11.2 Retrovirale pQCXIN/H Expressionsvektoren



**Abbildung 5: Retrovirale pQCXIN/H Vektoren**

In der Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors wurde die DNS für den rekombinanten Immunrezeptoren #1156 BW-431/26scFv-Fc-CD28 (pQCXIN) oder das rekombinante Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP (pQCXIH) eingefügt. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 7,4 kb (Neo) bzw. 7,8 kb (Hygro).

### pQCXIN-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1156)

(nicht publiziert)

CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne; entspricht pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#637)

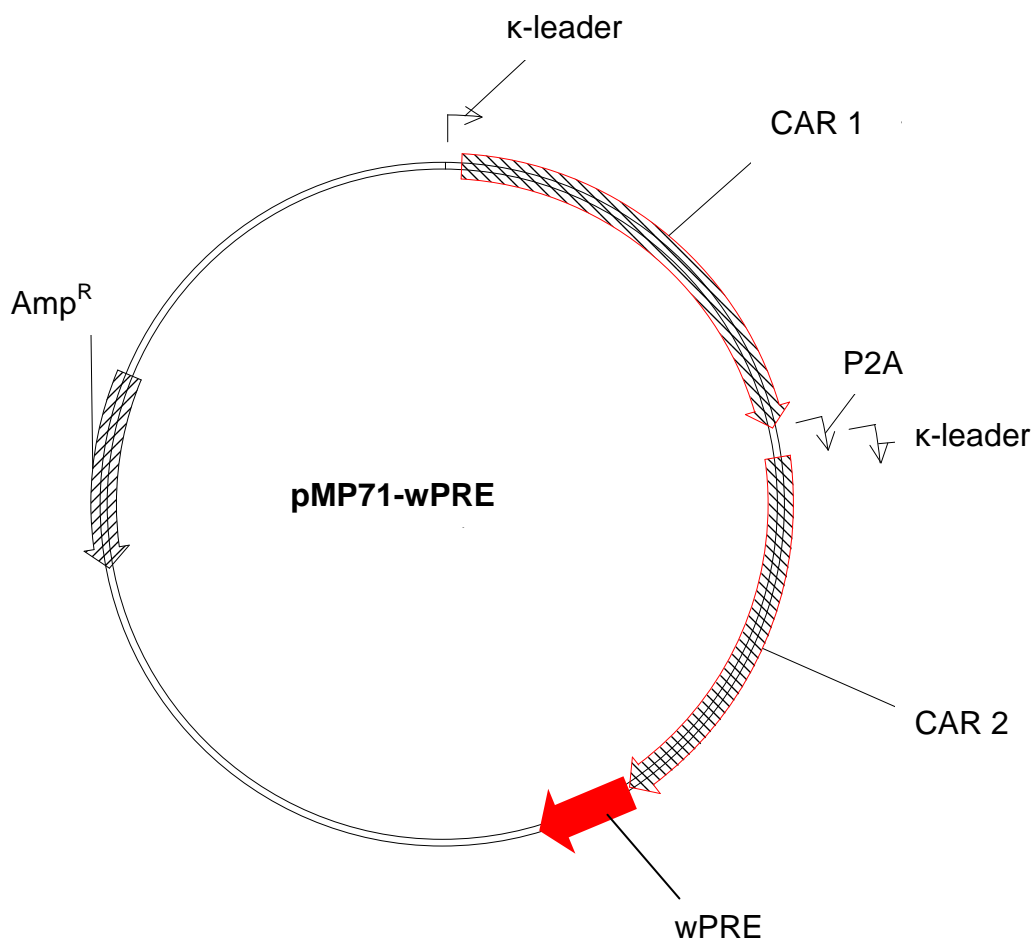


pQCXIH-leader-ErbB2<sub>(ec)</sub>-eGFP (#1192)

(in dieser Arbeit generiert)

Rekombinantes Fusionsprotein mit humaner extrazellulärer ErbB2 Domäne und enhanced-GFP

## 2.11.3 Retrovirale pMP71-wPRE Expressionsvektoren

**Abbildung 6: Retrovirale pMP71 Vektoren**

In der Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors wurde die DNS für den rekombinanten Immunrezeptoren #1156 BW-431/26scFv-Fc-CD28 (pQCXIN) oder das rekombinante Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP (pQCXIH) eingefügt. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 7,4 kb (Neo) bzw. 7,8 kb (Hygro).

pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262)

(in dieser Arbeit generiert)

Bicistronische Expressionskassette zweier mittels P2A verknüpfter CAR:

- CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human ErbB2 spezifischen Mausantikörpers C6-B1D2, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD3ζ Transmembran- und Signaldomäne; entspricht pBullet-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ (#710)
- CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne; entspricht pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#637)

pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#1263)

(in dieser Arbeit generiert)

Bicistronische Expressionskassette zweier mittels P2A verknüpfter CAR:

- CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human ErbB2 spezifischen Mausantikörpers C6-B1D2, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3ζ Signaldomäne; entspricht pBullet-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#714)
- CAR mit Einzelkettenbindedomäne des human CEA spezifischen Mausantikörpers BW431/26, humaner IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne sowie humaner CD28 Transmembran- und Signaldomäne und N-terminaler CD3ζ Signaldomäne; entspricht pBullet-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#607)

#### 2.11.4 Sonstige Expressionsvektoren

##### pCOLT-GALV (#392)

(Weijtens et al. 1998)

Retrovirales Helfer-Plasmid zur Expression des Hüllproteins env des Gibbon Affen Leukämie Virus (GALV)

##### pHIT 60 (#393)

(Weijtens et al. 1998)

Retrovirales Helfer-Plasmid zur Expression der murinen Moloney Leukämie Virus (M-MuLV) Proteine gag (Gruppen spezifische Antigene) und pol (Reverse Transkriptase Polymerase)

##### pCMV5-ErbB2 (#1066)

(nicht publiziert)

Expressionsplasmid für humanes ErbB2, zur Verfügung gestellt von Dr. Kosaku Mimura (Cancer Center Karolinska, Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden).

#### 2.11.5 pCR®2.1 Klonierungsvektoren

##### pCR®2.1

(Invitrogen GmbH, Darmstadt)

Linearisiertes Plasmid mit 5'-T-Überhängen, TA-Cloning® Kit

##### pCR®2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A (#1253)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262), enthält die DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ (#710) 3' verknüpft mit der DNS für P2A

pCR@2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A (#1254)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#1263), enthält die DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#714) 3' verknüpft mit der DNS für P2A

pCR@2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A<sub>(inv.)</sub> (#1258)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262), enthält die invertierte DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ (#710) 3' verknüpft mit der DNS für P2A

pCR@2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A<sub>(inv.)</sub> (#1259)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#1263), enthält die invertierte DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#714) 3' verknüpft mit der DNS für P2A

pCR@2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28<sub>(inv.)</sub> (#1260)

(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262), enthält die invertierte DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ (#710) und den CAR Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1156) verknüpft mit der DNS für P2A

pCR®2.1-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD-28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ<sub>(inv.)</sub> (#1261)

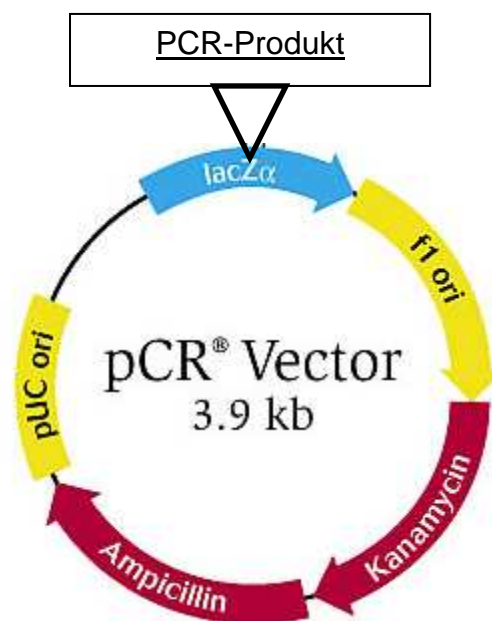
(in dieser Arbeit generiert)

Zwischenprodukt zur Klonierung von pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD-28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#1263), enthält die invertierte DNS für den CAR Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#714) und den CAR Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ (#607) verknüpft mit der DNS für P2A

pCR®2.1-CD3ζ<sup>TM</sup>-CD28-CD3ζ (#965)

(nicht publiziert)

Zur Inversion der Expressionskassetten der Plasmide #1258 / #1259 genutzter Vektor



**Abbildung 7: Klonierungsprodukte im Vektor pCR®2.1**

In der Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors wurde die DNS für den rekombinanten Immunrezeptoren #1156 BW-431/26scFv-Fc-CD28 (pQCXIN) oder das rekombinante Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP (pQCXIH) eingefügt. Der leere Vektor hat eine Gesamtlänge von 7,4 kb (Neo) bzw. 7,8 kb (Hygro).

## 3 Methoden

### 3.1 Präparation von Plasmid-DNS

#### 3.1.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule

(QIAFilter Midi Kit, QIAGEN GmbH, Hilden)

(NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi, GmbH & Co. KG, Düren)

Zur Präparation größerer Mengen DNS insbesondere für Transfektionen und Kotransfektionen wurden die oben beschriebenen Kits verwendet, die sowohl hohe Reinheiten und Ausbeuten als auch eine geringe Belastung mit bakteriellen Endotoxinen gewährleisten. Die Plasmid-Präparationen erfolgten nach Herstellerprotokoll. Das Volumen der Übernachtskulturen betrug zwischen 50 und 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin. Am Vorabend der Präparation wurde das Medium entweder mit Bakterien aus Glycerol stocks oder Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Durch die Präparation eluierte DNS wurde nach Zugabe von 70% Isopropanol (v/v des Eluats) mittels Zentrifugation 1h bei 4°C und 6800 g gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 4°C, 6800 g) und bei RT getrocknet. Die sedimentierte DNS wurde anschließend in 200 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 bis pH 9, resuspendiert und kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert.

#### 3.1.2 Mini-Präparation von Plasmid-DNS durch Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule

(peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Zur Präparation kleinerer Mengen hoch reiner DNS insbesondere für Sequenzierungen oder empfindliche Klonierungen wurde das oben beschriebene Kit verwendet. Die Plasmid-Präparationen erfolgten nach Herstellerprotokoll. Das Volumen der Übernachtskulturen betrug zwischen 1,5

und 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin. Am Vorabend der Präparation wurde das Medium entweder mit Bakterien aus Glycerol stocks oder mit zuvor gezüchteten Bakterienkolonien an geimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Eluierte DNS wurde kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert.

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

Die gleichzeitige Analyse der DNS gezüchteter Bakterienkolonien wurde mit dieser Methode durchgeführt. DNS, die mit dieser Methode präpariert wurde, enthält große Mengen an RNS sowie bakterieller Endotoxine und wurde deshalb lediglich zur Restriktionsanalyse unter Verwendung von RNase eingesetzt. Zur Präparation wurden Bakterienkolonien von LB-Agarplatten in 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. 1,5 ml dieser Bakterien-Übernachtkultur wurden am folgenden Tag 1 Minute bei 10000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment in 400 µl STET-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Triton-X-100; 0,1 M NaCl) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 25 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) durchmischt, für 30 Sekunden gekocht und anschließend für 10 Minuten bei 10.000 x g bei RT zentrifugiert. Das aus Zelltrümmern bestehende Pellet wurde vorsichtig entfernt und die Plasmid-DNS im Überstand durch Zugabe von 40 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 420 µl Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation für mindestens 30 Minuten bei >13.000 x g und 4°C sedimentiert. Nach Waschen mit 0,5 ml 70%-igem EtOH wurde die DNS an der Luft oder im SpeedVac (Vacufuge 5301 Concentrator, Eppendorf, Hamburg) getrocknet und in 40 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 bis pH 9 resuspendiert.

## 3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

### 3.2.1 Photometrische Bestimmung

(Gene Quant RNA/DNS Calculator, Pharmacia, Freiburg)

Zur Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäure-Lösung wurde mittels eines Foto-Spektrometers die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen Tris-HCl als Leerwert gemessen. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizienten  $E_{260}/E_{280}$  abgeschätzt. Reine DNS-Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8. Bei 1 cm Strahlengang entspricht eine  $OD_{260nm} = 1$  der Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS.

### 3.2.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden

(MassRuler™ DNS Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot)

Bei dieser Methode ist nur ungefähre Mengenabschätzung bei gleichzeitiger Identifikation der präparierten DNS möglich. Die zirkuläre DNS wurde dafür durch Restriktions-Endonukleasen linearisiert und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. Unter dem UV-Licht (245 nm) wurden die DNS-Banden mit Marker-DNS-Banden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen (s. Kapitel 2.2).

## 3.3 Agarose-Gelelektrophorese

(Sub Cell GT / Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories, München)

Zur analytischen und präparativen Auftrennung der DNS wurden horizontale Agarosegele mit TAE-Puffersystem verwendet. Die DNS Proben wurden mit 6fach Beladungspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und mittels Gelelektrophorese für 0,5 bis 1,5 h bei 8 bis 12 V pro cm Gelbreite aufgetrennt.



Zur Anfärbung der DNS wurde der 1%-igen Agaroselösung 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml (Bio-Rad, 10 mg/ml) zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (245 nm) durch Vergleich mit den oben beschriebenen Größenstandards (s. Kapitel 2.2).

### **3.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose**

(QIAquick®, Qiagen, Hilden)

Die Auftrennung und Aufreinigung mittels Restriktionsspaltung für die Klonierung erzeugter DNS-Fragmente erfolgte durch die präparative Agarose-Gelelektrophorese. Anschließend wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht (245 nm) identifiziert, ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Die Gelpräparation von maximal 400 mg erfolgte nach Herstellerprotokoll. Eluierte DNS-Fragmente wurden unmittelbar weiterverarbeitet oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

### **3.5 Enzymatische Reaktionen mit doppelsträngiger DNS**

#### **3.5.1 Spaltung der doppelsträngigen DNS durch Restriktions-Endonukleasen**

Die verwendeten Enzyme (Roche Diagnostics, Penzberg) spalten die DNS an definierten Schnittstellen, bei denen die DNS-Erkennungssequenz der Spaltstelle entspricht. Diese Erkennungs- und Spaltsequenzen entsprechen meist Palindromen der Buchstabencodes der Nukleinsäure-Basen. Eine Spaltung erfolgt entweder asymmetrisch, so dass kohäsive überlappende Enden entstehen („sticky ends“) oder symmetrisch, so dass gerade Enden vorliegen („blunt ends“). Aufgrund ihrer kohäsiven Eigenschaften und spezifischen Komplementarität mit anderen überlappenden Enden, werden Restriktionsenzyme bei der Zusammensetzung gewünschter Gensequenzen rekombinanter Protein verwendet. Bei der Restriktionsspaltung mit den oben aufgelisteten Endonukleasen (s. Kapitel 2.9) wurden pro µg DNS 2 Units

Restriktionsenzym eingesetzt. Eine Enzymeinheit (Unit) entspricht dabei der definierten Menge an Enzym, die bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) in einer Stunde 1 µg DNS in einem optimalen Puffersystem spaltet. Um diese Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme zu schaffen, wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10fach Puffer verwendet. Die DNS wurde mit verschiedenen Restriktions-Endonukleasen gleichzeitig geschnitten, wenn die geforderten optimalen Pufferbedingungen erfüllt waren. War dies nicht der Fall, insbesondere bei verschiedenen Optimaltemperaturen, wurde sequentiell gespalten. Wurde die zu untersuchende DNS mit der boiling-Methode präpariert, so wurde den Versuchsansätzen zur Restriktionsspaltung 0,5 µg RNase A (Roche Diagnostics, Penzberg) beigelegt.

### 3.5.2 Ligation von DNS-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNS-Ligase

Isolierte DNS-Fragmente mit kohäsiven überlappenden Enden wurden in einem 3 bis 5-fach molaren Überschuss mit linearisierter Vektor-DNS gemischt. Nach der Zugabe von 2 Units T4-DNS-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1/10 Volumen 10fach Ligationspuffer wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert (T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Goettingen). Das Gesamtvolumen betrug zwischen 10 und 20 µl. Anschließend wurde der Ligationsansatz zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt oder ein Teil zur längerfristig bei -20°C gelagert.

## 3.6 Bakterienkultur

### 3.6.1 Herstellung chemokompetenter E.coli DH5α Bakterien

Am Vorabend des Herstellungstages wurden 5ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 10µl DH5α aus einem Aliquot der zuvor benutzten kompetenten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Am Versuchstag wurden jeweils 200 ml LB-Medium ohne Antibiotika in 1l-Erlenmeyerkolben mit

2ml Vorkultur an geimpft und im Schüttler bei 37°C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{590nm}$  von maximal 0,4 (gegen LB-Medium) wachsen gelassen. Nach Erreichen der optimalen Dichte kühlten die Kulturen auf Eis mind. 10min ab. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle Arbeitsschritte auf Eis und im 4°C Kühlraum ausgeführt. Die Bakterien wurden in einer vorgekühlten Zentrifuge 10min bei 1600g und 4°C ab zentrifugiert. Zur Verminderung zu hoher Beschleunigungsbelastungen wurden die Brems- und Beschleunigungswerte der Zentrifuge (Avanti® J-E, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) herabgesetzt. Der Überstand wurde verworfen, und die Pellets mit 10ml eiskaltem  $CaCl_2$ -Puffer vorsichtig gelöst und durch langsames Auf-und-Ab-Pipettieren resuspendiert. Weitere 10ml Puffer wurden hinzugegeben und anschließend bei 4°C und 1100g 7min ab zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstands wurden die Resuspension wie oben beschrieben wiederholt und die Bakteriensuspension 30min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 1100g 7min. Die Überstand wurden verworfen und die Bakterienpellets in 4ml Puffer wie beschrieben resuspendiert. Die vereinigte Bakteriensuspension wurden zu jeweils 100 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zum Verbrauch oder merklicher Abnahme der Kompetenz erfolgte bei -80°C. Alle Materialien zum Resuspendieren und Aliquotieren waren sterilisiert und wurden ab dem Vortag des Versuchstages bei 4°C gelagert. Die erzeugte Kompetenz wurde durch Transformation mit jeweils 10 und 100 pg des Plasmids pUC19 (Invitrogen GmbH, Darmstadt) getestet und mittels Auszählen der Kolonien bestimmt. Die Kompetenz betrug zwischen  $10^6$  und  $10^7$  cfu/µg DNS (Kolony-forming units pro µg DNS).

CaCl<sub>2</sub>-Puffer :        60mM CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat  
                              10mM PIPES  
                              15 % (w/v) Glycerin

Vor der Zugabe von Glycerin wurde der Puffer mit 3 M NaOH auf pH 7 eingestellt.

### 3.6.2 Transformation kompetenter E.coli DH5α Bakterien

(Hanahan 1983)

Bei  $-80\text{ °C}$  gelagerte kompetente Bakterien ( $100\text{ }\mu\text{l}$  pro  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit  $5$  bis  $10\text{ }\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes gemischt. Anschließend wurden die Bakterien  $30$  Minuten auf Eis und für  $90$  Sekunden bei  $42\text{ °C}$  inkubiert. Danach wurden die Bakterien sofort für  $2$  Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von  $600\text{ }\mu\text{l}$  LB-Medium wurden die Bakterien zum Erwerb der Resistenzeigenschaft (Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz) für  $1\text{ h}$  bei  $37\text{ °C}$  und  $200\text{ rpm}$  inkubiert. Anschließend wurde aus jedem Eppendorf-Gefäß das Gesamtvolumen entnommen und auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten mit dem „Drigalsky“-Spatel ausgestrichen, wobei der Spatel nach jedem Ausstrich in  $70\%$  Ethanol eingetaucht und abgesengt wurde. Zur Blau-Weiß-Selektion wurden die verwendeten LB-Agarplatten vor dem Ausstreichen der Bakterien mit je  $50\text{ }\mu\text{l}$  X-Gal und IPTG bestrichen.

### 3.7 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis et al. 1986)

Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die im selben Ansatz bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt werden die zu amplifizierenden DNS-Moleküle denaturiert. Im folgenden Schritt hybridisieren unter geeigneten Temperaturbedingungen zwei DNS-Oligonukleotide (Primer) mit je einem der beiden DNS-Einzelstränge. Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung dieser Startermoleküle entlang der einzelsträngigen Matrize durch eine thermostabile DNS-Polymerase. Die geeigneten Temperaturbedingungen für das Hybridisieren der beiden eingesetzten Primer ist von der Sequenz der Primer abhängig, welche einen optimalen Guanin- und Cytosin-Gehalt von  $40$  bis  $60\%$  aufweisen sollten. Mit Hilfe der Software Vector NTI Advance™ (Invitrogen GmbH, Darmstadt) wurden die optimalen Primer-Zusammensetzungen berechnet und ihre Schmelzpunkte durch Berechnung aufeinander abgestimmt.

Präparative PCR für die Klonierung von Genkassetten wurden mit dem Polymerase-Mix „High Fidelity PCR Master“ (Roche Diagnostics, Penzberg) durchgeführt, welcher sowohl über Korrekturlese-Mechanismen zur Minimierung von Mutationen bis zu einer Fragmentgröße von 5 kb verfügt als auch die für das TA-Cloning benötigten 3'-A-Überhänge einfügt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem programmierbaren Heizblock (T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Goettingen) durchgeführt. Zudem konnte die optimale Bedingung der Primerbindung in einem Temperaturgradienten ermittelt werden (Mastercycler® gradient, Eppendorf, Hamburg).

Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten wurde folgender Standardansatz verwendet:

- x µl Matrizen-DNS (50-200 ng Plasmid-DNS)
- 2 µl Primer I (10 pmol)
- 2 µl Primer II (10 pmol)
- 25 µl High fidelity Master Mix (2x)
- x µl steriles ddH<sub>2</sub>O, PCR-geeignet

---

Σ 50 µl

Zur Amplifikation der DNS-Fragmente wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

- 1.) Hitzedenaturierung: 96 °C 60 Sekunden
- 2.) Hitzedenaturierung: 96 °C 60 Sekunden
- 3.) Anlagerung der Oligonukleotide: 50-65 °C 30-60 Sekunden
- 4.) Polymerisation (je nach Länge): 72 °C 60-120 Sekunden  
30-40 Reaktionszyklen (2. - 4.)
- 5.) Einmalige Endpolymerisation 72 °C 4 Minuten
- 6.) Kühlung 4 °C

### 3.8 Plasmidsequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

(BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt)

Die DNS-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch Methode (Sanger et al., 1975) durchgeführt. Das Prinzip diese enzymatischen Verfahrens beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3' Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs) in einen durch die DNS-Polymerase I neu synthetisierten DNS-Strang. Dies führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxylgruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise wird die Polymerisierung selektiv bei A, C, G oder T terminiert. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNS-Fragmenten, die sich durch ein fixes 5'-Ende und ein variables, basenspezifisches 3'-Ende auszeichnen. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (A: dichloro Rhodamin 6G [R6G]; C dichloro-carboxy X Rhodamin [ROX]; G dichloro Rhodamin 110 [R110]; T dichloro-tetramethyl Rhodamin [TAMRA]) können alle vier enzymatischen Sequenzier-Reaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die anschließende Trennung der DNS-Fragmente und die Fluoreszenzanalysen wurden am Cologne Center of Genomics (Universität zu Köln) durchgeführt.

Reaktionsansatz für die Sequenzreaktion (optimiert für Übernacht-PCR):

X µl	Matrizen-DNS (150-300 ng)
2 µl	Sequenzierungs-Oligonukleotide (10 pmol)
0,5 µl	Terminator-Ready-Reaction-Mix
2 µl	5-fach Puffer
X µl	ddH <sub>2</sub> O

---

Σ 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem PCR-Programm amplifiziert:

- |     |                                 |                    |
|-----|---------------------------------|--------------------|
| 1.) | Hitzedenaturierung:             | 96 °C 60 Sekunden  |
| 2.) | Hitzedenaturierung:             | 96 °C 30 Sekunden  |
| 3.) | Anlagerung der Oligonukleotide: | 50 °C 15 Sekunden  |
| 4.) | Polymerisation (je nach Länge): | 60 °C 240 Sekunden |
|     | 90 Reaktionszyklen (2. - 4.)    |                    |
| 5.) | Kühlung                         | 4 °C               |

Nach beendeter Polymerase-Kettenreaktion wurde das Probenvolumen mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und zur Auswertung der Sequenzreaktion zum Cologne Center of Genomics (Universität zu Köln) überführt, wo die Kapillarelektrophorese sowie die Fluoreszenzanalysen stattfanden (Applied Biosystems 3730 DNA analyzer, Applied Biosystems / Invitrogen GmbH, Darmstadt). Ausgewertete und digitalisierte Sequenzierungsdateien wurden mit Hilfe des Programms ContigExpress® (Vector NTI Advance™; Invitrogen GmbH, Darmstadt) abgeglichen.

### 3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page wurde mit Hilfe des NuPAGE® Novex® Tris-Acetat Systems in einer XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresekammer durchgeführt. Reagenzien, Puffer und Standards sowie das verwendete Versuchsprotokoll entstammen den Herstellerempfehlungen (Invitrogen GmbH, Darmstadt).

Die Probenaufbereitung der nicht reduzierten Zelllysate wurde auf Eis durchgeführt und zur Erhaltung von Protein-Protein Wechselwirkungen nicht für 10 min bei 70°C inkubiert:

Probe	x µl
Tris-Glycine Native Sample Buffer (2X)	15 µl
ddH <sub>2</sub> O	x µl
Endvolumen	30 µl

Die aufbereiteten Proben wurden auf ein NuPAGE® Novex® Tris-Acetat Gradienten-Gel mit 1 mm Dicke gegen 5 µl des farbmarkierten Proteinstandards SeeBlue® Plus2 aufgetragen. Die Proben wurden 2h bei 150V im Laufpuffer NuPAGE® Tris-Acetate SDS (50 mM Tricin, 10 mM Tris, 0.1% SDS, pH 8,24) aufgetrennt.

### 3.10 Western Blot

Die Übertragung der aufgetrennten Proteinproben in einem Tank-Blot mit dem entsprechenden NuPAGE® Transferpuffer erfolgte mit Hilfe des XCell II™ Blot Moduls. Das verwendete Versuchsprotokoll basiert auf den Herstellerangaben (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Die verwendete Membran aus dem Kit iBlot®Transfer Stack, PVDF Mini wurde 30 Sekunden in Methanol inkubiert, kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen und bis zur Proteinübertragung in Transferpuffer gelagert. Blotting Pads sowie die Whatman Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer inkubiert und Luftblasen gegebenenfalls sorgfältig entfernt. Nach dem Zusammenbau des Blots wurden die Proteine in ca. 100 ml Transferpuffer für 1h bei 30V auf die PVDF Membran übertragen.

Der Proteintransfer wurde im Anschluss mit einer Färbelösung aus 0.1% (w/v) Ponceau S in 5% Essigsäure überprüft und damit gleichzeitig eine Fixierung der Proteine auf der Membran erreicht. Die Banden des Proteingrößenstandards wurden markiert und die freien unspezifischen Bindungsstellen der Membran über Nacht bei 4°C in 15 ml blocking Lösung ab gesättigt. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x 5 min und 1x 10 min in TBS/T gewaschen und 1-2h bei Raumtemperatur mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Detektionsantikörper Kaninchen anti-human-IgG (1:800) inkubiert. Nicht gebundener Detektionsantikörper wurde anschließend durch viermaliges zehninütiges Waschen mit TBS/T entfernt und die Chemielumineszenz-Reaktion eingeleitet. Dazu wurde die Membran mit Amersham ECL Detektionsreagenz 60 Sekunden inkubiert und die Lumineszenz in der Dunkelkammer auf Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) übertragen. Die Entwicklung der Filme



erfolgte an einer Agfa CURIX 60™ Entwicklungsmaschine (Agfa HealthCare GmbH, Köln).

Transferpuffer:

50 ml NuPAGE® Transfer Buffer (20x; Invitrogen GmbH, Darmstadt), 100 ml Methanol, 850 ml ddH<sub>2</sub>O

Blocking Puffer:

5 ml Roti®-Block (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), 45 ml ddH<sub>2</sub>O, 2,5 g fettarmes Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Detektionslösung:

15 ml TBS, 0,75 g fettarmes Milchpulver, 150 µl Kaninchen Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark), 18,75 µl Rabbit anti-human-IgG-HRP (1:800; DAKO, Glostrup, Dänemark)

Chemielumineszenz-Reagenz:

(Amersham ECL™ WesternBlotting Detection Reagents; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) jeweils 4ml der Lösungen 1 und 2 entsprechen 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Gesamtvolumen

### **3.11 Sandwich-ELISA**

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (MaxiSorp™, Nunc GmbH, Wiesbaden) erfolgte durch Übernacht-Inkubation der Fangantikörper in 50 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung bei 4°C. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde für 2 bis 3h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in PBS/T inkubiert und die Platten nach Ausschlagen der Lösung entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet. Überschüssige BSA-Lösung wurde anschließend durch einmaliges Waschen mit je 200 µl PBS/T pro Vertiefung entfernt. Die zu untersuchenden Lysate oder Zellkulturüberstände (50 µl/Vertiefung) wurden auf die Mikrotiterplatte gegeben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden gegebenenfalls Verdünnungsreihen mit den zu vergleichenden rekombinanten Proteinen in PBS/T mit 1% BSA (w/v) aufgetragen. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS/T (200 µl pro

Vertiefung) gewaschen. Die Inkubation mit den Biotin-gekoppelten Detektions-Antikörpern in jeweils 50 µl pro Vertiefung erfolgte 1h bei RT. Anschließend wurde dreimal mit PBS/T gewaschen, 30 Minuten mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase inkubiert und nicht gebundene Peroxidase durch vier- bis fünfmaliges Waschen mit PBS/T entfernt. Der Test wurde durch Zugabe von 100µl ABTS-Substratlösung pro Vertiefung bei RT entwickelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 490 nm wurde photometrisch bestimmt. Die Berechnung der Protein-Konzentration erfolgte gegebenenfalls anhand der linearen Progression der gemessenen Standardkonzentrationen. Alle Tests wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt, der Mittelwert der Zytokinkonzentration und die Standardabweichung wurden bestimmt.

Beschichtungslösung IFN-γ ELISA:

34 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6, 1 µg/ml Maus anti-human-IFN-γ (BD PharMingen, Hamburg)

Beschichtungslösung IL-2 ELISA:

0.1 M Na HPO<sub>4</sub>, pH 9, 1 µg/ml Maus anti-human-IL-2 (BD PharMingen, Hamburg)

Beschichtungslösung Lysat ELISA:

Geeignete Antikörperverdünnung in PBS (z.B. 5 µg/ml BW2064/399)

Detektionslösung 1:

1% BSA (w/v) in PBS/T; 1 µg/ml Biotin Mouse Anti-Human IL-2 (BD PharMingen, Hamburg), 0,5 µg/ml Anti-Human Interferon gamma Monoclonal Antibody, Biotin-Labeled (Thermo Pierce Endogen, Rockfort, IL, USA) oder 1:32000 anti-GFP-Biotin Antikörper (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)

Detektionslösung 2:

1% BSA (w/v) in PBS/T, 1:10000 Streptavidin-gekoppelte Peroxidase (Roche Diagnostics, Penzberg) entspricht 50 U/µl

ABTS-Substratlösung:

1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer (Roche Diagnostics, Penzberg)

Proteinstandard IFN- $\gamma$ :

1% BSA (w/v) in PBS/T; 1:10000 Imukin® (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Schweiz) entspricht 20 ng/ml IFN- $\gamma$

Proteinstandard IL-2:

1% BSA (w/v) in PBS/T; 1:900 der Stammlösung Proleukin® (Chiron / Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) entspricht 2000 U/ml IL-2

## 3.12 Zellkultur

### 3.12.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe II unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Heraeus Thermo Scientific oder Kojar Tech Oy) durchgeführt. Die Zellen wurden in Inkubatoren (Heraeus oder Samsung) unter 5%-iger (RPMI 1640 Medium) oder 10%iger (D-MEM Medium) CO<sub>2</sub>-Versorgung bei 37°C und 95 bis 100% relativer Luftfeuchtigkeit (RH) kultiviert. Kulturgefäße, Medien, Zusätze und Lösungen wurden nach dem Autoklavieren oder Steril-Filtrieren unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Vor Gebrauch wurden die verwendeten Medien, sowie Wasch- und andere Lösungen auf die geeignete Temperatur vorgewärmt oder abgekühlt.

Kulturbedingungen HEK 293T Zelllinien:

D-MEM GlutMAX™ High Glucose mit Phenolrot, 10% (v/v) FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 37°C, 95-100% RH, 10% CO<sub>2</sub>

Kulturbedingungen H498, MC38- und Hybridomzelllinien:

RPMI 1640 GlutMAX™ mit Phenolrot, 10% (v/v) FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 37°C, 95-100% RH, 5% CO<sub>2</sub>

Kulturbedingungen periphere Blutlymphozyten:

RPMI 1640 GlutMAX™ mit Phenolrot, 10% (v/v) FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 100 bis 1000 U/ml IL-2, 37°C, 95-100% RH, 5% CO<sub>2</sub>

### 3.12.2 Passagieren adhärenter Zellkulturen

Vor Erreichen einer 100%-igen Konfluenz oder pH-indiziertem Nährstoffmangel, welcher sich durch eine allmähliche Gelbfärbung des Indikators Phenolrot im Kulturmedium erkennen ließ, wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturüberstandes mit sterilem PBS gewaschen, mit 1 bis 3 ml einer Trypsin-Lösung für 3 bis 5 Minuten bei RT inkubiert und von der Kulturflaschenoberfläche gelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, wodurch die Trypsin-Aktivität irreversibel blockiert wurde. Die abgelösten Zellen wurden für 3 min bei max. 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellen (je nach Bedarf) wurde in die Zellkulturflasche zurückgegeben und in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Trypsin-Lösung:

10% (v/v) Trypsin-EDTA Solution 10X (Sigma-Aldrich / SAFC Biosciences Ltd., Hampshire, UK) in PBS

### 3.12.3 Lymphozyten-Separation mittels Dichte-Zentrifugation

(optimiert nach Böyum 1968)

Die Leukozyten-Konzentrate („buffy coats“) wurden durch die Blutbank der Universität zu Köln oder Düsseldorf bereitgestellt und waren 4 bis 6 Stunden nach der Blutentnahme verfügbar. Mononukleäre periphere Blutzellen (PBMC) wurden mittels Dichte-Zentrifugation aus „buffy-coat“-Konserven separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellen des humanen Blutes zunutze. Dabei wird das Blut über eine hochmolekulare Flüssigkeit geschichtet, in welcher sich Blutzellen nach der Zentrifugation in verschiedene, dichteabhängige Phasen aufteilen. Hierfür wurden 15 ml des Blutes eines gesunden Spenders 1:2 mit PBS verdünnt und auf 15 ml Lymphoprep™(Axis-Shield PoC, Oslo, Norwegen) geschichtet. Anschließend wurden die so geschichteten Zellen für 30 min bei 800 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Da hohe Beschleunigungswerte den entstandenen Gradienten zerstören, wurde die Zentrifuge auf minimale

Beschleunigung gestellt. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Phase verworfen. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde vorsichtig abgenommen, mit 20 ml PBS gewaschen und 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Zellsediment wurde in 50 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen mit 1000 U/ml IL-2, 200 ng/ml des anti-human-CD3 Antikörpers OKT3 und 50 ng des anti-human-CD28 Antikörpers 15E8 stimuliert. Gegebenenfalls adhärenente Zellen der PBMC setzten sich über Nacht an der Oberfläche der Zellkulturflasche fest und die nicht adhärenenten peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden in einer neuen Flasche weiter kultiviert. Nach 3 tägiger Aktivierung der PBL mit den oben beschriebenen Antikörpern, wurde die PBL unter den entsprechenden Kulturbedingungen kultiviert.

#### 3.12.4 Transfektion von Tumorzellen der Linie 293T

(jetPRIME™, Polyplus-transfection SA, Illkirch, Frankreich)

Die DNS wird mit Hilfe von fein verzweigten Molekülen verpackt, deren positiv geladene Amino-Gruppen die DNS umschließen und die Passage durch die Zellmembran erleichtern. Der DNS-jetPRIME™-Komplex bindet an negativ geladene Proteine und Glykoproteine der eukaryotischen Zelle und ermöglicht so die Endozytose in ein von einer einschichtigen Membran umhülltes Lysosom. Das alkalische jetPRIME™-Reagenz wirkt bei  $\text{pH} \leq 5$  als Puffer-Substanz und erhöht den pH-Wert des Lysosomen-Kompartiments, so dass lysosomale Nukleasen erfolgreich inhibiert werden. Zellen der Linie HEK 293T wurden 24h vor der Transfektion in Kulturmedium in einer geeigneten Zellkulturplatte so aus gesät und dass sie nach Inkubation über Nacht eine Konfluenz von 50-70% aufwiesen. Plasmid-DNS wurden in einem Eppendorf-Gefäß mit jetPRIME™-Puffer verdünnt, 10s mittels Vortex durchmischt, mit jetPRIME™ Transfektionsreagenz versetzt, wiederum 10s durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionsansätze tropfenweise zu den kultivierten Zellen in das Kulturmedium gegeben. Nach 24

bis 48h Inkubation unter Kulturbedingungen wurden die Zellen für Analysen verwendet.

Transfektion in 6well Zellkulturplatten:

$3 \times 10^5$  HEK 293T in 2 ml Kulturmedium pro Vertiefung

2  $\mu$ g Plasmid-DNS in 200  $\mu$ l jetPRIME™-Puffer

4  $\mu$ l jetPRIME™

Transfektion in 10cm Zellkulturplatten:

$2,5 \times 10^6$  HEK 293T in 10 ml Kulturmedium

10  $\mu$ g Plasmid-DNS in 500  $\mu$ l jetPRIME™-Puffer

20  $\mu$ l jetPRIME™

### 3.12.5 Generierung stabil transfizierter Zellen

Zur Generierung von Zellklonen, die das gewünschte Protein stabil exprimieren, wurden Zellen mit DNS für einen Selektionsmarker kotransfiziert. Dabei wurden die Vorgaben des Protokolls des verwendeten Transfektionsreagenz jetPRIME™ übernommen. Um HygromycinB-resistente Zellen zu erzeugen, die das gewünschte Protein exprimieren, wurde die Plasmid-DNS für das gewünschte Protein im Verhältnis 3:1 mit der Plasmid-DNS für den Resistenzmarker transfiziert. Eine vorherige Linearisierung der Plasmid-DNS erhöhte dabei die Wahrscheinlichkeit des stabilen Einbaus in das Genom der transfizierten Zellen auf maximal  $10^{-4}$ . Nach 24 bis 48h befand sich die Expression der transfizierten Proteine auf dem Höhepunkt und die Selektion mit Hygromycin konnte durchgeführt werden. Transfizierte Zellen wurden in geeigneter Dichte von maximal  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten aus gesät, so dass bei größter Integrationswahrscheinlichkeit nur wenige Zellen pro Vertiefung die Antibiotikaselektion überlebten und eine Durchmischung entstehender monoklonaler Zellpopulationen minimiert wurde. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen, die stark mit der Wachstumsrate der Zellen variierte, wurde nach jeweils 3 bis 4 Tagen Inkubation das Kulturmedium mit Hygromycin B ausgetauscht. Bevor eine 100%-ige Konfluenz oder eine Durchmischung zweier Zellpopulationen auftrat, wurden die Zellen in größeren

Zellkulturplatten bis zu einer für durchflusszytometrische Analysen geeigneten Menge expandiert. Diese war bei der Verwendung der Kotransfektion essentiell, da die Expression des gewünschten Proteins nicht unmittelbar mit der Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum zusammenhing.

Selektionsmedium MC38 Zelllinien:

50 µg/ml Hygromycin B in Kulturmedium

Eine weitere Methode der stabilen Expression stellte die Transduktion dar. Die Kotransfektion zur Produktion von Retroviren mit der Expressionskassette für das gewünschte Protein nach Protokoll hatte zur Folge, dass die transfizierten Zellen selbst transduziert wurden und somit die mit den Viren transportierte Expressionskassette stabil in das Genom integrierte. Durch die Verwendung eines bicistronischen retroviralen Expressionsvektors, der gleichzeitig für ein Resistenzgen gegen Hygromycin B kodiert, betrug die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen stabil exprimierender Zellen ein Vielfaches der oben beschriebenen Methode. Aus diesem Grund konnte auf die langwierige Generierung von monoklonalen Zellpopulationen verzichtet werden und die Selektion auf größeren Zellkulturplatten durchgeführt werden. Bis zur Konfluenz von annähernd 100% wurde das Kulturmedium alle 3 bis 4 Tage mit frischem Kulturmedium und Antibiotika ersetzt und die Zellen zur Expansion in wiederum größere Zellkulturplatten überführt. Die Analyse der stabilen Expression des gewünschten Proteins konnte anschließende durchflusszytometrisch erfolgen.

Selektionsmedium HEK 293T:

100 µg/ml Hygromycin B in Kulturmedium

### 3.12.6 Retrovirale Transduktion peripherer Blutlymphozyten

Retrovirale Vektor-DNS wurde mit der retroviralen Helfer-Plasmid-DNS pHIT60 und pCOLT in Zellen der Linie 293T mit Hilfe des jetPRIME™ Transfektionsreagenz endozytotisch eingebracht. Das D-MEM Kulturmedium wurde nach 24h verworfen und aktivierte PBL für 24-72h mit den kotransfizierten HEK 293T Zellen in RPMI-Kulturmedium und 1000 U/ml IL-2 kokultiviert. Während dieser

Inkubation wurden die Viren kontinuierlich in den Zellkulturüberstand sezerniert und transduzierten die T-Lymphozyten. Nach der Kokultivierung wurden die T-Lymphozyten vorsichtig von den adhärennten 293T Zellen abgenommen und die Rezeptorexpression durchflusszytometrisch bestimmt.

Transduktion in 6well Zellkulturplatten:

Maximal  $1,5 \times 10^6$  PBL in maximal 10 ml Kulturmedium mit 1000 U/ml IL-2

Transduktion in 10cm Zellkulturplatten:

Maximal  $5 \times 10^6$  PBL in maximal 35 ml Kulturmedium mit 1000 U/ml IL-2

### 3.12.7 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Konservierung von Zellen wurden Zellen für die Lagerung in flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) oder einer  $-150^\circ\text{C}$  Küh Itruhe (SANYO Biomedical and Environmental Solutions, Wood Dale, IL, USA) vorbereitet. Dafür wurden adhärennte Zellen trypsiniert, in Medium überführt und durch Zentrifugation bei 400 g für 3 min bei RT sedimentiert. Mindestens  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 900  $\mu\text{l}$  frisches Kulturmedium aufgenommen und mit 10 % (v/v) DMSO versetzt. Diese Zellsuspensionen wurden zügig in Gefrier-Ampullen überführt und sofort auf Eis gelagert. Mit dem auf  $-20^\circ\text{C}$  vorgekühlten Einfrierbehälter „Cryo 1 $^\circ\text{C}$  Freezing Container“ (Nalgene Thermo Fischer Scientific, Rochester, NY, USA) wurden die Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  mit einer kontinuierlichen Rate von  $-1^\circ\text{C}$  pro Minute eingefroren nach 24h bis 48h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff bzw.  $-150^\circ\text{C}$  überführt.

Zur Verwendung kryokonservierter Zellen, wurden Gefrier-Ampullen entnommen und auf Eis in die Zellkulturen überführt. Dort erfolgte ein zügiges Auftauen im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad und sofortige Resuspension in 10 ml frisches Kulturmedium. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 400 g und RT wurden die Zellen erneut in frischem Kulturmedium aufgenommen, in geeignete Zellkulturbehälter überführt und entsprechend den Kulturbedingungen kultiviert.



### 3.12.8 Herstellung von Zell-Lysaten

Die Herstellung der Zell-Lysate erfolgte durch Resuspension von  $1 \times 10^6$  Rezeptor tragender T-Zellen in 1 ml Lysispuffer. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 20 Minuten bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ELISA-Tests eingesetzt oder mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und in Western Blots zur Immundetektion auf Membran übertragen.

Lysis Puffer:

100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mg/ml Complete Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Penzberg), 1% (v/v) Triton-X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

### 3.13 Durchflusszytometrische Immunfluoreszenz-Analysen

Transfizierte oder transduzierte Zellen wurden mit PBS gewaschen, gegebenenfalls trypsinisiert (adhärente Zellen) und in Kulturmedium resuspendiert. Etwa  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in ein 5 ml BD Falcon™ Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden 3 min bei 400 g zentrifugiert und das Zellsediment zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. Ein oder mehrere Detektions-Antikörper wurden zugegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Proben vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und 3 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment gegebenenfalls für eine weitere Inkubation mit einem sekundären Antikörper in 100 µl PBS, ansonsten in 400 µl PBS resuspendiert. Je nach Experiment wurden kurz vor der Analyse 2 µl 7-AAD hinzugegeben und bis zur durchflusszytometrischen Messung 10 min auf Eis inkubiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Tests erfolgte mit Hilfe eines FACSCanto™- oder FACSCalibur™-Durchflusszytometers unter Verwendung der FACSCanto-Research-Software (FACSDiva™ analysis software Version 5.x, Becton

Dickinson, Heidelberg) bzw. der FACSCalibur-Research-Software (CellQuest Pro Version 4.x, Becton Dickinson, Heidelberg).

### **3.14 Magnetische Zellseparation MACS®**

#### **3.14.1 Indirekte Separation von T-Lymphozyten mittels Depletion**

(Mitenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Die Sortierung humaner T-Lymphozyten erfolgte durch die Depletion nicht CD3 exprimierender Zellen aus peripheren Blutlymphozyten mit dem Pan-T Cell isolation Kit II am MidiMACS™ Separator. Die Separation wurde nach Herstellerprotokoll an LS Säulen mit einer Kapazität von bis  $1 \times 10^8$  magnetisch markierten Zellen durchgeführt. Mit dem enthaltenen Cocktail biotinylierter Antikörper gegen die Oberflächenproteine CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und CD235a wurden in PBL oder PBMC enthaltene B-Lymphozyten, NK Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Granulozyten und erythroide Zellen markiert. Eine anschließende Inkubation mit anti-Biotin Antikörper gekoppelten magnetischen MicroBeads führte zum Zurückhalten markierter Zellen im magnetischen Feld des MidiMACS™ Separators während die nicht markierten CD3 exprimierenden T-Lymphozyten ungehindert eluieren konnten. Eine Kontrolle der Separationseffizienz am Durchflusszytometer ergab einen Anteil CD3 exprimierender Zellen von 90 bis 100%. Durch die Depletion nicht CD3 exprimierender Zellen und den Erhalt unangetasteter T-Lymphozyten sind im Gegensatz zur positiven Anreicherungs-methode sowohl Experimente mit nicht aktivierten, ruhenden T-Zellen möglich als auch die Aktivierung der T-Zellen unter den gewünschten und gleichbleibenden Bedingungen. Die Verwendung hochreiner T-Zellpopulationen minimiert insbesondere bei Untersuchungen spezifischer Zytotoxizität die Auswirkung unspezifischer Zytolyse durch NK Zellen. Zudem wird die Detektion von chimären Antigen-Rezeptoren anhand der humanen IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne beispielsweise bei sensitiven Immunoblots nicht durch die Immunglobulin-Domänen der B-Zell und einiger Fc-Rezeptoren der Phagozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und dendritischer Zellen beeinflusst.

### 3.14.2 Direkte Separation CAR-exprimierender T-Zellen mittels Anreicherung

(Mitenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Die Anreicherung CAR-exprimierender T-Lymphozyten erfolgte mittels indirekter magnetischer Markierung mit anti-PE MicroBeads am MidiMACS™ Separator. Die Separation wurde nach Herstellerprotokoll an LS Säulen mit einer Kapazität von bis  $1 \times 10^8$  magnetisch markierten Zellen durchgeführt. Transduzierte und CAR-exprimierende Zellen wurden mit einem primären Antikörper markiert, der entweder spezifisch für die Bindedomäne des exprimierten CAR oder für dessen humane IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne ist. Nicht PE-konjugierte Primärantikörper wurden in einem zweiten Schritt mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die anschließende Inkubation mit anti-PE gekoppelten MicroBeads führte zum Zurückhalten markierter Zellen im magnetischen Feld des MidiMACS™ Separators während die nicht markierten nicht CAR-exprimierenden T-Lymphozyten ungehindert eluieren konnten. Die zurückgehaltenen CAR-exprimierenden T-Lymphozyten wurden außerhalb des magnetischen Feldes eluiert. Eine Kontrolle der Separationseffizienz am Durchflusszytometer ergab einen Anteil CAR-exprimierender Zellen von 50 bis 90%. Durch die Anreicherung CAR-exprimierender Zellen konnten niedrige Transduktionseffizienzen insbesondere bei bicistronischen CAR-Expressions-kassetten kompensiert und so beispielsweise die Detektionsschwelle bei durchflusszytometrische Analysen oder der Anteil nicht-transduzierter Zellen in Aktivierungsexperimenten vermindert werden. Zur Verwendung positiv angereicherter CAR-exprimierender T-Lymphozyten in Experimenten, in denen eine CAR-vermittelte Aktivierung untersucht werden sollte, war eine an die Sortierung anschließende Kultivierung der angereicherten Zellen unter IL-2 Entzug essentiell, da eine CAR-spezifische Separation anhand CAR-spezifischer Antikörper zur Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren und damit zu einer transienten CAR-vermittelten Aktivierung führte.

### 3.15 Produktion monoklonaler Antikörper

#### 3.15.1 Reinigung und Konzentration von Antikörpern und Proteinen aus Zellkulturüberständen

Zur Expression der monoklonalen Antikörper OKT3, 15E8, NS19-9 und BW2064/36 und BW2064/399 wurden die gleichnamigen Hybridomzellen unter den entsprechenden Kulturbedingungen kultiviert. Der antikörperhaltige Kulturüberstand wurde etwa alle 72h erneuert, gesammelt und bei -20°C gelagert. Je 1 Liter des Kulturüberstands wurde zentrifugiert (6800 g, 15 min, 4°C), filtriert (Ausschlussgröße 0,45 µm) und affinitätschromatografisch unter Verwendung Antikörper-gekoppelter Agarose aufgereinigt. Die gesammelten Überstände wurden dazu über Nacht mit bei 4°C mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min über eine C 10/10 Agarosesäule gegeben (Amersham / GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Im Anschluss wurden die nicht gebundenen Proteine mit 50 ml PBS, pH 7,4 ausgewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 25 ml 0,1 M Glycinpuffer, pH 3,0 in Fraktionen zu je 1,5 ml mit Hilfe des Flüssigchromatographiesystems ÄKTAprime® (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde während der Elution photometrisch bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Proteinhaltige Fraktionen wurden zusammengegeben und in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por®, Roth, Karlsruhe) der Ausschlussgröße 12000 bis 14000 MWCO (Molecular Weight Cut Off) über Nacht bei 4 °C in 2 Liter PBS, pH 7,4 unter leichtem Rühren umgepuffert. Anschließend wurden die Antikörper mit Hilfe von Vivaspin-Röhrchen der Ausschlussgröße 10000 MWCO (Sartorius Stedim Biotec, Goettingen) durch mehrmalige Zentrifugation für 30 min bei 5000 g und 4°C auf etwa 1 ml Endvolumen konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss photometrisch ermittelt.

Aufreinigung Maus anti-human-CD3 Antikörpers OKT3:

Ziege anti-Maus-IgG<sub>2a</sub> Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)  
gekoppelte Agarose

Aufreinigung Maus anti-human-CD28 Antikörpers 15E8:

Ziege anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)  
gekoppelte Agarose

Aufreinigung Maus anti-BW431/26 Idiotyp Antikörpers BW2064/36:

Ziege anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)  
gekoppelte Agarose

Aufreinigung Maus anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399:

Ziege anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)  
gekoppelte Agarose

Aufreinigung Maus anti-human-CA19-9 Antikörper 1116-NS19-9:

Ziege anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)  
gekoppelte Agarose

### 3.15.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Ultraviolettes (UV) Licht wird von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie von Disulfid-Brücken (Cystinen) in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm unterschiedlich stark absorbiert. Aus der Aminosäuresequenz kann nach (Pace et al. 1995) der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  und daraus, unter Einbeziehung des Molekulargewichtes, der biologische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{biol}}$  errechnet werden:

$$\epsilon_{280\text{biol}} = \epsilon_{280} / \text{MW} = (\sum \text{Trp} \times 5500 + \sum \text{Tyr} \times 1490 + \sum \text{Cys} \times 125) / \text{MW}$$

$\epsilon_{280}$  = Molarer Extinktionskoeffizient bei 280nm [1 / (M x cm)]

MW = Molekulargewicht des Proteins [ g/mol ]

Der biologische Extinktionskoeffizient für Antikörper (160 kDa) liegt bei 1,4 [ml/(mg x cm)]. Damit kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt werden:

$$\text{Abs}_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{biol}} \times c \times d$$

$\text{Abs}_{280\text{nm}}$  = Absorption

$\epsilon_{280\text{biol}}$  = biologischer Extinktionskoeffizient [ ml/(mg x cm)]

c : Proteinkonzentration [mg/ml]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

### 3.16 Kultivierung auf oberflächengebundenen Antikörpern

Die zur Beschichtung verwendeten Antikörper wurden mit PBS verdünnt. Gegebenenfalls wurden Kombinationen von Antikörpern und/oder Verdünnungsreihen erstellt. Polysorp® Mikrotiterplatten wurden den in PBS gelösten Antikörpern beschichtet (50 µl pro Vertiefung), über Nacht bei 4°C inkubiert und freie Bindungsstellen anschließend mit 200 µl Kulturmedium pro Vertiefung für 1h bei 37°C ab gesättigt. Das Kulturmedium wurde durch Waschen mit 200 µl PBS pro Vertiefung entfernt und zu untersuchende T-Lymphozyten in 200 µl Kulturmedium pro Vertiefung kultiviert. Bei der Verwendung CAR-exprimierender T-Lymphozyten wurde je nach Experiment und Voraktivierung 24 bis 48h durch IL-2 Entzug depriviert und jeweils unmittelbar nach der Transduktion sowie unmittelbar vor der Kultivierung auf den beschichteten Platten mehrfach mit PBS gewaschen. Für die Kultivierung wurde die Zellzahl bestimmt und T-Zellen anhand der durchflusszytometrisch bestimmten Expressionsraten auf Immunrezeptor tragende Effektorzellen normiert. Je nach Experiment wurden 1 bis  $5 \times 10^4$  Rezeptor-tragende Zellen pro Vertiefung ausplattiert und 48 bis 72h unter Kulturbedingungen inkubiert. Zur Analyse der Zellkulturüberstände wurden maximal 150 µl pro Vertiefung abgenommen und für Zytokin-ELISA weiterverwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Beispiele verwendeter Beschichtungen:

**ErbB2-Fc + BW2064/399 [ $\mu\text{g/ml}$ ] →**

	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

**Abbildung 8: Tritrationsschema für die Bestimmung der Aktivierungskinetik**

Polysorp® Mikrotiterplatten wurden mit dem ErbB2-Fc Fusionsprotein und dem BW2064/399 Antikörper im Verhältnis 1:1 beschichtet. Dabei wurden in einer 8-stufigen Verdünnungsreihe pro Vertiefung gleiche Konzentrationen (8  $\mu\text{g/ml}$  bis 62,5  $\text{ng/ml}$ ) der Proteine titriert (horizontal). Verwendung: → Kapitel 4.9 und 4.15

**ErbB2-Fc [ $\mu\text{g/ml}$ ] →**

	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
4								
2								
1								
0,5								
0,25								
0,125								
0,0625								
0,03125								

**BW2064/399 [ $\mu\text{g/ml}$ ] ↓**

**Abbildung 9: Zweidimensionale Tritration zur Simulation heterogener Antigendichte**

Polysorp® Mikrotiterplatten wurden mit dem Fusionsprotein ErbB2-Fc (horizontal) und dem BW2064/399 Antikörper (vertikal) beschichtet. Dabei wurden in einer 8-stufigen Verdünnungsreihe pro Vertiefung jeweils 4  $\mu\text{g/ml}$  bis 31,25  $\text{ng/ml}$  der Proteine titriert. Verwendung: → Kapitel 4.10 und 4.16

### 3.17 Kokultivierung mit Antigen-positiven Tumorzellen

CAR-exprimierende T-Lymphozyten wurde je nach Experiment und Voraktivierung 24 bis 48h durch IL-2 Entzug depriviert und jeweils unmittelbar nach der Transduktion sowie unmittelbar vor der Kultivierung auf den beschichteten Platten mehrfach mit PBS gewaschen. Für die Kultivierung wurde die Zellzahl bestimmt und T-Zellen anhand der durchflusszytometrisch bestimmten Expressionsraten auf Immunrezeptor tragende Effektorzellen normiert. In einer vierstufigen Verdünnungsreihe wurden z.B.  $1 \times 10^4$  bis  $1,25 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung auf 96-Loch-Rundbodenplatten (TPP®, Trasadingen, Schweiz) mit konstanter Zahl an Antigen-positiven Tumorzellen (z.B.  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung) in einem Volumen von je 200  $\mu$ l pro Vertiefung kokultiviert. Je nach Experiment betrug das maximale Verhältnis zwischen Effektorzellen und Tumorzelle (E:T ratio) 1:1. Nach 48h wurden zur Analyse der Zellkulturüberstände 150  $\mu$ l pro Vertiefung abgenommen und für Zytokin-ELISA weiterverwendet oder bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert, während die Zytotoxizität der Effektorzellen anhand eines XTT-basierenden Viabilitätstest der verbleibenden Zellen ermittelt wurde. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich stets nicht transduzierte T-Lymphozyten sowie mit Antigen-defizienten Tumorzellen kokultivierte CAR-exprimierende T-Zellen ausplattiert.

### 3.18 XTT-basierender Viabilitätstest

(Jost, Kirkwood und Whiteside 1992)

Die spezifische Zytolyse wurde in einem XTT-basierenden Viabilitätstest bestimmt. Hierbei wurde der Umsatz des durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisierten XTT zu einem wasserunlöslichen Formazan-Salz photometrisch bestimmt. Die Höhe des Umsatzes hängt direkt von der Viabilität der kokultivierten Zellen ab. Es wurden jeweils 100  $\mu$ l XTT-Markierungslösung pro Vertiefung zu den verbleibenden 50  $\mu$ l Medium pro Vertiefung gegeben, der Ansatz bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und die Extinktion in regelmäßigen Zeitabständen photometrisch bei einer Wellenlänge



von 450 nm abzüglich einer Referenzwellenlänge von 650nm ( $OD_{450-650}$ ) bestimmt. Der maximale Umsatz von XTT wurde in den Vertiefungen gemessen, die nur Tumorzellen enthielten. Als Hintergrundfärbung wurde die OD der Vertiefungen bestimmt, die nur Kulturmedium enthielten. Des Weiteren wurde der Anteil am Gesamtumsatz des XTT-Substrates bestimmt, der ausschließlich auf die Effektorzellen zurückzuführen ist. Hierfür wurde die gleiche Anzahl Lymphozyten wie auch im Versuchsansatz ohne Tumorzellen kultiviert und die OD dieser Vertiefungen nach Zugabe des XTT-Substrates bestimmt.

Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität [%]:

$$100 - [(OD_{E+T} - OD_E) / (OD_T - OD_M)] \times 100$$

[E = Effektorzellen; T = Tumorzellen; M = Medium]

Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, so dass Mittelwert der Viabilität und die Standardabweichung bestimmt werden konnten.

XTT-Markierungslösung pro Vertiefung:

50µl 1 mg/ml XTT (Biomol GmbH, Hamburg) in RPMI 1640, 1 µl 1,25 mM PMS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 50µl RPMI-Kulturmedium

## 4. Ergebnisse

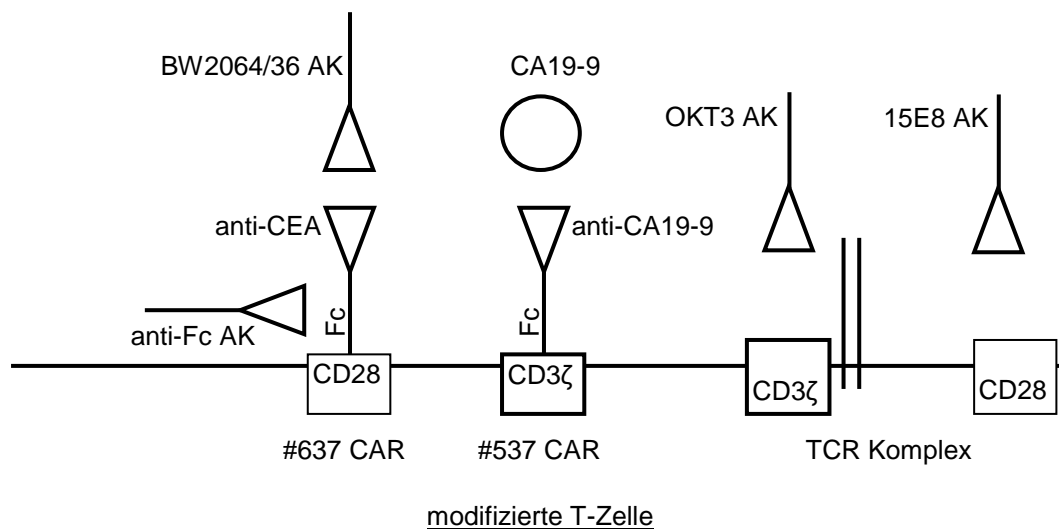
### 4.1 Funktionelle Komplementation koexprimierter chimärer Antigen-Rezeptoren

Um zu untersuchen, ob sich chimäre Antigen-Rezeptoren mit unterschiedlichen Signaldomänen in T-Lymphozyten komplementieren, wurden CAR ausgewählt, deren Bindedomänen über unterschiedliche Spezifität, z.B. für die Tumorantigene CEA oder ErbB2, verfügen und deren intrazelluläre Domänen verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren, z.B. durch die CD3 $\zeta$  Domäne oder die CD28 Domäne. Letztere können ihre Funktion nur in Verbindung mit dem Signal der CD3 Domäne vermitteln. Effektorfunktionen der exprimierenden T-Zelle nach Antigenbindung des CAR sollen Hinweise auf eine funktionelle Komplementation zwischen den CAR geben. Im Folgenden wurden Untersuchungen der Effektorfunktionen von T-Lymphozyten durchgeführt, welche CD28 CAR und CD3 $\zeta$  CAR koexprimierten.

#### 4.1.1 Komplementierung der CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$ und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28

Der CEA-spezifische CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 mit CD28 Signaldomäne vermittelt ausschließlich das CD28 Signal, das ohne CD3 Signal keine Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 induziert. Es sollte ermittelt werden, ob das CD3 Signal durch Koexpression des CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  komplementiert wird. Das Zielantigen für den BW431/26scFv-Fc-CD28 CAR #637 ist CEA, für den NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  CAR #537 BSM. Als Surrogatantigen für CEA diente der anti-BW431/26 idiotypische Antikörper BW2064/36. Mikrotiterplatten wurden mit dem Antikörper BW2064/36 sowie zusätzlich mit dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper, der die Fc-Domäne der CAR bindet, beschichtet. Zur Induktion der T-Zell-Aktivierung unabhängig vom CAR wurde mit den anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 beschichtet (Abb.10). Die Beschichtung mit einem IgG<sub>1</sub>-Antikörper irrelevanter Spezifität diente zur Kontrolle. Eine gleiche Anzahl von T-Zellen wurde zur Koexpression

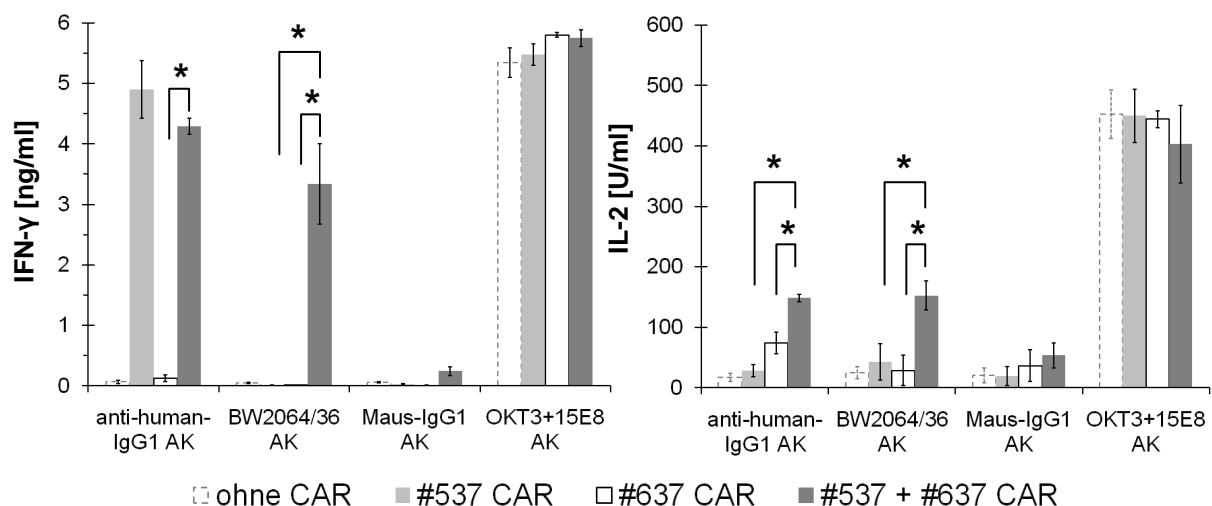
der CAR #537 und #637 retroviral kotransduziert und der Anteil CAR-tragender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Nicht modifizierte T-Lymphozyten und T-Lymphozyten, welche den CAR #537 oder #637 exprimierten, dienten zum Vergleich. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 im Kulturüberstand bestimmt (Abb.11). Dabei zeigt die IFN- $\gamma$  Sekretion die Aktivierung der CD3 $\zeta$  Kette, die IL-2-Sekretion die simultane Aktivierung der CD3 $\zeta$  Ketten und der CD28 Kette an.



**Abbildung 10: Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #537 und #637**

Bei T-Lymphozyten mit den CD28 und CD3 $\zeta$  CAR #637 und #537 führte die Aktivierung des CAR #637 mit dem BW2064/36 Antikörper zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Somit wurden in diesen T-Zellen die CD3 $\zeta$  Kette und die CD28 Kette aktiviert und deren Signale komplementiert. Durch gleichzeitige Antigen-unabhängige Aktivierung beider CAR mit dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper, der die CAR an der Brückendomäne unabhängig von der Antigen-Bindedomäne kreuzvernetzt, wurden ebenfalls IFN- $\gamma$  und IL-2 sezerniert. Eine gleichzeitige Kreuzvernetzung der koexprimierten CAR führt ebenfalls zur Komplementierung der CAR, wie die Bindung eines einzelnen Antigens. T-Lymphozyten mit dem CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden durch den CAR-spezifischen Antikörper anti-human-IgG<sub>1</sub> zur IFN- $\gamma$  Sekretion aktiviert. Bei Stimulation dieser Zellen mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36, der an die Einzelkettenbindedomäne BW431/26 bindet, wurde keine Zytokinsekretion

nachgewiesen. Daraus wird geschlossen, dass in den koexprimierenden T-Zellen die CD28 Kette in der Lage ist, die Komplementierung der Signale durch Aktivierung der CD3 $\zeta$  Kette zu erreichen. Anti-CEA CAR #637 exprimierende T-Zellen wurden weder durch den BW2064/36 Antikörper noch durch den anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper zur IFN- $\gamma$  oder IL-2 Sekretion induziert. Der CD28 CAR #637 kann das Signal der CD3 $\zeta$  und CD28 Kette komplementieren, wenn der CD3 $\zeta$  CAR #537 koexprimiert wird. Inkubation mit einem Kontroll-IgG<sub>1</sub>-Antikörper führte zu keiner Steigerung der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion. Somit war die T-Zell-Aktivierung Antigen-spezifisch. Alle T-Zellen wurden durch die agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper OKT3 und 15E8 zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion stimuliert und ließen sich deshalb gleichermaßen aktivieren. Die T-Zell-Aktivierung war CAR-vermittelt, weil nicht modifizierte T-Zellen nicht durch das Antigen CA19-9 aktiviert wurden.



**Abbildung 11: Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR**

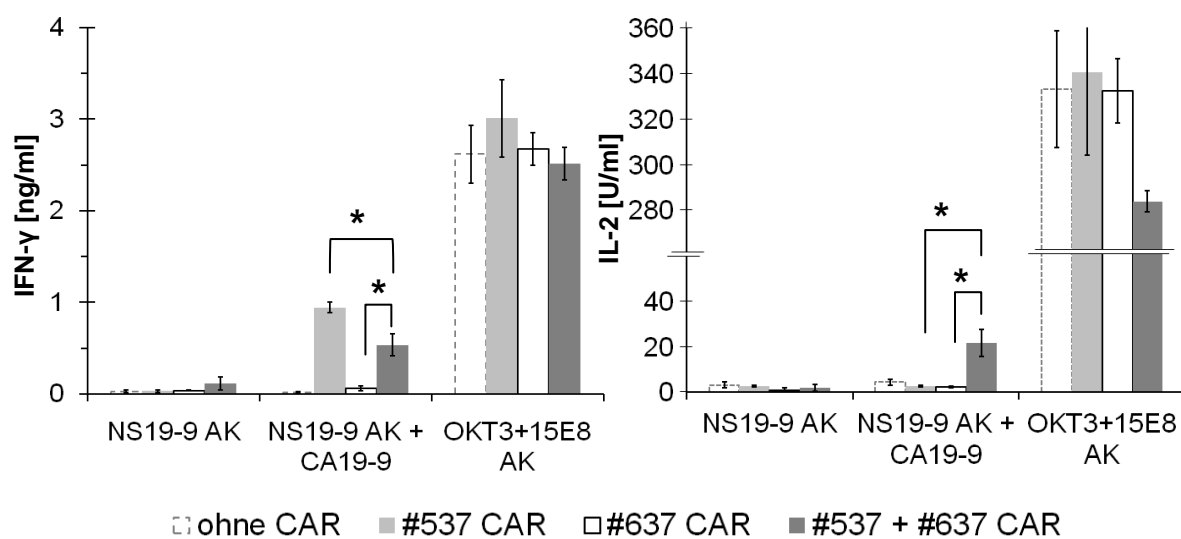
Die anti-CEA CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 mit CD28 Signaldomäne und anti-CA19-9 CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne wurden in T-Zellen einzeln exprimiert oder koexprimiert. Der Anteil CAR-tragender Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment 27,8% (#537), 36,1% (#637) und 40% (#537+#637). Mikrotiterplatten wurden mit den Antikörpern anti-human-IgG<sub>1</sub> (5 $\mu$ g/ml), BW2064/36 (5 $\mu$ g/ml), OKT3 (1 $\mu$ g/ml), 15E8 (5 $\mu$ g/ml) und Maus IgG<sub>1</sub> (1 $\mu$ g/ml) beschichtet. Pro Vertiefung wurden 3x10<sup>4</sup> CAR-tragende Zellen für 48h kultiviert. Als Vergleich wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In Kulturüberständen wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\*p  $\leq$  0,05).

Der CA19-9-spezifische CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  war nicht in der Lage, T-Zellen zur IL-2 Sekretion zu aktivieren. Es sollte überprüft werden, ob dieser CAR durch den koexprimierten CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 mit ausschließlicher CD28 Domäne funktionell komplementiert wird, so dass eine IL-2 Sekretion durch Stimulation mit dem Antigen CA19-9 erfolgt. Mikrotiterplatten wurden mit dem anti-CA19-9 Antikörper NS19-9 beschichtet und anschließend mit Zellkulturüberständen der humanen kolorektalen Karzinom-Linie H498 inkubiert. Diese Zellen sezernierten das Antigen CA19-9, welches durch den Antikörper NS19-9 gebunden wird. Als Kontrolle wurde mit den agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern OKT3 und 15E8 sowie mit dem anti-CA19-9 Antikörper ohne gebundenes CA19-9 beschichtet (Abb.10). T-Zellen wurden durch retroviralen Gentransfer mit den CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 ausgestattet und der Anteil CAR-tragender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anzahl CAR-tragender T-Zellen wurde normiert und die Zellen auf den beschichteten Platten inkubiert. Nicht modifizierte T-Zellen und T-Zellen, welche die CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  oder #637 BW431/-Fc-CD28 exprimierten, dienten zum Vergleich. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion im Kulturüberstand bestimmt (Abb.12).

T-Lymphozyten mit den anti-CEA-CD28 CAR #637 und anti-CA19-9-CD3 $\zeta$  CAR #537 sezernierten IFN- $\gamma$  und IL-2 durch Bindung an CA19-9. Der CAR #537 mit CD3 $\zeta$  Kette wurde durch den koexprimierten CAR #637 mit der CD28 Kette funktionell komplementiert. T-Lymphozyten mit dem CAR #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden nach Aktivierung durch CA19-9 zu einer Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert. Zur Induktion der IL-2 Sekretion war folglich die Koexpression des CAR #637 notwendig. Der Bindeantikörper NS19-9 löste keine T-Zell-Aktivierung aus, was die Antigen-Spezifität der funktionellen Komplementierung anzeigt. Stimulation mit CA19-9 führte bei T-Zellen mit dem anti-CEA-CD28 CAR #637 nicht zur IFN- $\gamma$  oder IL-2 Sekretion. Die Signaldomäne des CAR #637 wurde somit nur durch Koexpression des CAR #537 aktiviert. T-Zellen mit dem CA19-9-spezifischen CAR sezernierten mehr IFN- $\gamma$  als T-Zellen mit den koexprimierten CAR. Weil nicht modifizierte T-Zellen nicht durch CA19-9 aktiviert wurden, war die T-Zell-Aktivierung CAR-spezifisch. Alle T-Zellen ließen

sich gleichermaßen aktivieren, da sie durch die agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper OKT3 und 15E8 zur Sekretion der gleichen IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen stimuliert wurden.

Der CEA-spezifische CAR #637 mit CD28 Signaldomäne und der CA19-9-spezifische CAR #537 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne kann den jeweils anderen CAR funktionell komplementieren, wenn beide in T-Zellen koexprimiert werden. Die Bindung eines Antigens führt in T-Zellen mit der Koexpression dieser CAR zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion wie die Kostimulation durch beide Antigene.

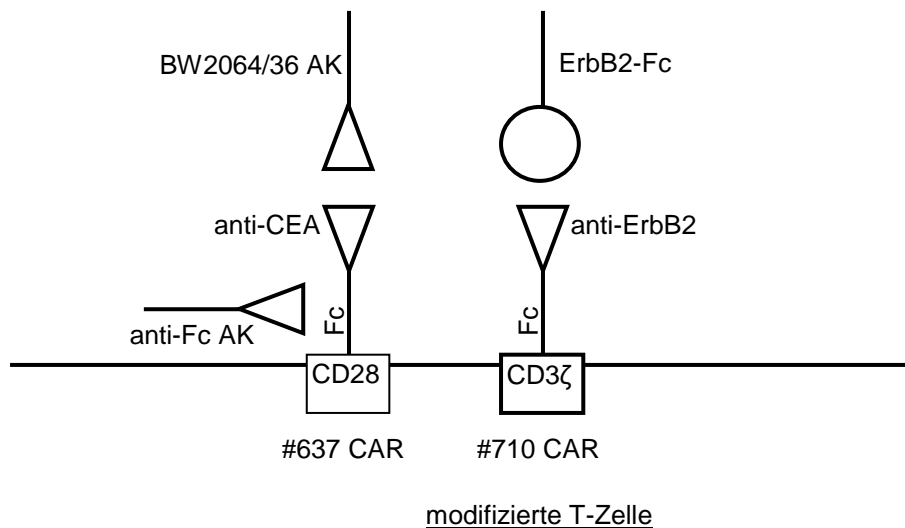


**Abbildung 12: Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR**

Die CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #537 NS19-9scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden in T-Zellen einzeln exprimiert und koexprimiert. Mikrotiterplatten wurden mit den Antikörpern NS-19-9 (5 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ), OKT3 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) und 15E8 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet und mit CA19-9 inkubiert. In einem repräsentativen Experiment betrug der Anteil CAR-tragender Zellen 27,8% (#537), 36,1% (#637) und 40% (#537+#637). Pro Vertiefung wurden  $2 \times 10^4$  CAR-tragende Zellen für 48h kultiviert. Als Vergleich wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In Kulturüberständen wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2 Komplementierung der CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28

Es sollte in diesem Experiment ermittelt werden, ob der anti-ErbB2 CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mit dem anti-CEA CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 funktionell komplementiert. Damit sollte einerseits überprüft werden, ob die zuvor beobachtete funktionelle Komplementation auch für andere CAR Spezifitäten zutrifft. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/36, dem ErbB2-Fc Fusionsprotein, dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper, der die extrazelluläre Fc-Domäne der CAR bindet, oder als Kontrolle mit einem IgG<sub>1</sub>-Antikörper irrelevanter Spezifität beschichtet (Abb.13). Bei T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 wurde der Anteil CAR-tragender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die gleiche Anzahl CAR-tragender T-Zellen wurde auf den beschichteten Platten inkubiert. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 im Kulturüberstand bestimmt (Abb.14).



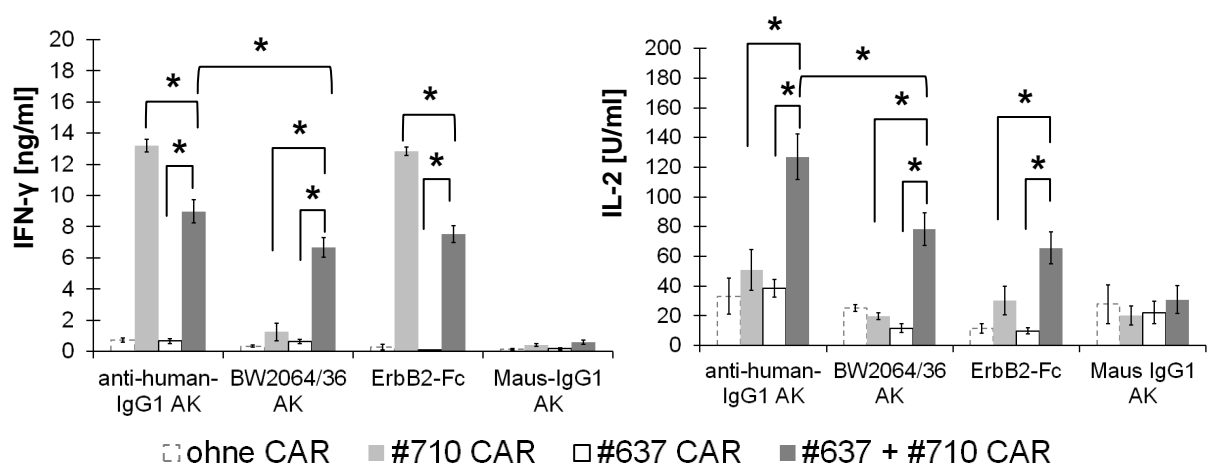
**Abbildung 13: Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #637 und #710**

T-Lymphozyten mit den koexprimierten anti-CEA-CD28 CAR #637 und anti-ErbB2-CD3 $\zeta$  CAR #710 sezernierten durch Stimulation mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36, der an die CEA Bindedomäne bindet, IFN-

$\gamma$  und IL-2. Durch die Koexpression des CAR #710 wurden T-Zellen aktiviert und die Signale der CD28 und CD3 $\zeta$  Ketten komplementiert. T-Zellen mit der Koexpression dieser beiden CAR wurden durch das ErbB2-Fc Fusionsprotein, welches den CD3 $\zeta$  CAR #710 kreuzvernetzt, ebenfalls zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion aktiviert. Damit verursachte die zusätzliche Expression des anti-CEA-CD28 CAR #637 eine Vervollständigung der beiden CAR-Signale. Diese wurde ebenfalls durch die gleichzeitige Kreuzvernetzung beider CAR mit dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper erreicht, angezeigt durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Durch die Kostimulation beider CAR mittels des Fc-spezifischen Antikörpers wurde eine höhere Aktivierung bewirkt, als über die Komplementation mit dem BW2064/36 Antikörper oder dem ErbB2-Fc Fusionsprotein zu beobachten war. T-Lymphozyten mit dem CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden nach Aktivierung durch den anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper und durch das ErbB2-Fc Fusionsprotein zu einer Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert. Dies bedeutet, dass die Sekretion von IL-2 durch die Koexpression des CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 hervorgerufen wurde. Durch Stimulation mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/36, der an die Bindedomäne BW431/26 des anti-CEA CAR bindet, wurde keine Zytokinsekretion bei T-Zellen mit dem CAR #710 nachgewiesen. Die Komplementierung des CD3 $\zeta$  Signals wurde demnach durch Kreuzvernetzung des koexprimierten CD28 CAR #637 mit diesem Antikörper verursacht. T-Zellen, welche den CD28 CAR #637 exprimierten, sezernierten weder IFN- $\gamma$  noch IL-2. Die Bindung des anti-idiotypischen Antikörpers BW2064/36 führte bei koexprimierenden T-Zellen zur Aktivierung der CD3 $\zeta$  Kette des CAR #710 durch den CAR #637 und damit zu Komplementation der CAR-Signale. Die T-Zell-Aktivierung war Antigen-spezifisch, da die Inkubation mit einem Kontroll-IgG<sub>1</sub>-Antikörper zu keiner Steigerung der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion führte. Alle T-Zellen ließen sich durch die agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper OKT3 und 15E8 zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion stimulieren und damit gleichermaßen aktivieren. Nicht modifizierte T-Zellen wurden weder durch das Fusionsprotein ErbB2-Fc noch durch den BW2064/36 Antikörper zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert, so dass die T-Zell-Aktivierung CAR-vermittelt war.



In T-Zellen mit der Koexpression der CEA-spezifischen CAR #637 mit CD28 Signaldomäne und der ErbB2-spezifischen CAR #710 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne kann die Kreuzvernetzung eines CAR den jeweils anderen CAR aktivieren und eine funktionelle Komplementierung verursachen. Durch die Kostimulation beider CAR werden T-Zellen jedoch stärker zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion aktiviert als durch die Bindung eines CAR an sein Antigen. Die Koexpression eines CD3 $\zeta$  CAR mit einem CD28 CAR führt zu einer verminderten Aktivierung der T-Zellen durch den CD3 $\zeta$ -CAR.

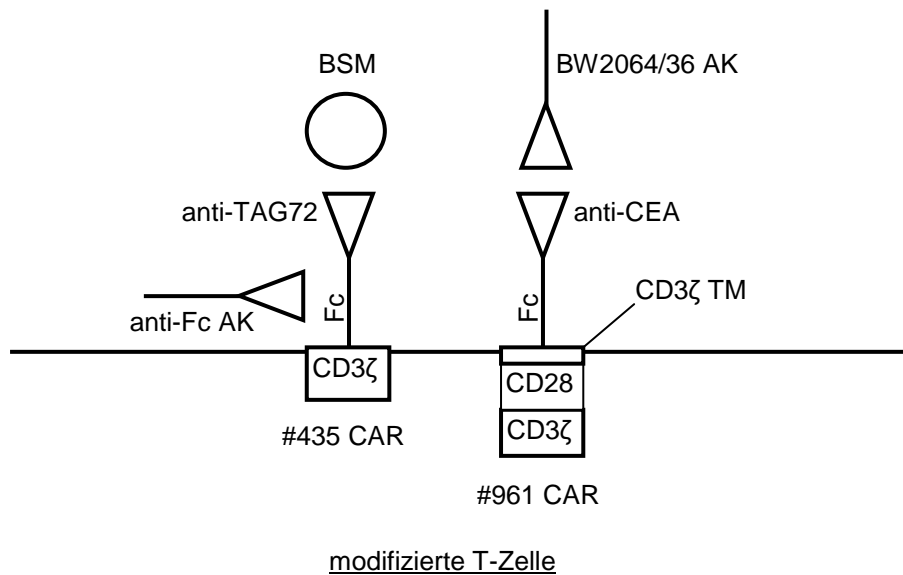


**Abbildung 14: Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR**

Die anti-CEA CAR #637 BW431/26scFv-Fc-CD28 mit CD28 Signaldomäne und die anti-ErbB2-CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne wurden in T-Zellen einzeln exprimiert oder koexprimiert. In einem repräsentativen Experiment betrug der Anteil CAR-tragender T-Zellen 39,9% (#537), 32% (#637) und 29,6% (#537+#637). Mikrotiterplatten wurden mit den Antikörpern anti-human-IgG<sub>1</sub> (5 $\mu$ g/ml), BW2064/36 (5 $\mu$ g/ml) und Maus-IgG<sub>1</sub> (1 $\mu$ g/ml) sowie dem Fusionsprotein ErbB2-Fc (1 $\mu$ g/ml) beschichtet. Pro Vertiefung wurden 5x10<sup>4</sup> CAR-tragende Zellen für 72h kultiviert. Als Vergleich wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In Kulturüberständen wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\*p  $\leq$  0,05).

#### 4.1.3 Komplementierung der CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3 $\zeta$ und #961 BW431/26scFv-Fc-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$

In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die Verwendung einer CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne mit zusätzlichen Dimerisierungsstellen und eine fusionierte CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne die zuvor beobachtete Komplementierung zweier koexprimierter CAR verstärkt. Damit sollte die schwache Immunogenität eines stark glykosylierten Antigens kompensiert werden. In diesem Experiment wurden der TAG-72-spezifische CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne mit dem CEA-spezifischen CAR #961 BW431/26scFv-Fc-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  mit CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne und fusionierter CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne koexprimiert. Als Surrogatantigen für den TAG-72-spezifischen CAR #435 wurde BSM eingesetzt. Mikrotiterplatten wurden mit dem idiotypischen Antikörper BW2064/36, der an den CAR #961 bindet, und bovinem submaxillarem Mucin I-S, welches eine hohe Homologie zu dem spezifischen Antigen TAG-72 aufweist und an den CAR #435 bindet, beschichtet. Eine Beschichtung mit dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper sowie mit einem IgG<sub>1</sub>-Antikörper irrelevanter Spezifität wurde als Kontrolle durchgeführt (Abb.15). Aktivierte T-Zellen wurden durch retroviralen Gentransfer mit den CAR #435 und #961 ausgestattet und der Anteil CAR-tragender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Eine gleiche Anzahl CAR-tragender T-Zellen wurde auf den beschichteten Platten inkubiert. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion im Kulturüberstand bestimmt (Abb.16).

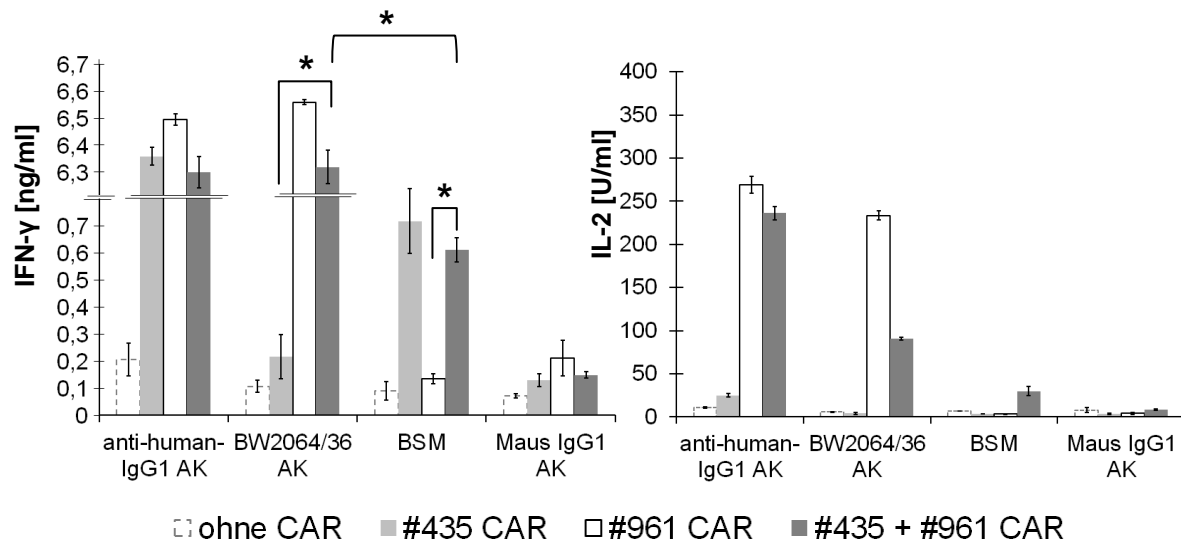


**Abbildung 15: Schema der Aktivierung modifizierter T-Zellen mit den CAR #435 und #961**

Bei T-Lymphozyten mit den beiden CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #961 BW431/26scFv-Fc-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  führte die Aktivierung des CAR #961 mit dem BW2064/36 Antikörper zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Somit wurden in diesen T-Zellen die CD3 $\zeta$  Kette und die CD28 Kette der fusionierten Signaldomäne des CAR #961 aktiviert. CAR mit fusionierter CD3 $\zeta$  und CD28 Kette werden durch Koexpression eines CAR mit ausschließlicher CD3 $\zeta$  Domäne nicht komplementiert. Eine Komplementation mit der Signalkette des CAR #435 anhand einer IFN- $\gamma$  Sekretion kann nicht identifiziert werden. Die Kreuzvernetzung des CD3 $\zeta$  CAR #435 durch BSM bewirkte in T-Zellen, die den CAR #961 koexprimierten, die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Die Bindung von BSM führte demnach zu einer Aktivierung der fusionierten CD3 $\zeta$  und CD28 Kette und somit zur Komplementation der Signale. Durch Antigen-unabhängige Kostimulation der beiden CAR mit dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper, der die Fc-Domäne der CAR kreuzvernetzt, wurden ebenfalls IFN- $\gamma$  und IL-2 sezerniert. Da der CAR #961 mit einer komplementierenden CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne ausgestattet ist, wurden T-Zellen durch den anti-human-IgG<sub>1</sub> und den BW2064/36 Antikörper gleichermaßen aktiviert. Die Aktivierung zur IL-2 Sekretion wurde bei T-Zellen mit den koexprimierten CAR #435 und #961 bei Kreuzvernetzung der Brückendomäne beider CAR im Vergleich zur Bindung des BW2064/36 Antikörpers gesteigert. Die ermittelten IFN- $\gamma$  und IL-2

Konzentrationen nach Stimulation mit BSM waren im Vergleich zur Stimulation mit dem BW2064/36 Antikörper und dem anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper deutlich geringer. Diese Beobachtung war Antigen-spezifisch, da dieses sowohl für T-Zellen mit dem CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3 $\zeta$  als auch für T-Zellen mit dem koexprimierten #961 BW431/26scFv-Fc-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  zutraf. Da beide CAR in gleicher Dichte auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert wurden, bewirkt BSM demnach eine weniger starke Kreuzvernetzung der CAR als der BW2064/36 und der anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper. Im Gegensatz zu der zuvor beobachteten verringerten Aktivierung des CD3 $\zeta$  CAR bei Koexpression eines CD28 CAR war in dieser Untersuchung die Sekretion von IFN- $\gamma$  nicht herabgesetzt. Das höhere Assoziationsvermögen der CAR durch die Verwendung einer CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne in Kombination mit der fusionierten CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne des CAR #961 steigerte die funktionelle Komplementationeffizienz. T-Zellen mit der Expression des CAR #435 wurden durch den Antikörper BW2064/36 nicht zur Zytokinsekretion aktiviert. Um die CAR-Signale zu komplementieren, war die Koexpression des CEA-spezifischen CAR #961 erforderlich. Die T-Zell-Aktivierung war Antigen-spezifisch, da die Inkubation mit einem Kontroll-IgG<sub>1</sub>-Antikörper nicht zur Steigerung der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion führte. Alle T-Zellen wurden durch die agonistischen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper OKT3 und 15E8 zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion stimuliert und konnten gleichermaßen aktiviert werden. Weil lediglich CAR-exprimierende T-Zellen durch BSM, den BW2064/36 Antikörper und den anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper aktiviert wurden, jedoch nicht unmodifizierte T-Zellen, war die Stimulation CAR-spezifisch.

Die Koexpression des CEA-spezifischen CAR #961 mit fusionierter CD3 $\zeta$  und CD28 Signalkette mit dem TAG72-spezifischen CAR #435 mit CD3 $\zeta$  Kette führt zu einer Komplementation beider CAR-Signale. Die Bindung von BSM führt in T-Zellen mit der Koexpression dieser CAR zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion wie es bei der Kostimulation durch beide Antigene bewirkt wird. Durch Verwendung der CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne und der fusionierten CD3 $\zeta$  und CD28 Signalkette wird die Kooperationseffizienz gegenüber der Koexpression eines CD28 Signal CAR gesteigert.



**Abbildung 16: Zytokinsekretion von T-Zellen mit koexprimierten CAR**

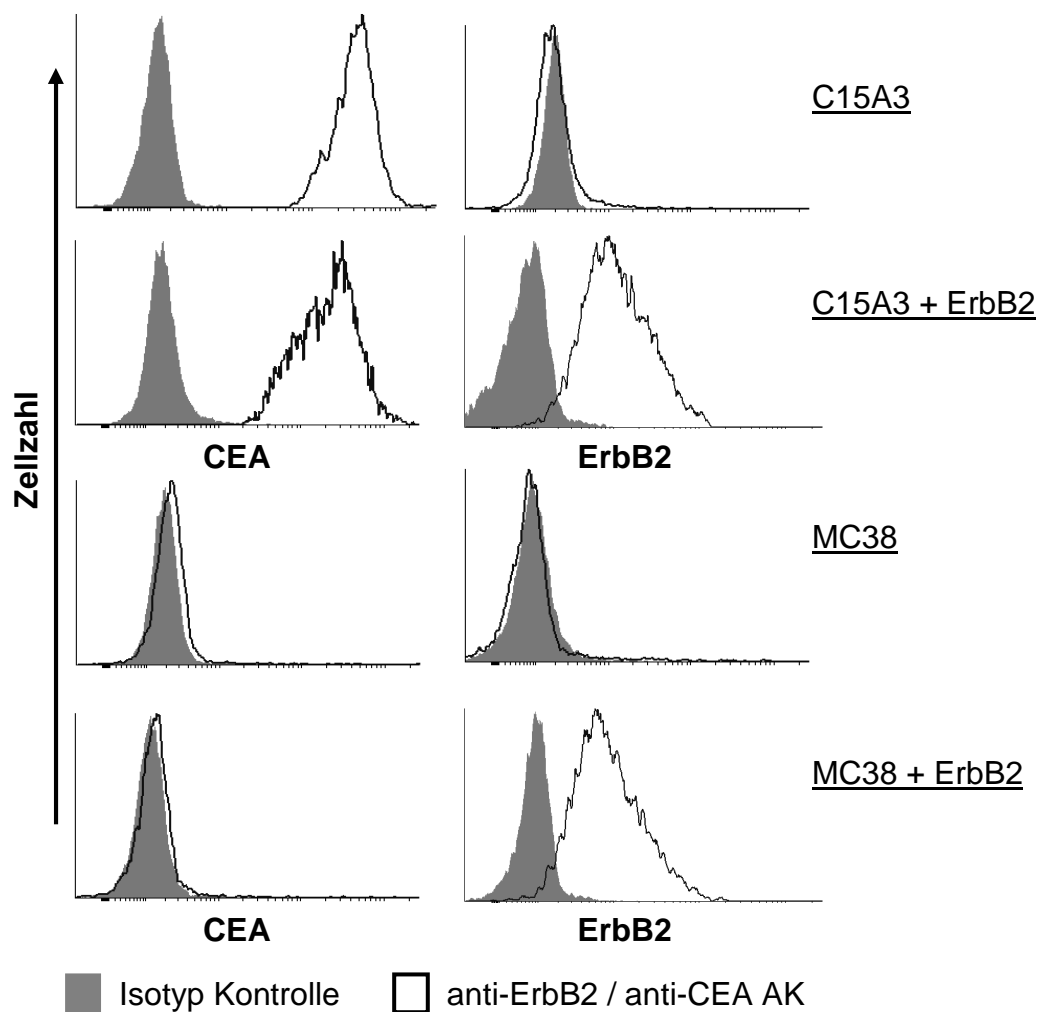
Der anti-CEA CAR #961 BW431/26scFv-Fc-CD3ζTM-CD28-CD3ζ mit fusionierter CD28/CD3ζ Signaldomäne sowie CD3ζ Transmembrandomäne und der anti-TAG72 CAR #435 CC49scFv-Fc-CD3ζ mit CD3ζ Signaldomäne wurden in T-Zellen einzeln oder in Kombination exprimiert. Der Anteil CAR-tragender Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment 64,1% (#435), 10,8% (#961) und 28,1% (#435+#961). Mikrotiterplatten wurden mit den Antikörpern anti-human-IgG<sub>1</sub> (5μg/ml), BW2064/36 (5μg/ml) und Maus-IgG<sub>1</sub> (1μg/ml) sowie BSM (100μg/ml) beschichtet. Pro Vertiefung wurden 2x10<sup>4</sup> CAR-tragende Zellen für 72h kultiviert. Als Vergleich wurden nicht transduzierte T-Zellen verwendet. In den Kulturüberständen wurden die IFN-γ und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\*p ≤ 0,05).

## 4.2 Generierung ErbB2 und CEA exprimierender Tumorzelllinien

Die Antigen-vermittelte T-Zell-Aktivierung soll anhand Antigen-exprimierender Tumorzellen überprüft werden. Um den gleichen genetischen Hintergrund und eine gleiche Sensitivität zur T-Zell-vermittelten Lyse zu gewährleisten, wurden Transfektanten der Tumorzelllinien MC38 und C15A3 zur Expression von ErbB2 und/oder CEA generiert. Mit der murinen Tumorzelllinie C15A3 stand bereits ein MC38 Subtyp zur Verfügung, der das humane CEA Antigen stabil exprimiert. Aus den Zelllinien MC38 und C15A3 wurden mittels stabiler Transfektion ErbB2<sup>+</sup> Transfektanten erzeugt. Dazu wurden MC38 und C15A3 Zellen jeweils mit dem ErbB2 Expressionsplasmid pCMV5-ErbB2 (#1066) sowie dem Hygromycin-B-Resistenz vermittelnden Plasmid pHyg (#145) kotransfiziert. Die Antigene ErbB2 und CEA wurden durchflusszytometrisch detektiert (Abb.17).

Tumorzellen der Linie MC38 exprimierten nach stabiler Transfektion mit dem Expressionsplasmid #1066 humanes ErbB2, jedoch kein CEA. Mit dem Plasmid #1066 transfizierte C15A3 Zellen exprimierten ErbB2 und CEA. Die Expressionsdichte des humanen ErbB2 war in transfizierten MC38 und C15A3 Zellen gleich. Nicht transfizierte MC38 Zellen exprimierten weder ErbB2 noch CEA, wogegen nicht transfizierte C15A3 Zellen CEA exprimierten.

Es wurden erfolgreich Tumorzellen generiert, die bei gleichem genetischem Hintergrund eine stabile Expression des humanen Tumorantigens ErbB2 aufweisen.



**Abbildung 17: Zellklone der Linien MC38 und C15A3 mit stabiler ErbB2-Expression**

Zur Expression des humanen Tumorantigens ErbB2 wurden Zellen der Linien MC38 und C15A3 stabil mit den Expressionsvektoren #1066 pCMV5-ErbB2 und #145 pHyg transfiziert. Die Selektion erfolgte unter 50µg/ml Hygromycin B. Die Durchflusszytometrische Analyse exemplarischer Zellklone der Linien MC38 und C15A3 zeigt die Expression von ErbB2 und CEA. Die ausgefüllten Kurven stellen jeweils die Markierungen mit dem Fluorochromgekoppelten Isotyp-Kontrollantikörper dar. Die schwarzen Linien entsprechen den Markierungen mit dem primären Maus anti-ErbB2 Antikörper (2µg/ml) und dem sekundären, PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (2,5µg/ml) bzw. dem primären anti-CEA-Fc Fusionsprotein (50µl Kulturüberstand) und dem sekundären, FITC-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper (5µg/ml) dar.

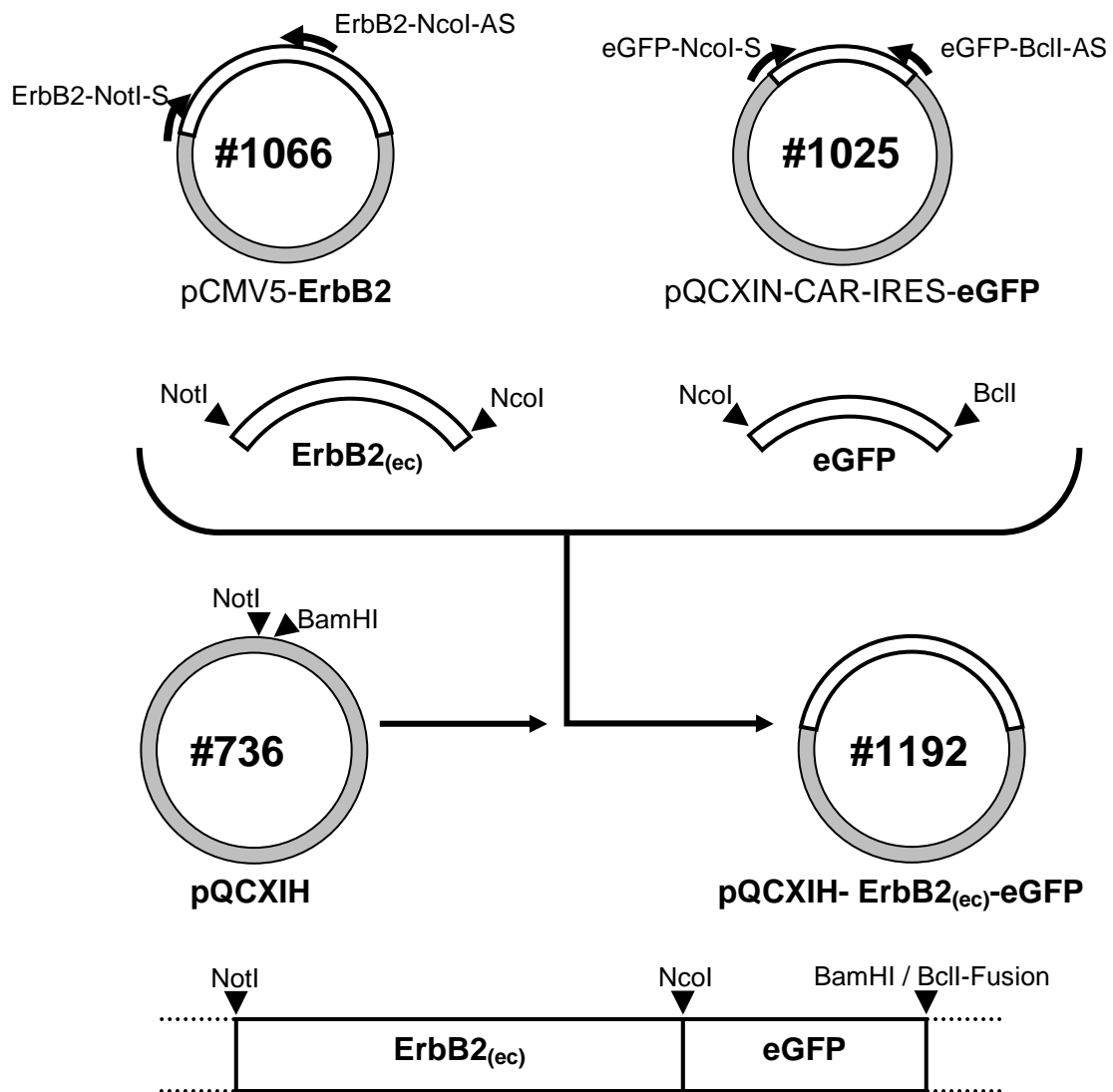
### 4.3 Klonierung des ErbB2-eGFP Expressionsvektors

Der Nachweis gleichzeitiger Expression zweier CAR nach Kotransduktion ist zur Identifikation der jeweiligen CAR auf der Oberfläche von T-Lymphozyten notwendig. Dies erfolgte durch die Detektion der unterschiedlichen Bindedomänen unter Verwendung der Idiotyp Antikörper BW2064/36 oder BW2064/399, welche die Einzelkettenbindedomäne der anti-CEA CAR spezifisch bindet. Um die ErbB2-Bindedomäne C6-B1D2 der anti-ErbB2-CAR zu identifizieren, wurde ein eGFP-gekoppeltes ErbB2-Protein generiert. Dieses Fusionsprotein wurde von geeigneten Wirtszellen nach Transfektion in den Kulturüberstand sezerniert. Im Folgenden werden die Schritte zur Klonierung des Fusionsproteins beschrieben (Abb.18).

Aus dem ErbB2 Expressionsplasmid (#1066) wurde mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „ErbB2-NotI-S“, welches mit der DNS des ErbB2 Signalpeptids hybridisiert und des 3'-Oligonukleotids „ErbB2-NcoI-AS“, welches mit der DNS der extrazellulären ErbB2-Domäne hybridisiert, DNS für den extrazellulären Teil von ErbB2 mit einer PCR amplifiziert. Mit den verwendeten Oligonukleotiden wurden Restriktionsschnittstellen eingefügt, die eine Ligation sowohl mit der für das eGFP Protein kodierenden DNS als auch mit dem retroviralen Expressionsplasmid pQCXIH ermöglichen. Die eGFP DNS wurde mittels PCR aus dem Expressionsvektor #1025 amplifiziert. Dazu wurden das 5'-Oligonukleotid „eGFP-NcoI-S“, welches mit dem 5'-Ende der eGFP DNS hybridisiert und der 3'-Oligonukleotids „eGFP-BclI-AS“, das mit dem 3'-Ende der eGFP DNS hybridisiert, verwendet. Mit diesen Oligonukleotiden wurden die Restriktionsschnittstellen eingefügt, welche eine Ligation sowohl mit der DNS des extrazellulären ErbB2 Proteinfragments als auch mit dem retroviralen Expressionsplasmid pQCXIH ermöglichen. Nach Restriktionsspaltung der isolierten PCR-Fragmente mit dem Enzym NcoI wurde die DNS für den extrazellulären ErbB2 Teil an den überlappenden kohäsiven Enden mit der DNS für das eGFP verknüpft. Die Restriktionsspaltung an den 5'- und 3'-Enden der fusionierten DNS mit den Enzymen NotI und BclI ermöglichte zudem die Ligation in den mit NotI und BamHI gespaltenen retroviralen Expressionsvektor pQCXIH (#736). Das neu generierte Konstrukt wurde durch Sequenzierung verifiziert und eignet sich sowohl für den retroviralen Gentransfer als auch durch



die Bereitstellung einer Hygromycin-Resistenz zur Selektion transduzierter Zellen.

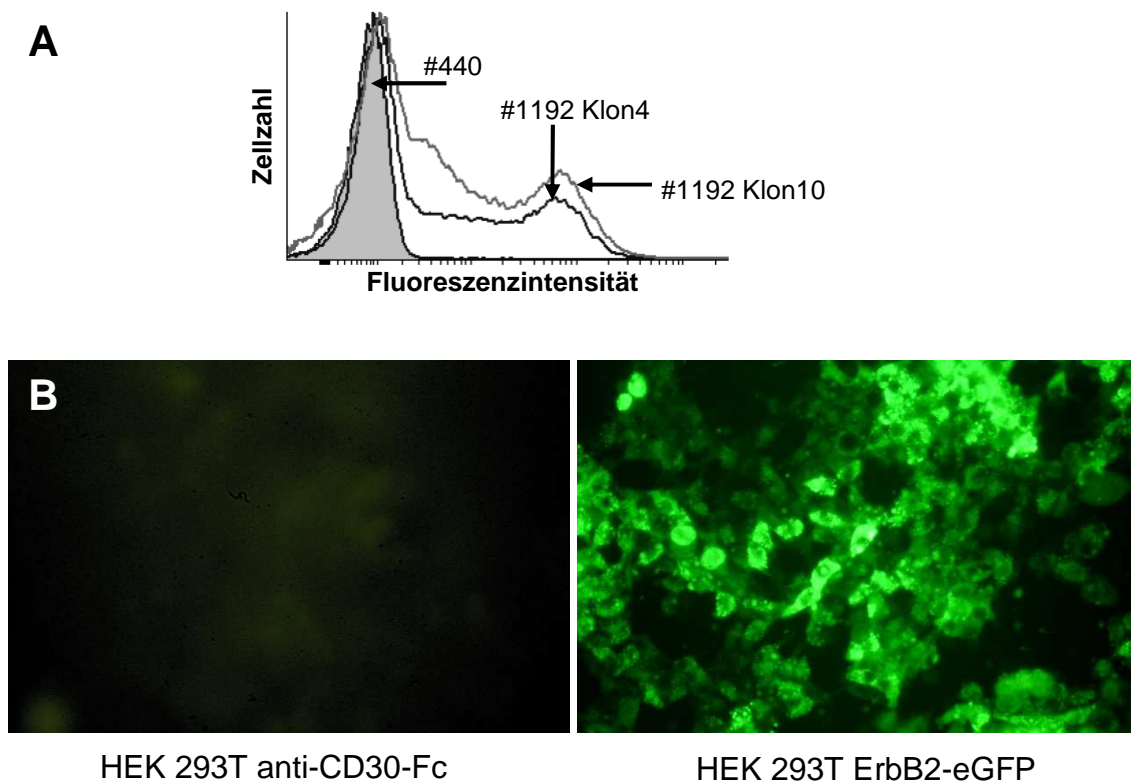


**Abbildung 18: Generierung der Expressionskassette für das Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP**

Die ErbB2<sub>(ec)</sub> DNS für die extrazelluläre Domäne des ErbB2 und die eGFP DNS wurden mittels PCR amplifiziert und die DNS-Fragmente mit NotI und NcoI bzw. NcoI und BclI gespalten. Die Fragmente wurden gereinigt und in das mit NotI und BamHI gespaltene Plasmid pQCXIN (#736) inseriert. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassette befindet sich im Anhang (S.160).

#### 4.4 Charakterisierung des Proteins ErbB2-eGFP

Das Protein ErbB2-eGFP wurde nach retroviraler Transduktion in 293T Zellen produziert. HEK 293T Zellen, die mit DNS für das Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP transduziert wurden, exprimierten das Protein eGFP, erkenntlich an der Verschiebung der Fluoreszenzintensität der Wellenlänge 509 nm (Abb.19) und im Fluoreszenzmikroskop leuchtenden Zellen (Abb.20). Dagegen wurde bei Zellen, welche das Fusionsprotein #440 anti-CD30-Fc exprimierten, keine eGFP Expression ermittelt. Zellklon 10 zeigte die höchste Fluoreszenzverschiebung und wurde in anschließenden Experimenten verwendet.



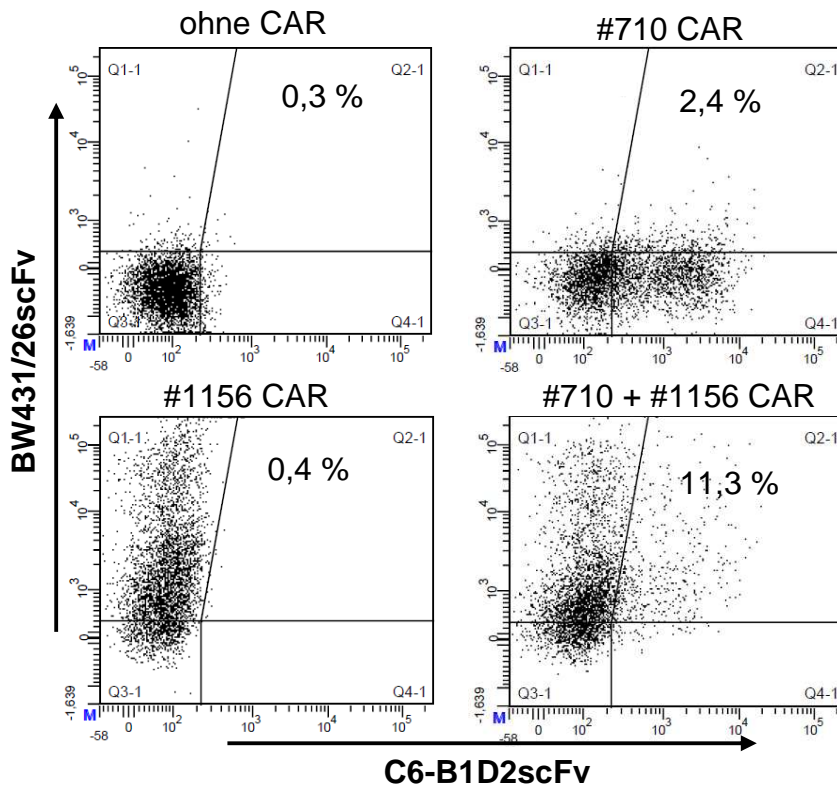
**Abbildung 19: Expression des ErbB2-eGFP Proteins in 293T Zellen**

Jeweils  $2 \times 10^6$  293T wurden zur Expression des Fusionsproteins #1192 ErbB2-eGFP transduziert und (A) durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der eGFP Domäne erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 509 nm unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Es wurden zwei Zellklone untersucht. Als Vergleich dienten 293T Zellen, die mit DNS für das Fusionsprotein CD30-Fc (#440) transduziert waren. Transduzierte 293T wurden unter Hygromycin B Selektion (100µg/ml) für 14 Tage kultiviert und (B) im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Anregungsfilter 330-385 nm). Als Vergleich dienten 293T Zellen, die mit DNS für das Fusionsprotein anti-CD30-Fc transduziert waren.

## 4.5 Nachweis der CAR Koexpression

Der Nachweis koexprimierter CAR erfordert die Identifikation individueller CAR auf der Oberfläche der T-Zellen. Aus diesem Grund wurden zur Unterscheidung der anti-CEA und anti-ErbB2 CAR die jeweiligen Einzelkettenbindedomänen nachgewiesen. Dazu wurden aktivierte kotransduzierte T-Zellen mit dem anti-idiotypischen Antikörper BW2064/399 und dem PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper zur Detektion des anti-CEA CAR inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation dem Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP, welches die anti-ErbB2 Domäne C6-B1D2 bindet. T-Lymphozyten wurden mit dem APC-gekoppelten Mausantikörper anti-human-CD3 markiert. Als Vergleich dienten Zellen, welche die CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 separat exprimierten. Zur Ermittlung der Frequenz CAR-tragender Zellen wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet (Abb.20).

Die Markierung der anti-CEA Bindedomäne BW431/26 in T-Zellen mit dem CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 oder der gleichzeitigen Expression der CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #1156 wurde nachgewiesen. Das Fusionsprotein ErbB2-eGFP konnte die anti-ErbB2-Domäne spezifisch binden und verstärkte die FITC-vermittelte Fluoreszenz von T-Zellen mit dem anti-ErbB2 CAR #710 sowie von T-Zellen mit der gleichzeitigen Expression der CAR #710 und #1156. T-Zellen mit dem anti-CEA CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 wurden nicht durch das Fusionsprotein ErbB2-eGFP detektiert. Die Analyse transduzierter und kotransduzierter Zellen im Hinblick auf die gleichzeitige Expression der zwei verschiedenen Einzelkettenbindedomänen ergab einen Anteil von 11% koexprimierender T-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der T-Zellen.



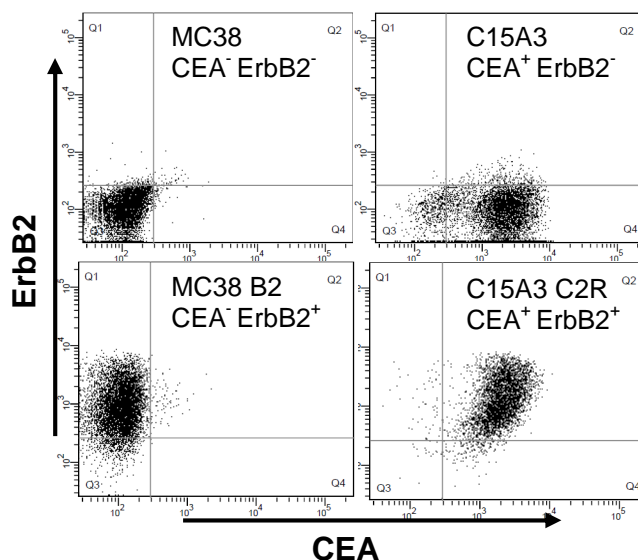
**Abbildung 20: CAR Koexpression in T-Zellen**

Die anti-CEA CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und anti-ErbB2 CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden in T-Zellen einzeln oder simultan exprimiert. In T-Zellen, die mit dem APC-gekoppelten anti-human-CD3 Antikörper (5 $\mu$ l) markiert waren, erfolgte der Nachweis der anti-CEA Bindedomäne BW431/26 durch Markierung mit dem primären BW2064/399 Antikörper (10 $\mu$ g/ml) und dem PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Sekundärantikörper (2,5 $\mu$ g/ml). Anschließend wurde die anti-ErbB2 Bindedomäne C6-B1D2 durch ErbB2-eGFP (200 $\mu$ l Kulturüberstände) markiert. Der Anteil der CAR koexprimierenden T-Lymphozyten betrug 11%.

## 4.6 Zell-vermittelte Aktivierung koexprimierter CAR

### 4.6.1 Antigen-spezifische Zytolyse von Tumorzellen

Im folgenden Experiment wurde die Aktivierung der T-Zellen mit Koexpression der CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 durch Kontakt mit Tumorzellen untersucht. Einerseits kann der CAR #1156 T-Zellen nicht eigenständig zu Effektorfunktionen aktivieren und ist auf die primäre Aktivierung durch einen CAR mit CD3 $\zeta$ -Signaldomäne angewiesen. Andererseits kann der CAR #710 T-Zellen nicht zu Kostimulation-abhängigen Effektorfunktionen, wie z.B. der IL-2 Sekretion, aktivieren. Anhand der CAR-vermittelten Zytotoxizität wurde untersucht, in wie weit eine funktionelle Komplementierung der jeweiligen Effektorfunktionen erfolgt. Aktivierte T-Zellen wurden zur Koexpression der CAR kotransduziert. Als Vergleich wurden die jeweiligen CAR einzeln exprimiert. Nachfolgend wurde die gleiche Anzahl CAR-tragender T-Zellen zusammen mit Tumorzellen kokultiviert. Die Tumorzellen exprimierten CEA und/oder ErbB2, wie mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde (Abb.21).



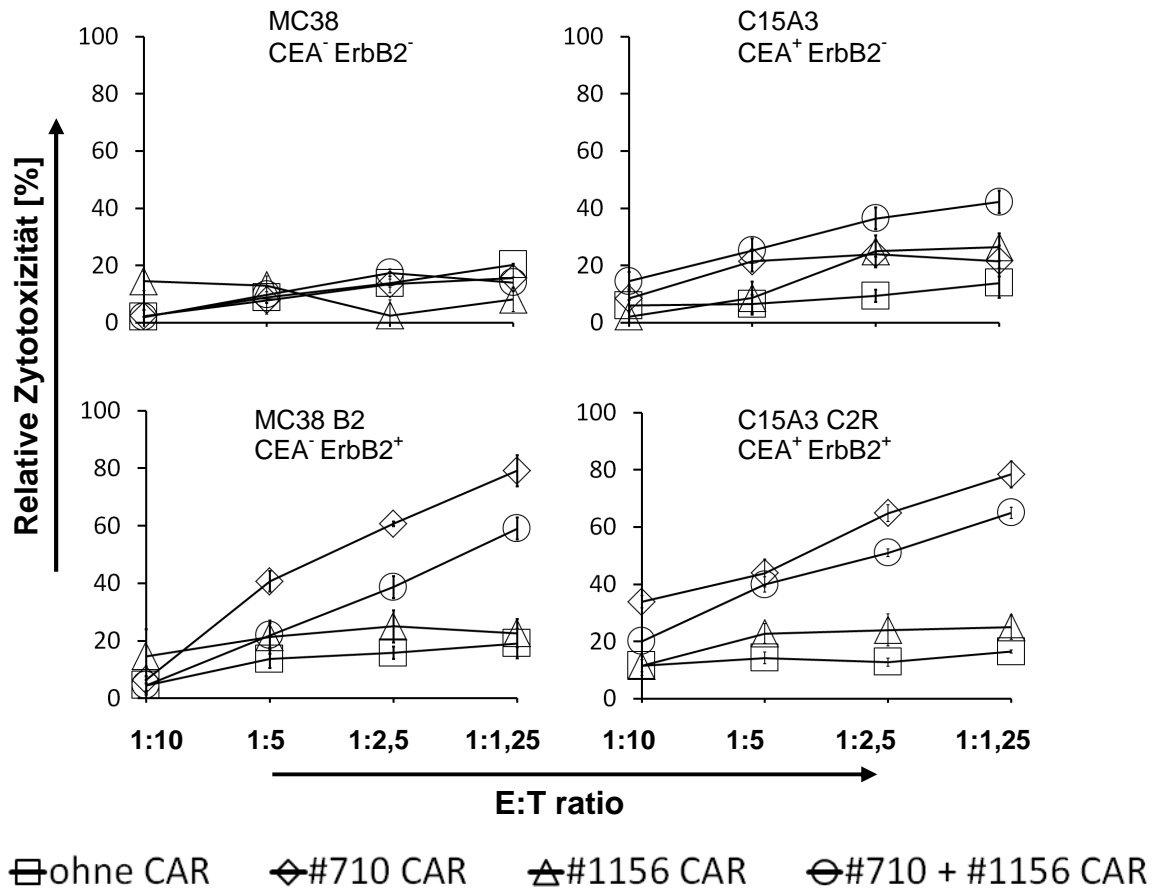
**Abbildung 21: CEA und ErbB2 Expression der Tumorzellen MC38 und C15A3**

Durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellen: alle Zellen besitzen den genetischen Hintergrund der Linie MC38, die durch Transfektion zur Expression von CEA und/oder ErbB2 modifiziert wurde. Die CEA Expression wurde durch Inkubation mit dem Fusionsprotein SCA431scFv-Fc (#978; 50  $\mu$ l Kulturüberstand) und anschließender Detektion mit dem FITC-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> (5  $\mu$ g/ml) Antikörper bestimmt. Der Nachweis der ErbB2 Expression erfolgte nach Bindung des anti-human-ErbB2 Antikörpers (2  $\mu$ g/ml) und Detektion durch den PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (2,5  $\mu$ g/ml).

Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der CAR-vermittelten Zytotoxizität durch einen XTT-basierenden Viabilitätstests bestimmt (Abb.22).

T-Lymphozyten mit der Koexpression der anti-CEA CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und anti-ErbB2 CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden durch Bindung an CEA<sup>+</sup> und ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen konzentrationsabhängig zur Zytolyse aktiviert. Tumorzellen, die jeweils ErbB2 oder CEA exprimierten, wurden ebenfalls durch die CAR koexprimierenden T-Zellen lysiert. Daraus wird geschlossen, dass die Koexpression zweier CAR die Selektivität der T-Zellen für die Tumorzellen erhöht. Da T-Zellen mit der Koexpression der anti-CEA CAR #1156 mit CD28 Signaldomäne und anti-ErbB2-CAR #710 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne CEA exprimierenden Tumorzellen lysierten, wurden die Signale der beiden CAR komplementiert. T-Lymphozyten mit dem anti-ErbB2 CAR #710 lysierten ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen, jedoch keine Tumorzellen, die ausschließlich CEA exprimieren. Die Komplementation in T-Zellen mit beiden CAR wurde demnach durch die Aktivierung des anti-CEA CAR #1156 verursacht. Weil T-Lymphozyten mit dem CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 keine Tumorzellen lysierten, wurde die T-Zell-Aktivierung in koexprimierenden T-Zellen durch die Koexpression des anti-ErbB2 CAR #710 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne komplementiert. Die relative Zytotoxizität gegenüber ErbB2<sup>+</sup> Zielzellen war bei T-Zellen mit der Koexpression der CAR #1156 und #710 im Vergleich zu T-Lymphozyten, welche den anti-ErbB2-CAR #710 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne exprimierten, verringert. Nicht modifizierte T-Zellen lysierten keine Tumorzellen, was die Spezifität der CAR-vermittelten Zytolyse anzeigt. Die CEA<sup>-</sup> und ErbB2<sup>-</sup> Zelllinie MC38 wurde durch keine CAR-exprimierenden T-Zellen lysiert.

T-Zellen, welche CAR mit CD28 Signaldomäne und CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne koexprimieren, komplementieren durch Kontakt mit Antigen-exprimierenden Tumorzellen funktionell. Die Komplementation durch Tumorzellen mit beiden Antigenen ist jedoch effizienter. Die Koexpression solcher CAR mit unterschiedlicher Spezifität erhöht die Selektivität gegenüber Tumorzellen mit Antigenmuster entscheidend.



**Abbildung 22: Antigen-spezifische Zytolyse durch funktionelle Interaktion**

T-Zellen wurden zur Koexpression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie zur Expression der einzelnen CAR retroviral transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug in einem repräsentativen Experiment 65,2% (#710), 66,5% (#1156) und 62% (#710+#1156). In einer Verdünnungsreihe wurden  $2,5 \times 10^3$  bis  $2 \times 10^4$  CAR-tragende Zellen ausplattiert und mit  $2,5 \times 10^4$  Tumorzellen für 48h kokultiviert. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte Zellen verwendet. Die Zytotoxizität der Effektorzellen wurde mittels des XTT-Viabilitätstests bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die E:T ratio entspricht dem Verhältnis von Effektorzellen (CAR-tragenden T-Zellen) zu Tumorzellen bei der jeweiligen Kokultivierung.

#### 4.6.2 Antigen-induzierte Zytokin-Sekretion

Zusätzlich zur Antigen-vermittelten Zytolyse wurde die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 in den Überständen der kokultivierten Zellen bestimmt (Abb.23).

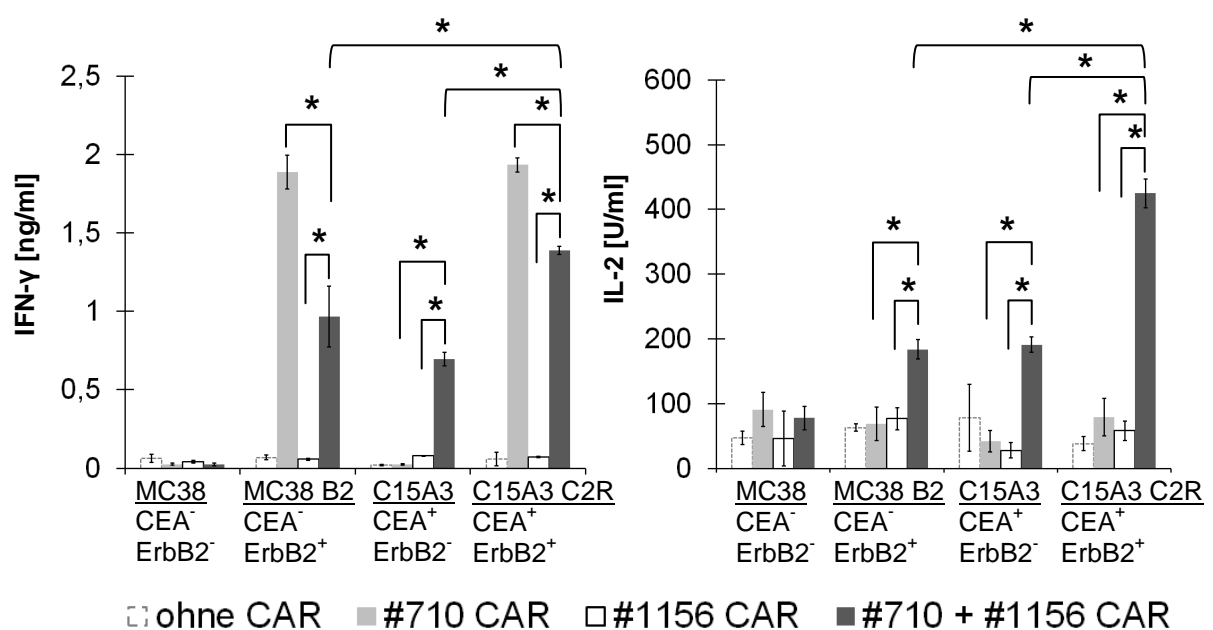
T-Lymphozyten mit der Koexpression der anti-CEA CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und der anti-ErbB2 CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden durch Tumorzellen mit der Expression von CEA und/oder ErbB2 zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion aktiviert. Anhand der IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion dieser T-Zellen durch Kontakt mit CEA exprimierenden Tumorzellen, wurde die Komplementierung der CAR-Signale nachgewiesen, angezeigt durch die IL-2 Sekretion bei Kokultur mit ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen. Durch Kokultivierung mit Tumorzellen, die beide Antigene exprimierten, wurden die bispezifischen T-Zellen stärker zur Zytokinsekretion induziert als durch Tumorzellen mit nur einem Antigen. Die funktionelle Komplementierung durch Bindung beider Antigene ist demnach effizienter als durch die Bindung eines Antigens.

Antigen-induzierte Aktivierung führte bei T-Lymphozyten mit dem anti-ErbB2 CD3 $\zeta$  CAR #710 durch Kontakt mit den ErbB2 exprimierenden Tumorzellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$ . T-Lymphozyten mit der Koexpression beider CAR wurden jedoch weniger stark zur IFN- $\gamma$  Sekretion aktiviert als T-Lymphozyten mit dem ErbB2 spezifischen CAR #710. Die ErbB2 vermittelte T-Zell-Aktivierung des CAR #710 wird demnach durch Koexpression des CD28 CAR #1156 verringert. T-Zellen mit dem CAR #710 wurden durch die Kokultivierung mit den CEA exprimierenden Tumorzellen C15A3 nicht zur Sekretion von IFN- $\gamma$  induziert. Für eine T-Zell-Aktivierung durch diese Tumorzellen war somit die Koexpression des anti-CEA CAR #1156 erforderlich. Als Kontrolle sezernierten T-Lymphozyten mit dem CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 weder nach Kokultivierung mit CEA positiven Tumorzellen noch mit ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen IFN- $\gamma$ . Eine Koexpression des CAR #710 mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne war für die Induktion der Zytokin-Sekretion durch diese Tumorzellen notwendig. Keine der CAR-tragenden T-Lymphozyten wurden durch Kokultivierung mit den MC38 Tumorzellen zur IFN- $\gamma$  und IL-2 Sekretion aktiviert. Die Induktion der Zytokin-Sekretion war folglich Antigen-spezifisch. Die nicht modifizierten T-Zellen



sezernierten durch Kokultivierung mit Tumorzellen weder IFN- $\gamma$  noch IL-2. Daher erfolgte die Induktion der Zytokin-Sekretion CAR-vermittelt.

Anhand der Zytokin-Sekretion wurde gezeigt, dass T-Zellen mit der Koexpression von CAR mit CD28 Signaldomäne und CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne durch Kontakt mit Antigen-exprimierenden Tumorzellen funktionell komplementieren. Die Antigen-induzierte Zytokin-Sekretion kann gesteigert werden, wenn bispezifische T-Zellen an Tumorzellen mit beiden Antigenen binden.



**Abbildung 23: Antigen-induzierte Zytokin-Sekretion modifizierter T-Zellen**

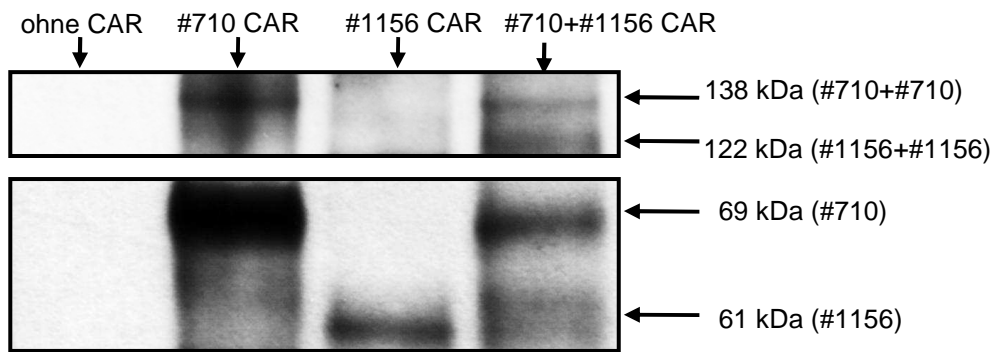
T-Lymphozyten mit der Koexpression der anti-CEA CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und anti-ErbB2 CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie der jeweils einzelnen CAR wurden mit CEA und/oder ErbB2 exprimierenden Tumorzellen für 48h kokultiviert. In den Überständen der Kokultivierung wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Überstände aus der Kokultivierung mit nicht modifizierten T-Zellen dienten als Vergleich. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die Konzentrationen der Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse 1:1,25 wurden zusammengefasst. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

## 4.7 Physikalische Assoziation chimärer Antigen-Rezeptoren

CAR-Moleküle bilden Dimere auf der Oberfläche von T-Zellen. Die Dimerisierung wird unterstützt durch die CAR Fc-Domäne, die mit der hinge-Region Disulfid-Brücken zu anderen IgG<sub>1</sub>-Domänen bildet. Es wurde untersucht, ob Heterodimere zweier CAR mit unterschiedlicher Spezifität gebildet werden, was die Grundlage für eine *trans*-Aktivierung der Signalketten nach Bindung des Antigens sein könnte. Zum Nachweis der Heterodimere wurden T-Lymphozyten mit Expression des CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  oder des CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 sowie der Koexpression beider CAR verwendet. Die Anzahl CAR-tragender T-Zellen wurde normiert und unter nicht reduzierenden Bedingungen lysiert. Die Proteine der Lysate wurden mittels SDS-Page getrennt und anschließend im Western Blot Verfahren nachgewiesen (Abb.24).

T-Zellen mit den koexprimierten CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 wiesen sowohl die Monomere der entsprechenden CAR als auch deren Homodimere auf. Die Masse eines Monomers des anti-CEA-CD28 CAR #1156 beträgt 61 kDa und die Masse eines anti-ErbB2-CD3 $\zeta$  CAR #710 Monomers entspricht 69,3 kDa. Die Homodimere der CAR Moleküle hatten eine entsprechend doppelte Masse. Ein Protein, welches ein Heterodimer eines CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne und CD28 Signaldomäne darstellte, konnte nicht detektiert werden. Im Lysat der CAR #710 exprimierenden T-Zellen wurde Protein nachgewiesen, das der Größe monomerer CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne entsprach. Zusätzlich wurde Protein, detektiert, das der dimeren Form dieser CAR entsprach. Bei T-Lymphozyten, die den CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 exprimierten, wurden im Lysat ausschließlich Monomere der CAR Proteine nachgewiesen. Im Lysat nicht modifizierter T-Zellen wurde kein CAR Protein detektiert.

Die beiden CAR #710 und #1156 liegen bei ihrer Koexpression in T-Zellen jeweils sowohl als Monomere als auch als Homodimere vor. Eine Bildung von Heterodimeren konnte mit dem Western Blot Verfahren nicht nachgewiesen werden.



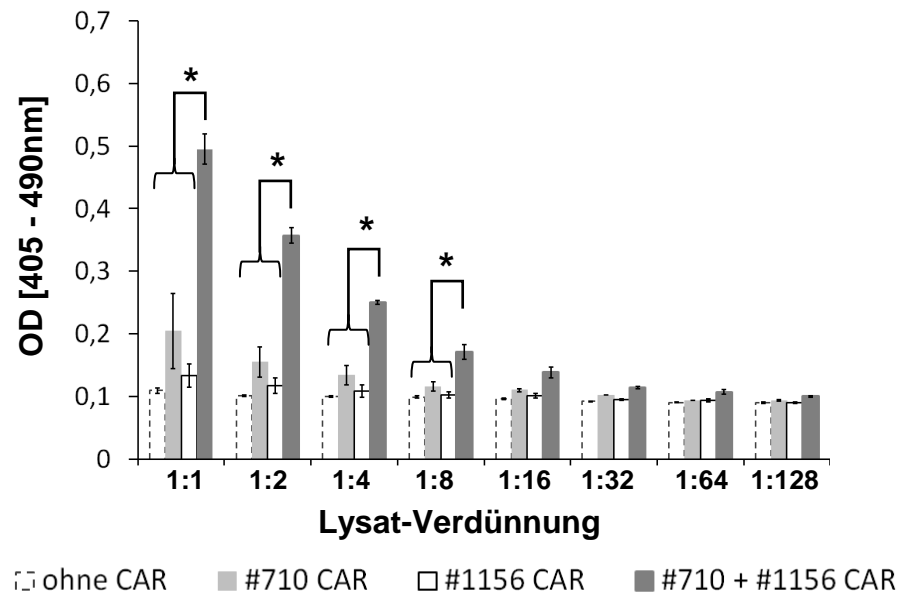
#### Abbildung 24: Nachweis der CAR-Dimere und -Monomere

Nach CD3 sortierte T-Lymphozyten mit Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie mit Koexpression dieser CAR wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen lysiert. Der Anteil der CAR-tragenden Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment 49,1% (#710), 66,7% (#1156) sowie 52,7% (#710+#1156). Die Lysate wurden elektrophoretisch mittels SDS-Page aufgetrennt. Die Proteinübertragung auf eine PVDF-Membran wurde mit Ponceau-S-Färbelösung überprüft, die gleichzeitig eine Fixierung der Proteine auf der Membran bewirkt. Im Western Blot wurden die CAR anhand ihrer humanen IgG<sub>1</sub>-Domäne mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten anti-human-IgG Kaninchenantikörper (1:800) markiert. Die Detektion erfolgte durch ECL Detektionsreagenz. Monomere des CAR #710 mit der CD3 $\zeta$  Signaldomäne haben eine Masse von ca. 69 kDa, Monomere des CAR #1156 mit der CD28 Signaldomäne eine Masse von ca. 61 kDa. Die Größe der CAR-Homodimere entsprach der doppelten Masse der CAR-Monomere. Als Kontrolle dienten nicht modifizierte T-Zellen.

Das Western Blot Verfahren erfordert auch bei nicht-reduzierender Bedingungen eine harsche Auftrennung der Proteine. Deswegen wurde in einem ELISA Verfahren alternativ untersucht, ob zwei in T-Zellen koexprimierte CAR mit unterschiedlicher Bindedomäne Heterodimere bilden können. Die Lysate von T-Lymphozyten, die den CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 sowie den CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  einzeln oder simultan exprimierten, wurden in einer Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatten inkubiert, welche mit dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 zur Bindung des anti-CEA CAR beschichtet wurden. Nicht gebundenes Lysat wurde durch Waschen entfernt und gebundener anti-ErbB2 CAR mit Hilfe des Fusionsproteins ErbB2-eGFP detektiert. Das ErbB2-eGFP Fusionsprotein

wurde durch den polyklonalen, biotinylierten, GFP-spezifischen Antikörper detektiert und mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Die Entwicklung wurde mit dem Farbstoff 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) durchgeführt und dessen Absorption photometrisch nachgewiesen (Abb.25).

Im Lysat von T-Zellen, welche den CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 koexprimierten, wurden CAR-Heterodimere detektiert. Das Signal war abhängig von der Anzahl lysierter T-Zellen. Dagegen wurde im Lysat von T-Lymphozyten, welche ausschließlich den CAR #710 oder #1156 exprimierten, kein ErbB2-spezifischer CAR nach Bindung an den anti-BW431/26-spezifischen Fang-Antikörper nachgewiesen. Das Lysat nicht modifizierter T-Zellen führte zu nicht zur Detektion eines CAR. Mit Hilfe des ELISA gelang der Nachweis, dass die beiden CAR #710 und #1156 Heterodimere bilden, wenn sie in T-Zellen koexprimiert werden.



#### Abbildung 25: Nachweis der CAR-Heterodimere

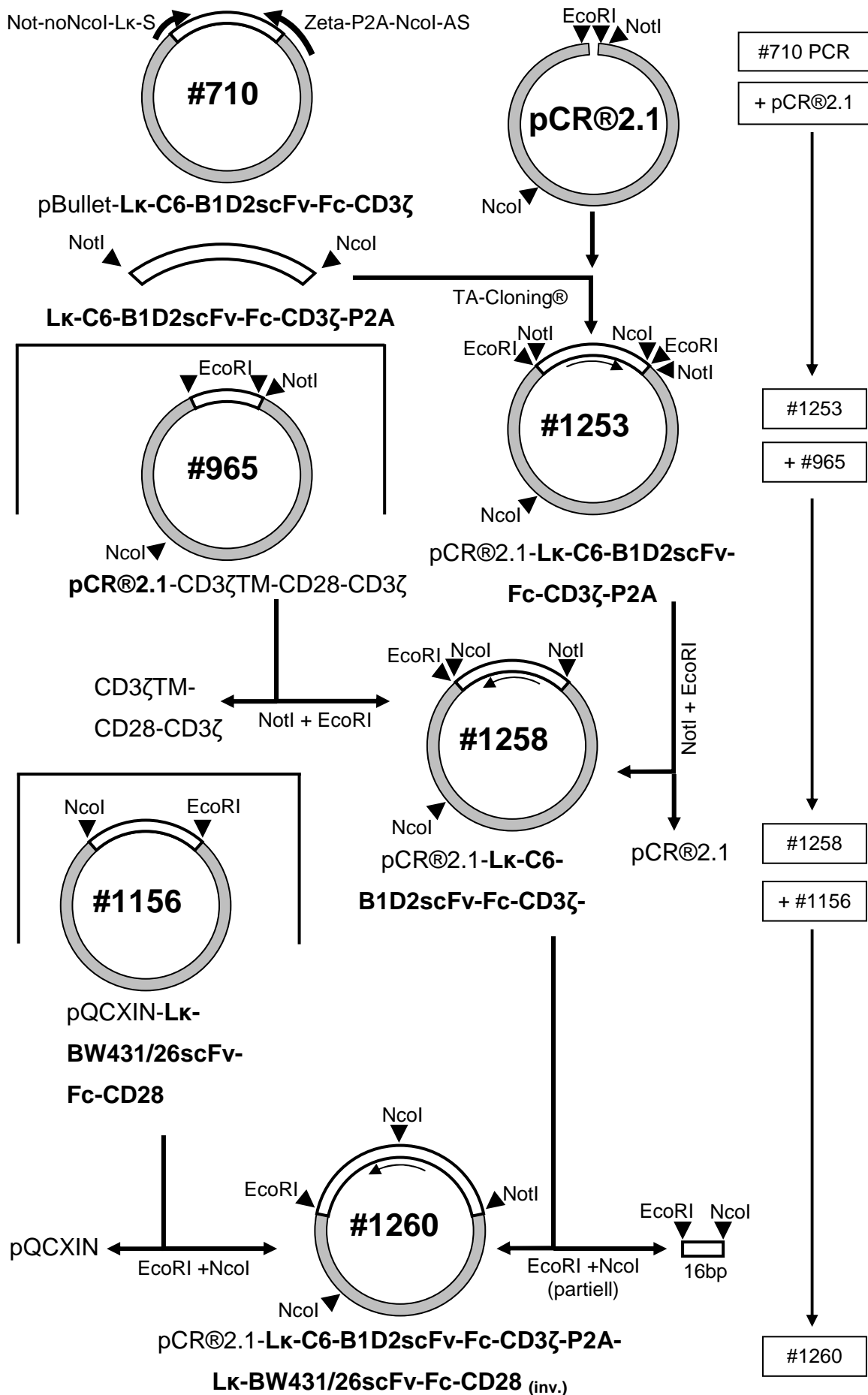
Nach CD3 sortierte T-Lymphozyten mit Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie mit Koexpression dieser CAR wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen lysiert und die Lysate in einer Verdünnungsreihe auf Mikrotiterplatten inkubiert, die mit dem BW431/26scFv-spezifischen Fang-Antikörper BW2064/399 (5 $\mu$ g/ml) beschichtet waren. Gebundene anti-ErbB2 CAR wurden mit dem Fusionsprotein ErbB2-eGFP (200 $\mu$ l Kulturüberstände), das spezifisch von der C6-B1D2scFv Domäne gebunden wird, detektiert. Das Fusionsprotein wurde mit dem biotinylierten anti-GFP Antikörper (1:32000), Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:10000) und ABTS (1mg/ml) nachgewiesen. Als Kontrolle dienten nicht modifizierte T-Zellen. Die Absorption wurde am Photometer bei 405 nm Wellenlänge gemessen. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

#### 4.8 Klonierung des Plasmids pMP71-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262)

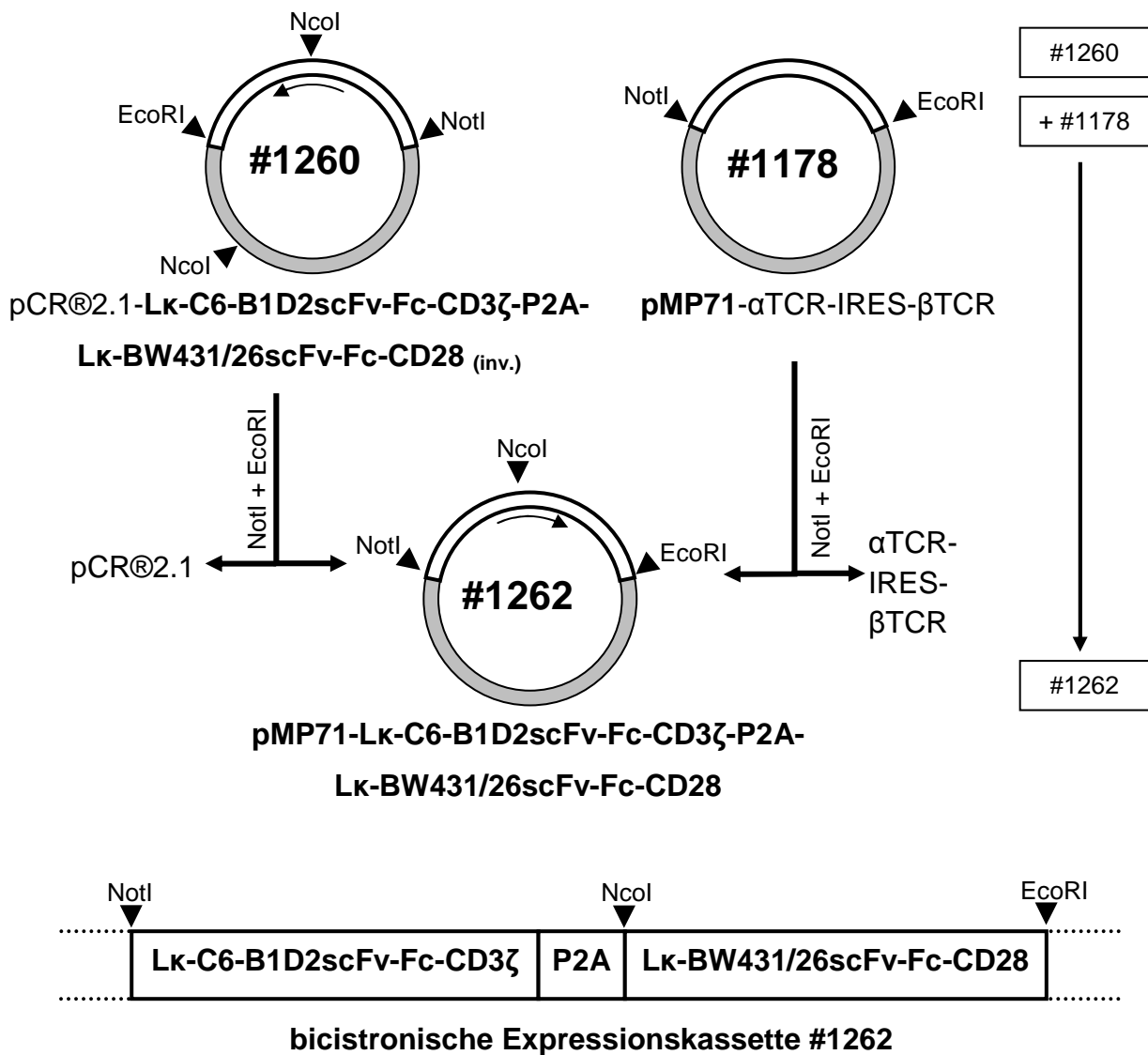
Die Kotransduktion von Lymphozyten mit der monocistronischen Expressionskassetten für die jeweiligen CAR hatte den Nachteil, dass ein großer Anteil der zu untersuchenden Effektorzellen nur einen CAR exprimiert. Dies sollte verbessert werden durch die Verwendung einer bicistronischen Expressionskassette, welche für die DNS der beiden CAR kodiert. Innerhalb der bicistronischen Expressionskassette wurde die CAR-DNS durch DNS für das P2A-Peptid verknüpft, welches einen ribosomalen „skip-Mechanismus“ auslöst und während der Translation eine Spaltung zwischen den Polypeptidketten der CAR verursacht, so dass die CAR Proteine anschließend in gleichen Anteilen vorliegen. Zur Generierung der kodierenden DNS-Sequenz für die beiden CAR wurden die Nukleinsäuresequenzen der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mittels der DNS für das 2A-Peptid eines Picornavirus (P2A) verknüpft. Die bicistronische Expressionskassette wurde über mehrere Zwischenschritte rekombiniert (Abb.26).

Im ersten Schritt wurde die DNS für den CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  aus dem Plasmid pBullet mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „Not-noNcoI-Lk-S“, welches mit der DNS des Kappa Signalpeptids hybridisiert und des 3'-Oligonukleotids „Zeta-P2A-NcoI-AS“, welches mit der DNS der intrazellulären CD3 $\zeta$  Domäne hybridisiert, mittels PCR amplifiziert. Dabei kodiert der nicht hybridisierende Teil des verwendeten 3'-Oligonukleotids für das P2A-Peptid, sodass die amplifizierte DNS ein Fusionsprodukt für die CAR-Sequenz und die 3-terminale P2A-Sequenz kodiert. Unter Verwendung einer high-fidelity Taq-Polymerase, welche während der PCR-Reaktion 3'-Adeninüberhänge generierte, wurde die Möglichkeit geschaffen, die amplifizierte DNS in den pCR2.1 Klonierungsvektor zu ligieren, da dieser über 5'-Thyminüberhänge verfügt. Ligierte Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNS-Sequenzierung verifiziert. Die identifizierte DNS wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und EcoRI gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor #965 pCR2.1-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  ligiert. Dabei wurde das Insert CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  des Vektors #965 verworfen und die DNS für das

CAR-P2A Fusionskonstrukt Lκ-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A invers inseriert, so dass eine von zwei EcoRI-Restriktionsschnittstelle deletiert wurde. Dieser Schritt war für die spätere Fusion mit der DNS des zweiten CAR notwendig. Nach der Ligation der DNS wurde dieses Zwischenprodukt durch eine partielle Restriktionsspaltung mit den Enzymen NcoI und EcoRI im Verhältnis 1:10 gespalten, so dass einige Nukleotide am 3'-Ende der DNS für Lκ-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A deletiert wurden. Gleichzeitig wurde die DNS für den CAR Lκ-BW431/26scFv-Fc-CD28 aus dem ebenso gespaltenen Vektor #1156 pQXCIN an das 3'-Ende der DNS für Lκ-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A inseriert. In diesem Zwischenprodukt mit inverser Orientierung wurde die DNS für die gesamte bicistronische Expressionskassette fusioniert. In einem letzten Schritt wurde die fusionierte DNS der bicistronischen Expressionskassette mittels Spaltung durch die Restriktionsendonukleasen NotI und EcoRI in den retroviralen Vektor pMP71 überführt. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassette befindet sich im Anhang (S.164).







**Abbildung 26: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 in pMP71 (#1262)**

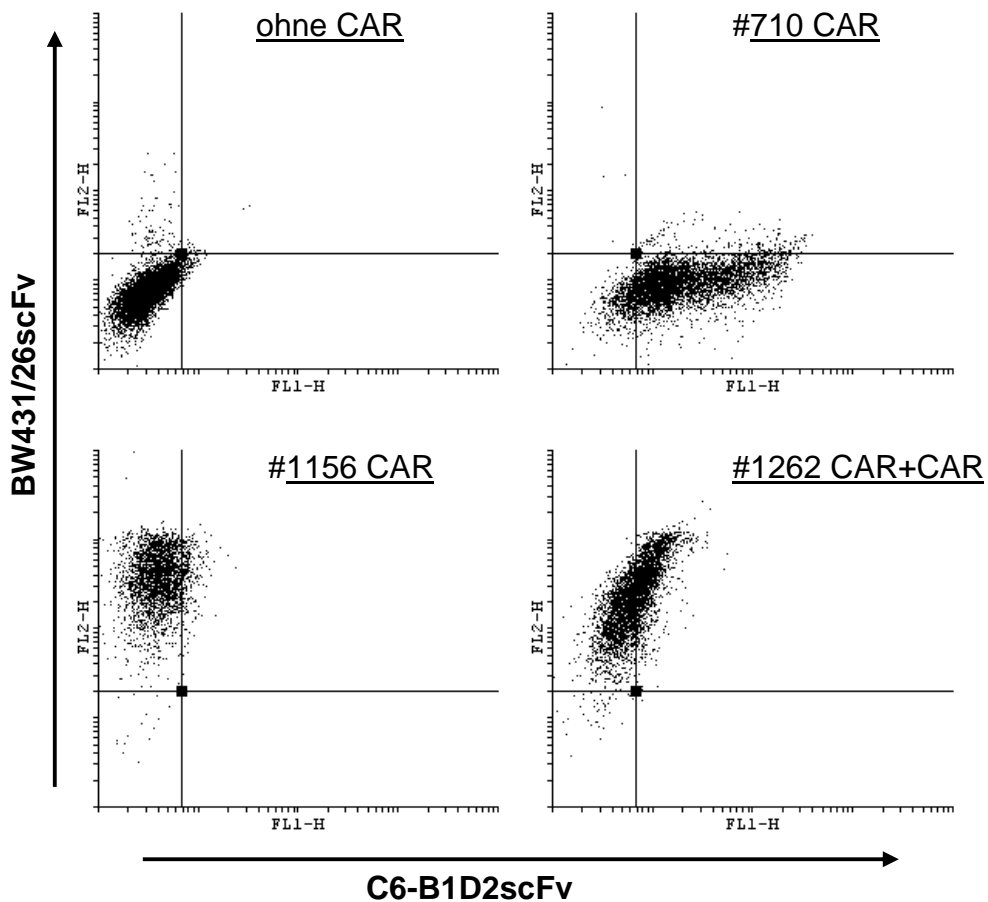
Die DNS für den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ wurde mittels PCR aus dem Plasmid #710 amplifiziert und 3'-terminal mit der DNS für P2A verknüpft. Das DNS-Fragment wurde mit Hilfe des TA-Cloning® in das lineare Plasmid pCR@2.1 ligiert. Über mehrere Klonierungsschritte wurden durch Inversion des Inserts Schnittstellen deletiert und die DNS für den CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 inseriert. Die bicistronische Expressionskassette #1262, die für die beiden P2A-verknüpften CAR kodiert, wurde in den retroviralen Expressionsvektor pMP71 ligiert.

## 4.9 Funktionelle Charakterisierung koexprimierter CAR #1262

### 4.9.1 Koexpression der CAR

HEK 293 T-Zellen wurden zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  mit dem retroviralen bicistronischen Vektor #1262 transfiziert. Die Bindedomänen der CAR wurden auf der Oberfläche von 293T Zellen nachgewiesen. Zur Detektion des CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 wurde mit dem für die Bindedomäne BW431/26 spezifischen Antikörper BW2064/399 inkubiert und dieser mit dem Maus-IgG<sub>1</sub>-spezifischen, PE-gekoppelten Antikörper detektiert. Der ErbB2-spezifische CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurde mit dem Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP nachgewiesen. Als Kontrolle dienten 293T Zellen, die mit der DNS für jeweils einen der betreffenden CAR transfiziert waren sowie nicht modifizierte Zellen (Abb.27).

Transfektion der 293T Zellen mit dem retroviralen bicistronischen Vektor #1262 führte zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wie in der durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen wurde. Im Vergleich dazu wurde bei 293T Zellen mit dem CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 nur die Bindedomäne BW431/26 und bei 293T Zellen mit dem CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  nur die Bindedomäne C6-B1D2 nachgewiesen. Bei nicht transfizierten 293T Zellen wurde keine CAR-Expression detektiert. Die Daten zeigen, dass die CAR mit Hilfe der bicistronischen Expressionskassette koexprimiert werden und die Fähigkeit bewahrt haben, ihr jeweiliges Antigen zu binden.

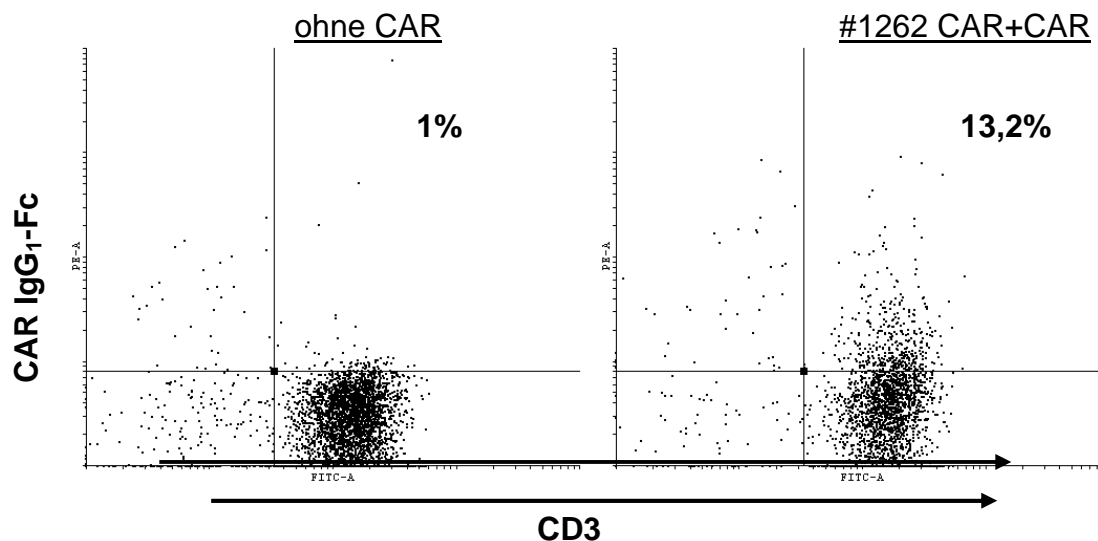


**Abbildung 27: Antigen-Bindung der koexprimierten CAR #1262**

Jeweils  $3 \times 10^5$  HEK 293T Zellen wurden mit DNS transfiziert, die für die CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28, #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  oder #1262 BW431/26scFv-Fc-CD28 plus C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  kodiert. Zur Prüfung der anti-CEA Bindedomäne BW431/26 auf ihre Bindungsfähigkeit wurden die Zellen mit dem BW2064/399 Idiotyp-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) inkubiert und die Bindung durch den anti-Maus-IgG<sub>1</sub>-PE Antikörper (2,5  $\mu$ g/ml) nachgewiesen. Kulturüberstand mit dem Fusionsprotein ErbB2-eGFP (200  $\mu$ l) diente zum Nachweis der Bindungsfähigkeit der ErbB2-Bindedomäne C6-B1D2. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte 293T Zellen verwendet.

T-Zellen wurden durch Transduktion mit dem retroviralen bicistronischen Vektor #1262 mit den CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  in T-Lymphozyten ausgestattet. Die Zellen wurden zur Detektion der humanen IgG<sub>1</sub>-Domäne der CAR mit dem PE-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper inkubiert und mit dem FITC-gekoppelten anti-human-CD3 Antikörper zur Identifikation der T-Lymphozyten markiert. Die Expression der CAR in T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.28).

Die Expression der humanen IgG<sub>1</sub>-Fc Domäne der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  in T-Zellen mit Hilfe des retroviralen Gentransfers der bicistronischen Expressionskassette wurde nachgewiesen. Der Anteil der CAR-tragenden T-Zellen betrug in einem typischen Experiment circa 13,2%. Ein Vergleich mit zuvor durchgeführten Transduktionen von monocistronischen Genkassetten zeigt, dass die Transduktionseffizienz durch Verwendung einer bicistronischen Expressionskassette herabgesetzt wird.



**Abbildung 28: Expression der CAR in humanen T-Zellen (#1262)**

Aktivierte T-Zellen wurden zur Expression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  durch den bicistronischen, retroviralen Vektor #1262 transduziert und durchflusszytometrisch analysiert. Zum Nachweis der CAR-Expression wurden die T-Zellen mit dem FITC-gekoppelten Maus anti-human-CD3 Antikörper (5  $\mu$ l pro  $2 \times 10^5$  Zellen) und dem PE-gekoppelten Ziege anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper (2,5  $\mu$ g/ml) markiert. Als Kontrolle dienten nicht modifizierte T-Zellen.

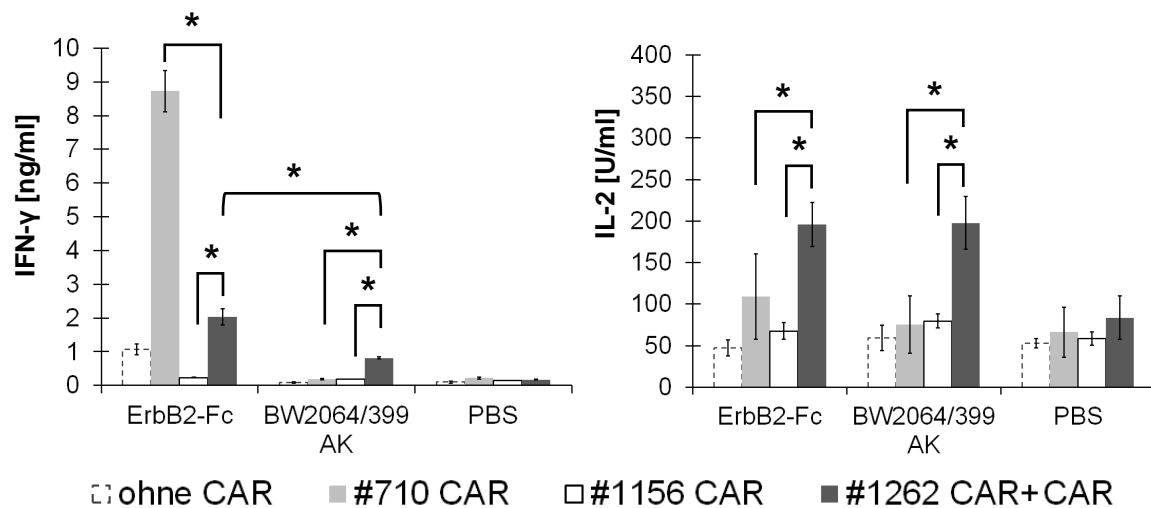
#### 4.9.2 Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CAR

Der CEA-spezifische CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 liefert das Signal des kostimulatorischen Moleküls CD28 und der ErbB2-spezifische CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  das Signal der CD3 $\zeta$  Domäne. Die Antigen-vermittelte Aktivierung von T-Lymphozyten durch einen CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne induziert T-Lymphozyten zur Sekretion von IFN- $\gamma$ , im Gegensatz zu CD28 CAR. Anhand koexprimierter CAR sollte eine Komplementierung der CAR-vermittelten Effektorfunktionen durch die funktionelle Interaktion untersucht werden. Im folgenden Experiment wurde die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$  als Indikator für das CD3 $\zeta$  Signal und IL-2 als Indikator der CD28 Kostimulation bei CD3 $\zeta$  Signal untersucht. Durch Verwendung der bicistronischen Expressionkassette wurde sichergestellt, dass transduzierte T-Zellen über die gleiche Expressionsdichte der jeweiligen CAR verfügen und T-Zellen mit der Expression eines einzelnen CAR ausgeschlossen werden konnten. Mikrotiterplatten wurden mit dem Fusionsprotein ErbB2-Fc als Ligand für den CD3 $\zeta$  CAR und dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 als Ligand für den CD28 CAR sowie zur Kontrolle mit PBS beschichtet. Aktivierte T-Zellen wurden zur Expression der einzelnen CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie zur Koexpression mit der bicistronischen Expressionkassette #1262 transduziert und der Anteil der CAR-exprimierenden Zellen bestimmt. Anschließend wurden der Anteil der T-Zellen mit der Koexpression der CAR #1262 mit dem PE-gekoppelten Ziege anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper markiert und mittels anti-PE „MicroBeads“ durch magnetische Zellsortierung auf etwa 87% angereichert. Die sortierten Zellen wurden 48h ohne IL-2 kultiviert. Die gleiche Anzahl CAR-tragender T-Zellen wurde auf den beschichteten Platten inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. Im Anschluss wurde die T-Zell-Aktivierung anhand der Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 bestimmt (Abb.29)

T-Lymphozyten mit den beiden CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  (#1262) sezernierten durch Bindung an den anti-idiotypischen Antikörper BW2064/399, der den anti-CEA CAR mit der CD28

Signaldomäne kreuzvernetzt, IFN- $\gamma$  und IL-2. Bindung dieser T-Zellen an das ErbB2-Fc Fusionsprotein, welches den anti-ErbB2 CAR mit der CD3 $\zeta$  Signaldomäne kreuzvernetzt, führte ebenfalls zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2. Daraus wird geschlossen, dass durch die Expression der bicistronischen Kasette #1262 in T-Zellen eine Komplementierung der CAR-Signale erfolgt. Die Bindung dieser T-Zellen an das ErbB2-Fc Fusionsprotein bewirkte eine stärkere Induktion zur IFN- $\gamma$  Sekretion als die Bindung an den Antikörper BW2064/399. T-Lymphozyten mit dem CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden durch das Fusionprotein ErbB2-Fc zu einer Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert. Die Induktion der T-Zellen zur IFN- $\gamma$  Sekretion wurde jedoch verringert, wenn dieser CAR mit dem CD28 CAR koexprimiert wurde. Für die Aktivierung zur IL-2 Sekretion ist die Koexpression des CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 erforderlich. Bei Stimulation dieser Zellen mit dem BW2064/399 Antikörper via anti-CEA CD28 Signal CAR wurde keine Zytokinsekretion nachgewiesen. Eine CD28 Kostimulation bei CD3 $\zeta$  Signal wird durch die Expression der bicistronischen Genkasette in T-Zellen gewährleistet. T-Zellen, die den CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 exprimierten, sezernierten weder durch Stimulation mit dem BW2064/399 Antikörper noch durch Stimulation mit dem ErbB2-Fc Fusionsprotein IFN- $\gamma$  oder IL-2. Die T-Zell-Aktivierung zur IFN- $\gamma$  Sekretion und die Komplementierung mit dem CD28 Signal dieses CAR wird durch die Koexpression des CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  bewirkt. Die T-Zell-Aktivierung war Antigen-spezifisch, da die Inkubation der T-Zellen auf Kontrolloberflächen zu keiner Zytokin-Sekretion führte. Keines der Antigene führte zur Aktivierung nicht modifizierter T-Zellen.

Durch die Expression einer bicistronischen Genkasette für zwei CAR in T-Zellen wird eine Komplementierung der CAR-Signale erreicht, wie sie zuvor bei kotransduzierten Zellen beobachtet wurde. T-Zellen verfügen durch den Transfer der bicistronischen Expressionskasette über die Koexpression der jeweiligen CAR. Einerseits ist die T-Zell-Aktivierung durch Kreuzvernetzung des anti-ErbB2 CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne effizienter als durch Kreuzvernetzung des anti-CEA CAR mit CD28 Signaldomäne. Andererseits wird die Effizienz des CAR mit CD3 $\zeta$ -Signal, T-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$  zu induzieren, durch die Koexpression eines CAR mit CD28-Signaldomäne herabgesetzt.



**Abbildung 29: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1262**

T-Zellen wurden zur Expression des CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und des CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ sowie durch die bicistronische Expressionskassette #1262 zu ihrer Koexpression transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten betrug in einem repräsentativen Experiment 34% (#710), 40,5% (#1156) und 13,2% (#1262). T-Zellen mit der CAR Koexpression wurden durch magnetische Zellsortierung auf einen Anteil von 87% angereichert. Mikrotiterplatten wurden mit dem BW2064/399 Antikörper (8μg/ml), dem ErbB2-Fc Fusionsprotein (8μg/ml) oder PBS beschichtet. Jeweils  $5 \times 10^4$  CAR-tragende Zellen wurden pro Vertiefung ausplattiert und für 72h kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In den Kulturüberständen wurden die IFN-γ und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Vierfachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

#### 4.10 Kinetik der #710, #1156 und #1262 CAR-vermittelten Aktivierung

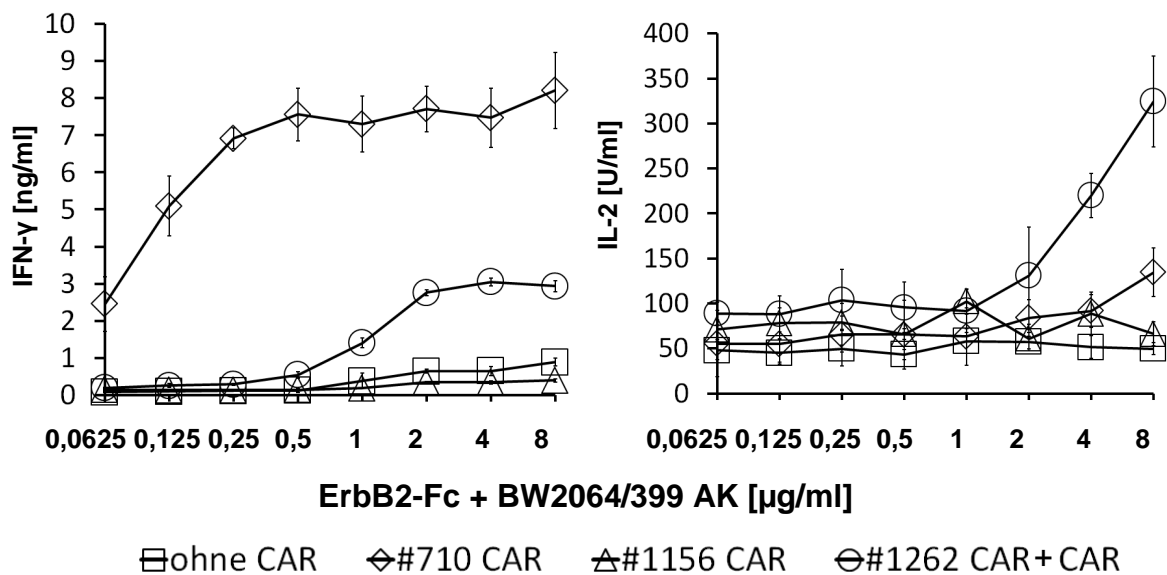
Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich die Expressionsdichte der Antigene CEA und ErbB2 auf die Aktivierung von T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  (#1262) oder mit der Expression der einzelnen CAR #710 oder #1156 ausprägt. Der Anteil der T-Zellen mit Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 und #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie der Koexpression der beiden CAR durch die bicistronische Expressionskassette #1262 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die T-Zellen mit der Koexpression der CAR #1262 wurden mit dem PE-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper markiert und mittels anti-PE „MicroBeads“ durch magnetische Zellsortierung zu etwa 87% angereichert. Anschließend wurden die Zellen 48h ohne IL-2 kultiviert. Mikrotiterplatten wurden mit dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 und dem ErbB2-Fc Fusionsproteins in einer Verdünnungsreihe beschichtet. Die Konzentrationen wurden so titriert, dass der BW2064/399 Antikörper und das ErbB2-Fc Fusionsprotein in jeder Vertiefung in gleichen Verhältnissen vorlagen. Da beide Antigene eine ähnliche Struktur darstellen, wurde davon ausgegangen, dass sie gleich gut auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte binden. Die gleiche Anzahl CAR-tragender T-Lymphozyten wurde auf den Mikrotiterplatten kultiviert. Nicht modifizierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung wurde durch die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 in den Kulturüberständen bestimmt. Als Maß für die Aktivierungsschwelle wurde die Konzentration der Antigene definiert, die zum Erreichen der halbmaximalen Konzentration der sezernierten Zytokine erforderlich war (Abb.30, Tab.2).

T-Lymphozyten, welche die CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  koexprimierten, wurden durch die Bindung an das Fusionsprotein ErbB2-Fc und den BW2064/399 Antikörper zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 angeregt. T-Lymphozyten mit dem CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28 wurden durch keine der verwendeten Konzentrationen des Antikörpers BW2064/399 und des Fusionsproteins ErbB2-Fc zur Sekretion von IL-2 oder



IFN- $\gamma$  aktiviert. T-Zellen mit dem CAR #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden zur Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert. Die T-Zellen mit der alleinigen Expression des ErbB2-spezifischen CAR #710 wurden durch eine niedrigere Antigendichte zur halbmaximalen Sekretion von IFN- $\gamma$  stimuliert als T-Zellen mit den koexprimierten CAR. T-Zellen mit dem ErbB2-spezifischen CD3 $\zeta$  CAR #710 wurden durch Bindung des Antigens zu einer höheren maximalen IFN- $\gamma$  Sekretion im Vergleich zu T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1262 induziert. Nicht modifizierte T-Zellen wurden durch keines der Antigene zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert.

Es wurde gezeigt, dass die Aktivierungsschwelle von T-Zellen mit einem CD3 $\zeta$  CAR durch Koexpression eines CAR mit CD28 Signaldomäne erhöht wird. Unter der Voraussetzung, dass beide CAR in gleicher Dichte exprimiert werden und durch ein gleiches Verhältnis der Antigene gleich stark kreuzvernetzt werden, wird die Effizienz, T-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$  zu induzieren, gleichzeitig verringert. Durch die Bindung zweier Antigene führt die Koexpression eines CD3 $\zeta$  CAR und eines CD28 CAR zur Komplementierung der CAR-Signale und zur Induktion kostimulatorischer Effektorfunktionen.



**Abbildung 30: CAR #710, #1156 und #1262 vermittelte T-Zell-Aktivierung**

T-Zellen wurden zur Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28, #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  sowie durch die bicistronische Expressionskassette #1262 zur Koexpression der CAR transduziert. Der Anteil CAR-tragender T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug in einem repräsentativen Experiment 14% (#710), 40,5% (#1156) und 13,2% (#1262). T-Zellen mit der CAR Koexpression wurden durch magnetische Zellsortierung auf einen Anteil von 87% angereichert. Mikrotiterplatten wurden mit dem BW2064/399 Antikörper und dem ErbB2-Fc Fusionsprotein in einer Verdünnungsreihe beschichtet. Jeweils  $5 \times 10^4$  CAR tragende Zellen wurden pro Vertiefung auf Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten für 72h kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In den Kulturüberständen der Kultivierung wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Vierfachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. (→ Tab.2, S.117)

	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [Konz. Antigene]	Aktivierungsschwelle IL-2 [Konz. Antigene]	Maximal sezernierte IFN- $\gamma$ Konz.	Maximal sezernierte IL-2 Konz.
ohne CAR	-	-	-	-
#710 CAR	100 ng/ml	-	8 ng/ml	-
#1156 CAR	-	-	-	-
#1262 CAR+CAR	960 ng/ml	2,23 $\mu$ g/ml	3 ng/ml	330 U/ml

①
②
③
④
⑤

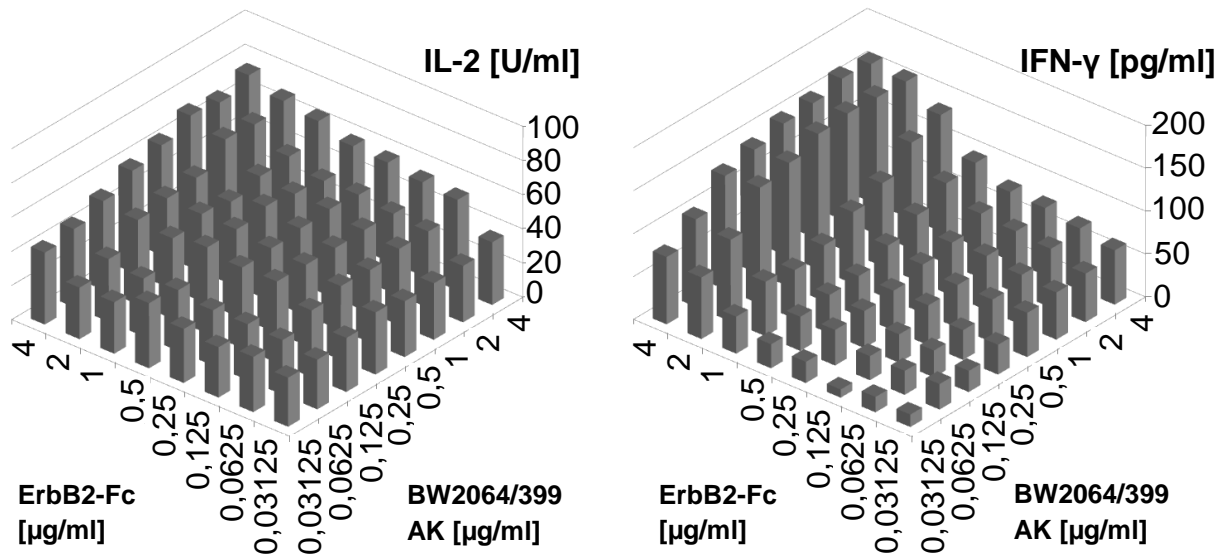
**Tabelle 2: Antigenkonzentration zur CAR #710, #1156 und #1262 vermittelten T-Zell-Aktivierung**

Wertetabelle der Aktivierungsdaten aus Abbildung 30. In den Spalten 2 und 3 sind jeweils die Antigen-Konzentrationen angegeben, die zum Erreichen der halbmaximalen IFN- $\gamma$  Sekretion (Spalte 2) oder der halbmaximalen IL-2 Sekretion (Spalte 3) notwendig waren. Spalte 4 und 5 stellen die maximale erreichten Zytokinkonzentrationen für die Antigen-spezifische Aktivierung dar. Die jeweils zum Erreichen der halbmaximalen Zytokinkonzentration erforderliche Antigenmenge wurde anhand logarithmischer Regression des linearen Bereichs berechnet.

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss eines variablen Verhältnisses der Dichte beider Antigene auf der Oberfläche auf die Aktivierung der T-Zelle mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  untersucht werden. Dazu wurde das Fusionsprotein ErbB2-Fc und der Antikörper BW2064/399 in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen auf Mikrotiterplatten koadsorbiert. Gleiche Anzahl T-Lymphozyten mit der bicistronischen Expressionskassette #1262 wurden auf den beschichteten Mikrotiterplatten kultiviert. Anschließend wurde die T-Zell-Aktivierung anhand der Konzentration der in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 bestimmt. Als Maß für die Aktivierungsschwelle wurden die Konzentrationen der beschichteten Antigene definiert, die zum Erreichen der jeweils halbmaximalen Zytokin-Konzentration erforderlich waren (Abb.31 und 32, Tab.3).

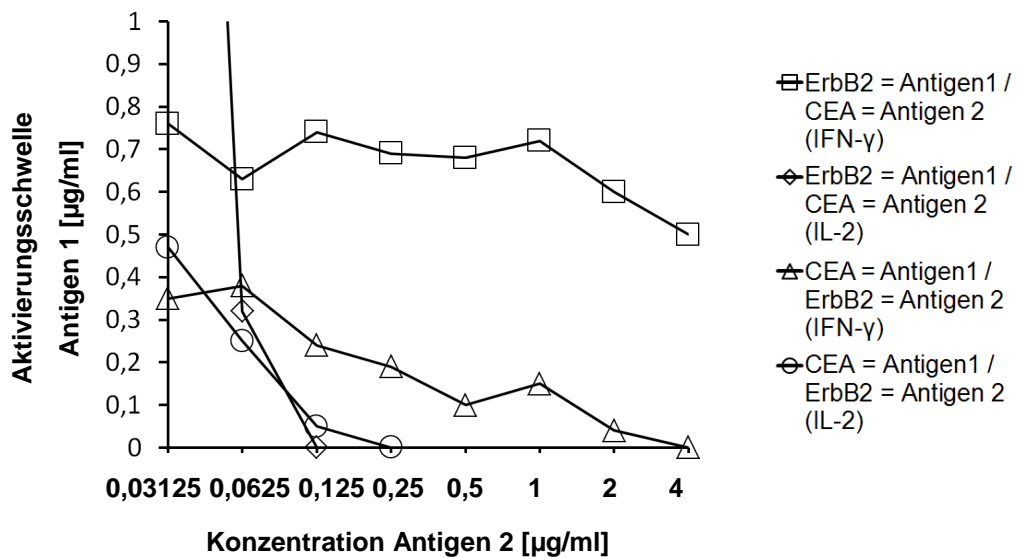
T-Lymphozyten mit den CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  wurden durch die beschichteten Antigene zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert. Die maximal sezernierten Zytokin-Konzentrationen wurden durch die Anwesenheit des zweiten Antigens konzentrationsabhängig gesteigert. Kostimulation durch das Fusionsprotein ErbB2-Fc, das den anti-ErbB2-CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne kreuzvernetzt, steigerte die IFN- $\gamma$  Sekretion effizienter als Kostimulation durch den Antikörper BW2064/399, der den anti-CEA-CAR mit CD28 Signaldomäne kreuzvernetzt. Die Antigenkonzentration, die zum Erreichen der halbmaximalen Zytokin-Konzentration erforderlich war, wurde durch Anwesenheit des zweiten Antigens konzentrationsabhängig verringert.

T-Zellen mit der Koexpression eines CD3 $\zeta$  CAR und eines CD28 CAR verfügen über eine erhöhte Aktivierungsschwelle gegenüber T-Zellen mit der alleinigen Expression des CD3 $\zeta$  CAR. Diese Aktivierungsschwelle wird jedoch durch zunehmende Expressionsdichte eines der Antigene verringert. Die Komplementation der CAR-Signale zur Induktion kostimulatorischer Effektorfunktionen wird durch die Anwesenheit des zweiten Antigens gewährleistet. Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung wird mit zunehmender Expressionsdichte des zweiten Antigens gesteigert. Die zusätzliche Bindung des ErbB2-spezifischen CAR an sein Antigen prägt sich stärker auf die Herabsetzung der Aktivierungsschwelle und die Steigerung der Zytokin-Sekretion aus als die zusätzliche Bindung des CEA-spezifischen CAR an CEA.



**Abbildung 31: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit koexprimierten CAR #1262 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration**

T-Zellen mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ ( $1 \times 10^4$  CAR-tragende Zellen) wurden auf Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten für 48h kultiviert. Der Anteil der CAR-tragenden Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment 16,1%. In den Kulturüberständen wurden die IFN-γ und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. (→ Abb. 32 und Tab.3, S.120)



**Abbildung 32: Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1262 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration**

Die Berechnung der exemplarischen Aktivierungsschwellen erfolgte durch logarithmische Regression des linearen Bereichs der entsprechenden Aktivierungsdaten aus Abbildung 31 (→ Tab. 3, S.120).

Konzentration des jeweils zweiten Antigens	CEA		ErbB2	
	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [BW2064/399]	Aktivierungsschwelle IL-2 [BW2064/399]	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [ErbB2-Fc]	Aktivierungsschwelle IL-2 [ErbB2-Fc]
31,25 ng/ml	0,35 $\mu$ g/ml	0,47 $\mu$ g/ml	0,76 $\mu$ g/ml	> 4 $\mu$ g/ml
62,5 ng/ml	0,38 $\mu$ g/ml	0,25 $\mu$ g/ml	0,63 $\mu$ g/ml	0,32 $\mu$ g/ml
125 ng/ml	0,24 $\mu$ g/ml	50 ng/ml	0,74 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
250 ng/ml	0,19 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	0,69 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
0,5 $\mu$ g/ml	0,1 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	0,68 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
1 $\mu$ g/ml	0,15 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	0,72 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
2 $\mu$ g/ml	40 ng/ml	< 31,25 ng/ml	0,6 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
4 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	< 31,25 ng/ml	0,5 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml
①	②	③	④	⑤

**Tabelle 3: Schwellenwerte der Antigenkonzentrationen zur Aktivierung der T-Zellen mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$**

Wertetabelle der Aktivierungsdaten aus Abbildung 32. In den Spalten 2 bis 5 sind jeweils die Antigen-Konzentrationen angegeben, die zum Erreichen der halbmaximalen IFN- $\gamma$  Sekretion (Spalte 2 und 4) oder der halbmaximalen IL-2 Sekretion (Spalte 3 und 5) notwendig waren. Die Konzentration des jeweils zweiten Antigens wird in der Spalte 1 angegeben. Spalte 2 und 3 stellen die Schwellenwerte für die CEA-spezifische Aktivierung dar, Spalte 4 und 5 stellen die Schwellenwerte für die ErbB2-spezifische Aktivierung dar.

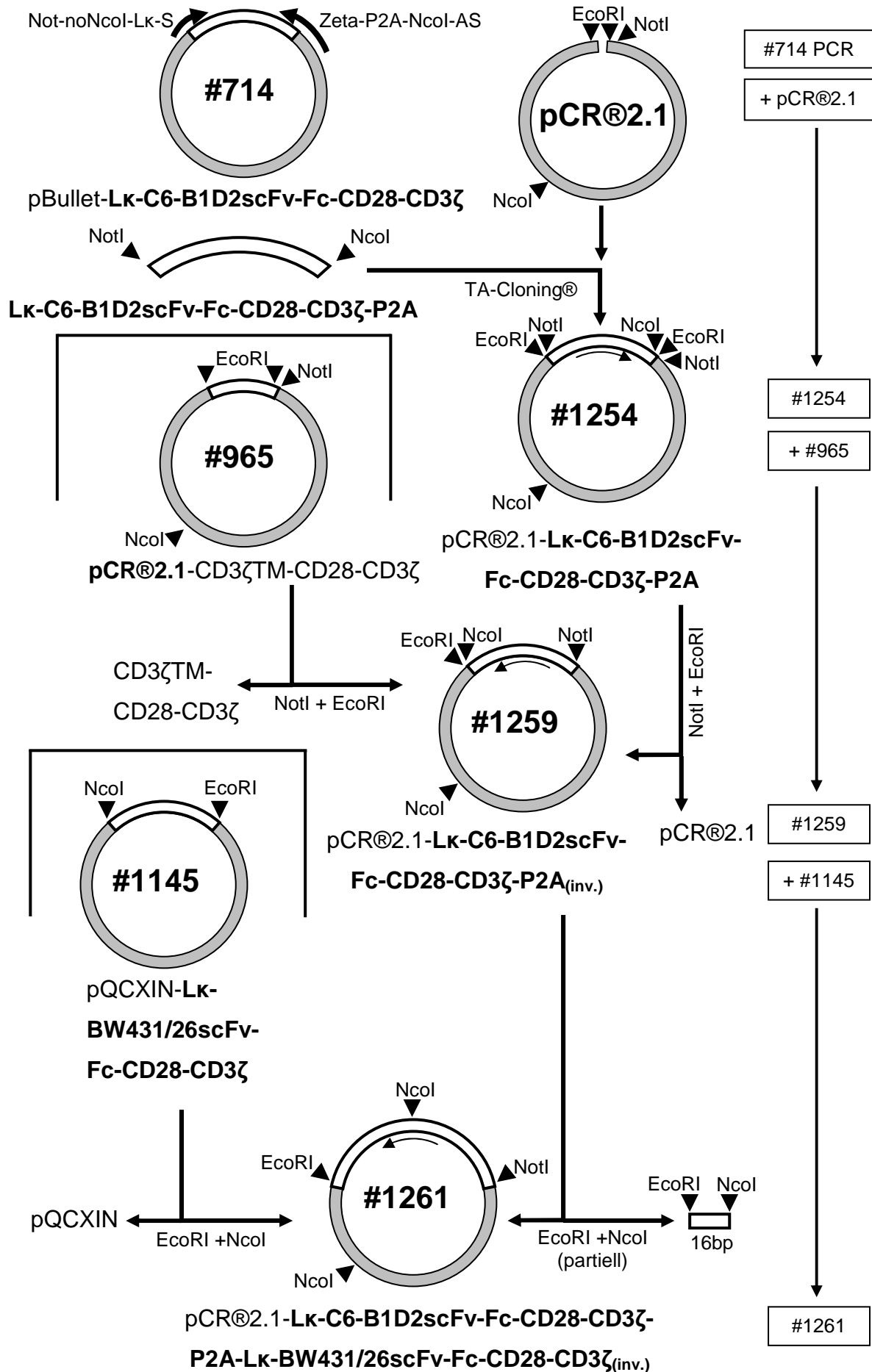
#### 4.11 Klonierung des Plasmids pMP71-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ (#1263)

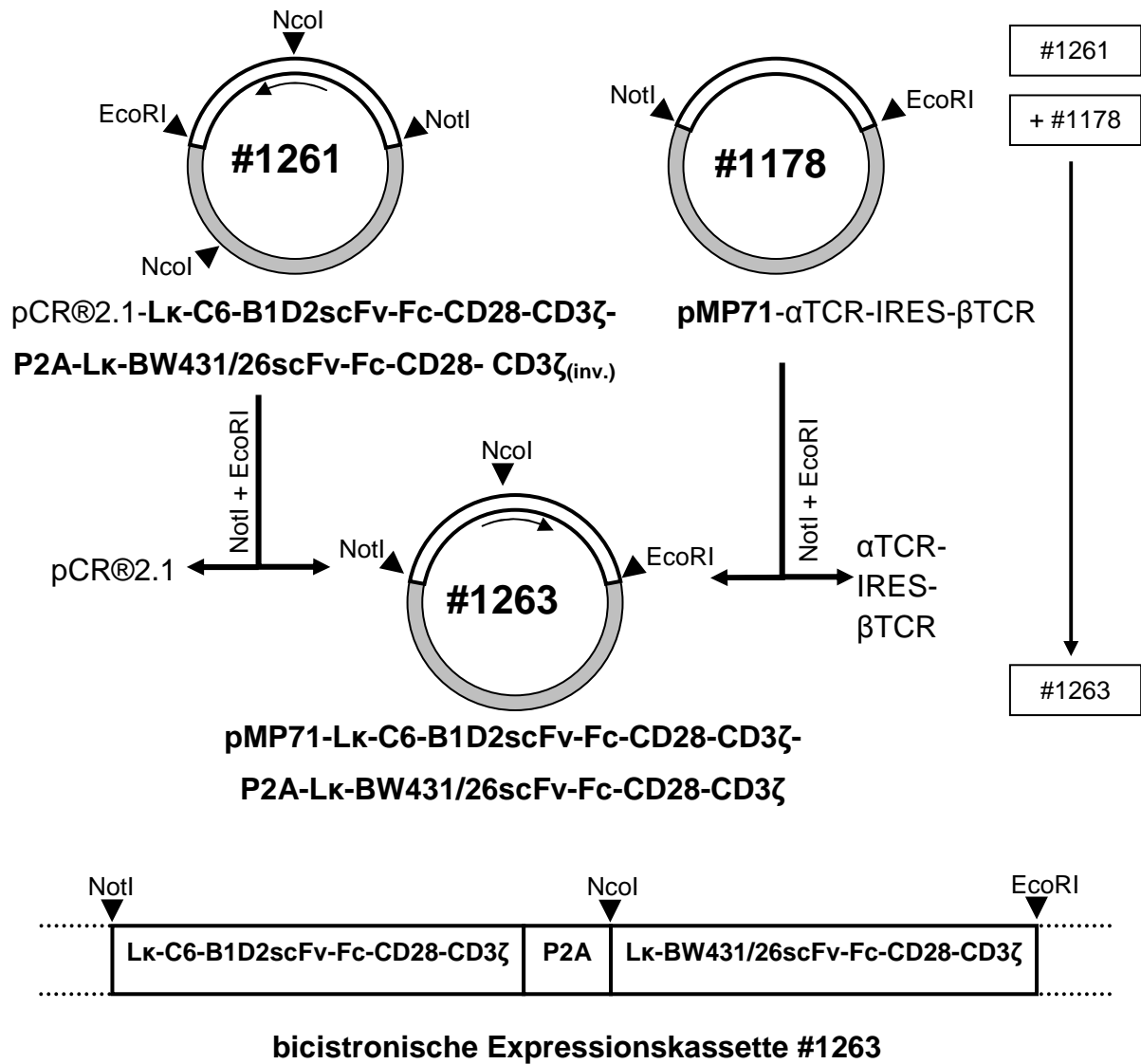
Um die Koexpression zweier unabhängiger chimärer Antigen-Rezeptoren mit Spezifität für CEA (BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ ) und ErbB2 (C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ ) in T-Lymphozyten zu gewährleisten, wurde die bicistronische Expressionskassette #1263 generiert. Innerhalb der bicistronischen Expressionskassette wurde die CAR-DNS durch DNS für das P2A-Peptid verknüpft. Zur Zusammensetzung der DNS-Sequenz der beiden Immunrezeptoren wurden die Nukleinsäuresequenzen der CAR #1145 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  mittels der DNS für das P2A-Peptid verknüpft. Aufgrund der hohen Homologie der verwendeten DNS-Sequenzen die bicistronische Expressionskassette über mehrere Zwischenschritte rekombiniert. Im Folgenden werden diese Schritte beschrieben und an einem Klonierungsschema verdeutlicht (Abb.33).

Im ersten Schritt wurde die DNS für den CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  aus dem Plasmid pBullet mit Hilfe des 5'-Oligonukleotids „Not-noNcoI-Lk-S“, welches mit der DNS des Kappa Signalpeptids hybridisiert und des 3'-Oligonukleotids „Zeta-P2A-NcoI-AS“, welches mit der DNS der intrazellulären CD3 $\zeta$ -Domäne hybridisiert, mittels PCR amplifiziert. Dabei kodiert der nicht hybridisierende Teil des verwendeten 3'-Oligonukleotids für das P2A-Peptid, sodass die amplifizierte DNS ein Fusionsprodukt für die CAR- und die 3-terminale P2A-Sequenz kodierte. Unter Verwendung einer high-fidelity Taq-Polymerase, welche während der PCR-Reaktion 3'-Adeninüberhänge generierte, wurde die Möglichkeit geschaffen, die amplifizierte DNS in den pCR2.1 Klonierungsvektor zu ligieren, da dieser über 5'-Thyminüberhänge verfügt. Erhaltene Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNS-Sequenzierung verifiziert. Die identifizierte DNS wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und EcoRI gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor #965 pCR2.1-CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  ligiert. Dabei wurde das Insert CD3 $\zeta$ TM-CD28-CD3 $\zeta$  des Vektors #965 verworfen und die DNS für das CAR-P2A Fusionskonstrukt Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A invers inseriert, so dass eine von zwei EcoRI-Restriktionsschnittstelle deletiert wurde.

Dieser Schritt war für die spätere Fusion mit der DNS des zweiten CAR notwendig. Nach der Ligation der DNS wurde dieses Zwischenprodukt durch eine partielle Restriktionsspaltung mit den Enzymen NcoI und EcoRI im Verhältnis 1:10 gespalten, so dass einige Nukleotide am 3'-Ende der DNS für Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A deletiert wurden. Gleichzeitig wurde die DNS für den CAR Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  aus dem ebenso gespaltenen Vektor #1145 pQXCIN an das 3'-Ende der DNS für Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A inseriert. In diesem Zwischenprodukt mit inverser Orientierung wurde die DNS für die gesamte bicistronische Expressionskassette fusioniert. In einem letzten Schritt wurde die fusionierte DNS der bicistronischen Expressionskassette mittels Spaltung durch die Restriktionsendonukleasen NotI und EcoRI in den retroviralen Vektor pMP71 überführt. Die annotierte DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassette befindet sich im Anhang (S.170).







**Abbildung 33: Klonierung der bicistronischen Expressionskassette Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ-P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 in pMP71 (#1263)**

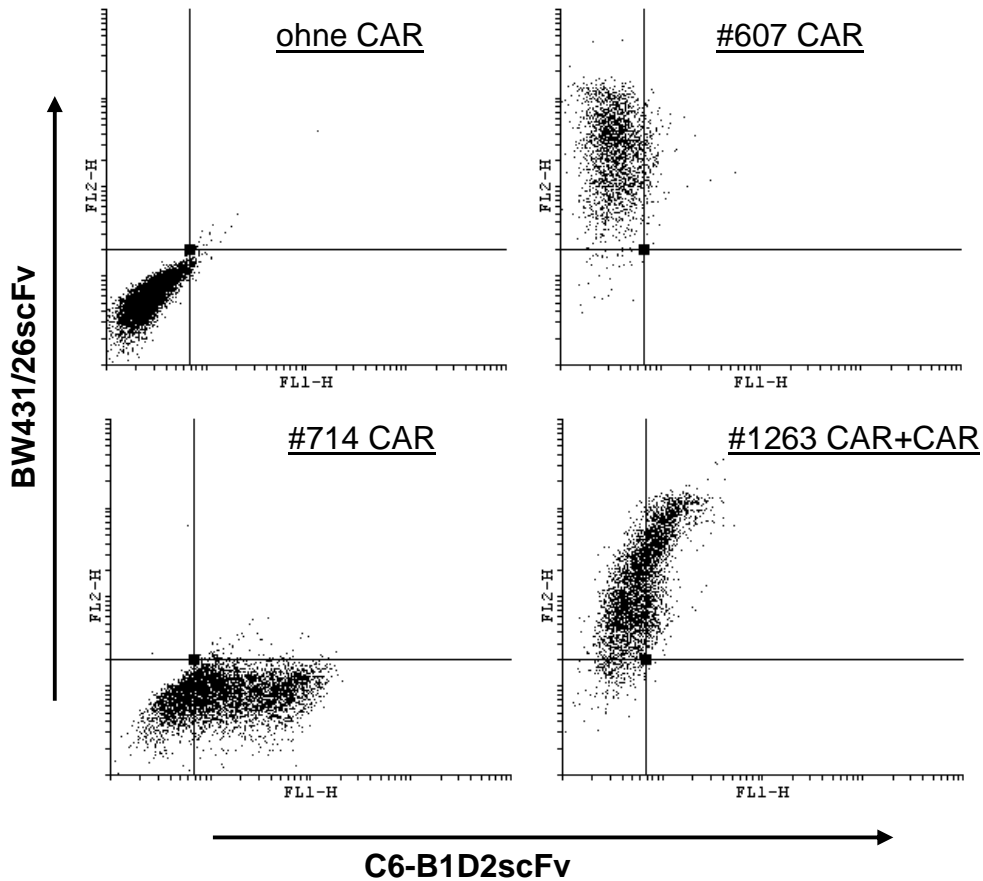
Die DNS für den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ wurde mittels PCR aus dem Plasmid #714 amplifiziert und 3'-terminal mit der DNS für P2A verknüpft. Das DNS-Fragment wurde mit Hilfe des TA-Cloning® in das lineare Plasmid pCR®2.1 ligiert. Über mehrere Klonierungsschritte wurden durch Inversion des Inserts Schnittstellen deletiert und die DNS für den CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ inseriert. Die bicistronische Expressionskassette #1263, die für die beiden P2A-verknüpften CAR kodiert, wurde in den retroviralen Expressionsvektor pMP71 ligiert.

## 4.12 Funktionelle Charakterisierung koexprimierter CAR #1263

### 4.12.1 Koexpression der CAR

Zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden 293T Zellen mit dem retroviralen bicistronischen Vektor #1263 transfiziert und die Bindedomänen der CAR auf der Oberfläche nachgewiesen. Der Nachweis des CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  erfolgte durch Inkubation mit dem für die Bindedomäne BW431/26 spezifischen Antikörper BW2064/399 und der Detektion mit dem Maus-IgG<sub>1</sub>-spezifischen, PE-gekoppelten Antikörper. Der ErbB2-spezifische CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurde mit dem Fusionsprotein #1192 ErbB2-eGFP nachgewiesen. Als Kontrolle dienten 293T Zellen, die mit der DNS für nur jeweils einen der betreffenden CAR transfiziert waren sowie nicht modifizierte Zellen (Abb.34).

Transfektion der 293T Zellen mit dem retroviralen bicistronischen Vektor #1263 führte zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ . Im Vergleich dazu wurde bei 293T Zellen mit dem CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  ausschließlich die Bindedomäne BW431/26 und bei 293T Zellen mit dem CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  nur die Bindedomäne C6-B1D2 nachgewiesen. Bei nicht transfizierten 293T Zellen wurde keine CAR-Expression detektiert. Die Daten zeigen, dass die CAR mit Hilfe der bicistronischen Expressionskassette #1263 koexprimiert werden. Die Bindung der jeweiligen CAR an den BW2064/399 Antikörper bzw. das Fusionsprotein ErbB2-Fc beweist ihre Fähigkeit, ihr jeweiliges Antigen zu erkennen.

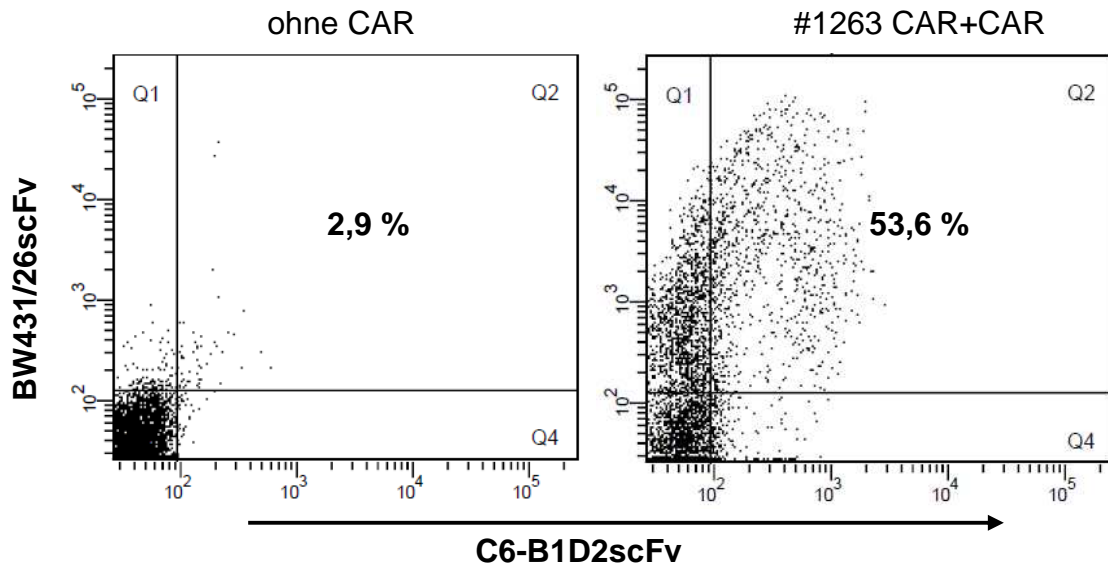


**Abbildung 34: Antigen-Bindung der koexprimierten CAR #1263**

Jeweils  $3 \times 10^5$  HEK 293T Zellen wurden mit DNS transfiziert, die für die CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ , #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  oder #1263 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  plus C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  kodiert. Zur Prüfung der anti-CEA Bindedomäne BW431/26 auf ihre Bindungsfähigkeit wurden die Zellen mit dem BW2064/399 Idiotyp-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) inkubiert und die Bindung durch den anti-Maus-IgG<sub>1</sub>-PE Antikörper (2,5  $\mu$ g/ml) nachgewiesen. Das Fusionsprotein ErbB2-eGFP (200  $\mu$ l Kulturüberstand) diente zum Nachweis der Bindungsfähigkeit der ErbB2-Bindedomäne C6-B1D2. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte 293T Zellen verwendet.

Die Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  in T-Zellen mit Hilfe des retroviralen Gentransfers der bicistronischen Expressionskassette #1263 wurde durch die durchflusszytometrische Analyse transduzierter T-Zellen nachgewiesen. Die T-Zellen wurden mit dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 inkubiert und dieser anschließend mit dem PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper detektiert. Nach erneuter Inkubation mit anti-PE Antikörper gekoppelten „MicroBeads“ erfolgte die Anreicherung PE-markierter Zellen durch magnetische Zellsortierung. Zum Nachweis des ErbB2-spezifischen CAR wurde dessen Bindedomäne C6-B1D2 mit dem Fusionsprotein ErbB2-eGFP inkubiert. Gleichzeitig wurden die T-Lymphozyten mit dem APC-gekoppelten anti-human-CD3 Antikörper markiert. Der CEA-spezifische CAR wurde durch die Markierung mit anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 und dem PE-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper detektiert (Abb.35).

In aktivierten, transduzierten T-Zellen wurde die Koexpression der CEA-spezifischen Bindedomäne des CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie die ErbB2-spezifische Bindedomäne des CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  detektiert. Somit wurde die Expression der bicistronischen Genkassette nachgewiesen. Die koexprimierten CAR haben die Fähigkeit bewahrt, ihr jeweiliges Antigen zu binden. Die Transduktionseffizienz des retroviralen Vektors #1263 betrug in einem repräsentativen Experiment ca. 10%. Durch magnetische Zellsortierung wurde dieser Anteil auf ca. 50% erhöht.



**Abbildung 35: Koexpression der CAR in humanen T-Zellen (#1263)**

T-Zellen wurden zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  durch den bicistronischen retroviralen Vektor #1263 transduziert. Der Anteil CAR-tragender Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment etwa 10%. Nach der Inkubation mit dem Antikörper BW2064/399 (10 $\mu$ g/ml), der gegen die CEA-spezifische Bindedomäne des CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  gerichtet ist und dem gegen diesen Antikörper gerichteten, PE-gekoppelten anti-Maus-IgG, Antikörper (2,5 $\mu$ g/ml) erfolgte eine Anreicherung CAR-tragender Zellen mittels magnetischer Zellsortierung. Die ErbB2-spezifische Bindedomäne C6-B1D2 des CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurde anschließend durch Inkubation mit dem ErbB2-eGFP Fusionsprotein (200 $\mu$ l Kulturüberstand) und zur Identifikation von T-Lymphozyten mit dem APC-gekoppelten anti-human-CD3 Antikörper (5 $\mu$ l) markiert. Die CD3 exprimierenden Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Nicht modifizierte T-Zellen dienten als Kontrolle.

#### 4.12.2 Aktivierung der T-Zellen mit koexprimierten CAR

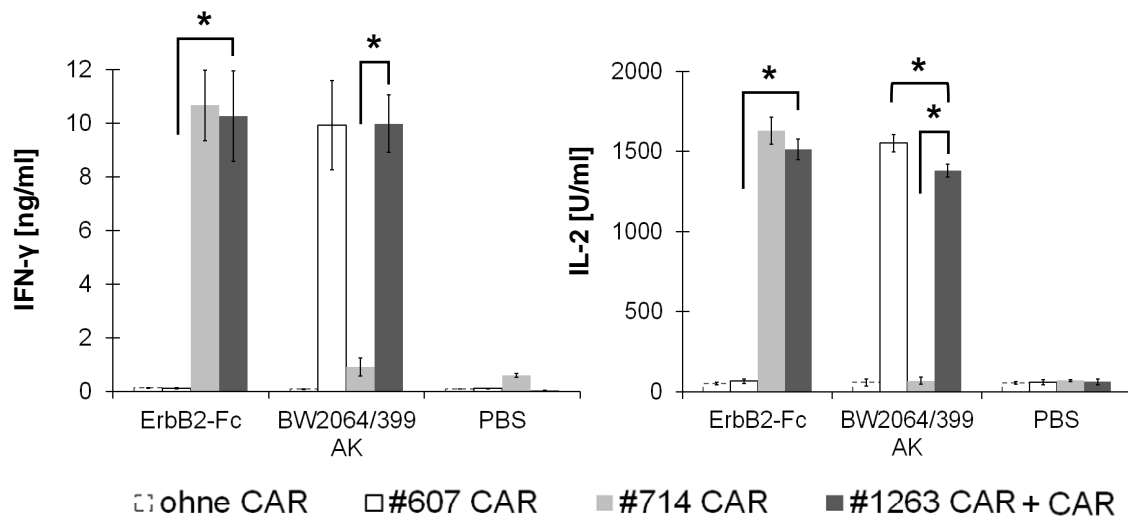
Zusätzlich zum Nachweis der Expression der extrazellulären Domänen sowie der Spezifität der CAR in der bicistronischen Expressionskassette #1263 wurde eine Charakterisierung der zellulären Aktivierung untersucht. T-Zellen wurden zur alleinigen Expression der CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie zur Koexpression dieser CAR mit der bicistronischen Expressionskassette #1263 transduziert und der Anteil der CAR-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurden die T-Zellen mit der Koexpression der CAR #1263 mit dem PE-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper markiert und mittels anti-PE „MicroBeads“ auf einen Anteil von etwa 50% angereichert. Die T-Zellen wurden 48h ohne IL-2 kultiviert, auf die gleiche Anzahl CAR-tragender Zellen normiert und ausplattiert. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Fusionsprotein ErbB2-Fc, das an den ErbB2-spezifischen CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  bindet und dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399, der an den CEA-spezifischen CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie zur Kontrolle mit PBS beschichtet. Nicht modifizierte T-Zellen wurden zur Kontrolle verwendet. Die T-Zell-Aktivierung wurde anhand der Konzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 bestimmt (Abb.36).

T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  (#1263) sezernierten sowohl durch Bindung an den BW2064/399 Antikörper als auch durch Bindung an das ErbB2-Fc Fusionsprotein IFN- $\gamma$  und IL-2. Die Kreuzvernetzung des CEA-spezifischen CAR durch den BW2064/399 Antikörper war genauso effizient wie die Kreuzvernetzung des ErbB2-spezifischen CAR durch das ErbB2-Fc Fusionsprotein. T-Lymphozyten mit dem CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden durch das Fusionsprotein ErbB2-Fc zu einer Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert. Bei Inkubation dieser Zellen mit dem BW2064/399 Antikörper wurde keine Zytokinsekretion nachgewiesen. Zur Aktivierung von T-Zellen mit diesem Antikörper war somit die Koexpression des CEA-spezifischen CAR notwendig. T-Zellen, welche den CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  exprimierten, wurden durch den BW2064/399 Antikörper zur Sekretion IFN- $\gamma$

und IL-2 aktiviert, jedoch nicht durch Bindung des ErbB2-Fc Fusionsproteins. Zur Aktivierung von T-Zellen mit dem Fusionsprotein war die Koexpression des ErbB2-spezifischen CAR notwendig. Die Inkubation der T-Zellen auf Kontrolloberflächen führte zu keiner Zytokin-Sekretion und somit war die T-Zell-Aktivierung Antigen-spezifisch. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 war CAR-spezifisch, da keines der Antigene die Aktivierung nicht modifizierter T-Zellen induzierte.

Es wurde gezeigt, dass T-Zellen durch die Expression einer bicistronischen Genkassette für zwei unabhängig funktionale CAR mit fusionierter CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne Spezifität für zwei Antigene erhalten. Durch die Verwendung der fusionierten CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomänen wird eine effizientere Komplementierung der CAR-Signale erreicht als durch die Koexpression zweier CAR mit ausschließlicher CD28 und CD3 $\zeta$  Signaldomäne. Die T-Zell-Aktivierung durch Kreuzvernetzung beider CAR ist gleich effizient. Die Effizienz eines CAR mit fusionierter CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne, T-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 zu induzieren, bleibt durch die Koexpression eines zweiten CAR solcher Konfiguration erhalten.





**Abbildung 36: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1263**

T-Zellen wurden zur Expression des CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und des CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie durch die bicistronische Expressionskassette #1263 zu ihrer Koexpression transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten betrug in einem repräsentativen Experiment 19% (#607), 23,8% (#714) und 9,7% (#1263). T-Zellen mit der CAR Koexpression wurden durch magnetische Zellsortierung auf einen Anteil von 50% angereichert. Mikrotiterplatten wurden mit dem BW2064/399 Antikörper (8 $\mu$ g/ml), dem ErbB2-Fc Fusionsprotein (8 $\mu$ g/ml) oder PBS beschichtet. Jeweils  $5 \times 10^4$  CAR-tragende Zellen wurden pro Vertiefung ausplattiert und für 72h kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In den Kulturüberständen wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Vierfachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

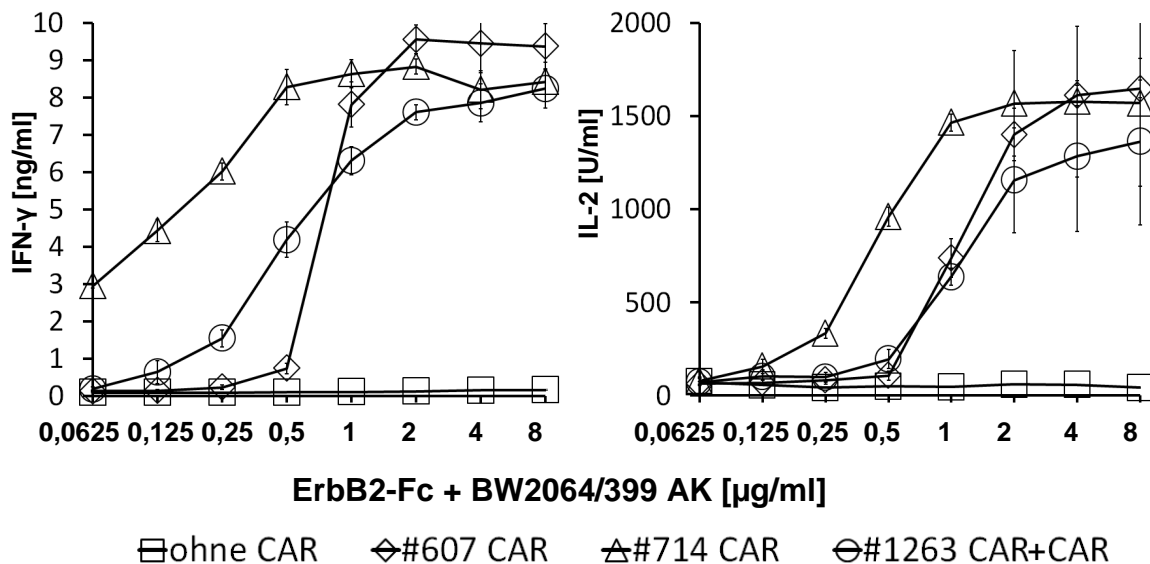
#### 4.13 Kinetik der CAR #607, #714 und #1263 vermittelten Aktivierung

Es wurde untersucht, wie die Expressionsdichte der Antigene CEA und ErbB2 die Aktivierung von T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  (#1263) oder mit der Expression der einzelnen CAR #714 oder #607 beeinflusst. Dazu wurden T-Zellen zur Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie zur Koexpression der beiden CAR durch die bicistronische Expressionskassette #1263 transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und T-Zellen mit der Koexpression der beiden CAR mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung auf einen Anteil von 50% angereichert. Dazu wurden die Zellen mit dem PE-gekoppelten anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper markiert und mit anti-PE „MicroBeads“ inkubiert. Die T-Zellen wurden 48h ohne IL-2 kultiviert und die gleiche Anzahl CAR-tragender Zellen auf beschichteten Platten inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht modifizierte T-Zellen. Mikrotiterplatten wurden mit dem anti-BW431/26 Idiotyp Antikörper BW2064/399 und dem ErbB2-Fc Fusionsprotein in einer Verdünnungsreihe beschichtet. Die Konzentrationen wurden so titriert, dass der BW2064/399 Antikörper und das ErbB2-Fc Fusionsprotein in jeder Vertiefung in gleichen Verhältnissen vorlagen. Die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung wurde durch die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 in den Kulturüberständen bestimmt. Als Maß für die Aktivierungsschwelle wurde die Konzentration der Antigene definiert, die zum Erreichen der halbmaximalen Konzentration der sezernierten Zytokine erforderlich war (Abb.37, Tab.4).

T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  (#1263) wurden durch die Bindung an das Fusionsprotein ErbB2-Fc und den BW2064/399 Antikörper zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 induziert. T-Lymphozyten mit dem CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden durch Inkubation mit dem Antikörper BW2064/399 und dem Fusionsprotein ErbB2-Fc zur Sekretion von IL-2 oder IFN- $\gamma$  aktiviert. T-Zellen mit dem CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden zur Sekretion

von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert, wenn sie mit dem BW2064/399 Antikörper und dem ErbB2-Fc Fusionsprotein inkubiert wurden. Die T-Zellen mit der alleinigen Expression des ErbB2-spezifischen CAR #714 wurden durch eine niedrigere Antigendichte zur halbmaximalen Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 stimuliert als T-Zellen mit den koexprimierten CAR. Dagegen ließen sich T-Zellen mit dem CEA-spezifischen CAR #607 durch eine etwa gleiche Antigendichte zur halbmaximalen IL-2 und IFN- $\gamma$  Sekretion aktivieren, wie T-Zellen mit der Koexpression beider CAR. Die maximal sezernierten Zytokin-Konzentrationen der T-Zellen mit der alleinigen Expression und der Koexpression der jeweiligen CAR unterschieden sich nicht. Nicht modifizierte T-Zellen wurden durch keines der Antigene zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert.

Anhand der ermittelten Zytokinkonzentrationen wurde nachgewiesen, dass die Aktivierungsschwelle von T-Zellen mit dem ErbB2-spezifischen CAR durch Koexpression des CEA-spezifischen CAR erhöht wird. Umgekehrt bewirkt die Koexpression des ErbB2-spezifischen CAR bei T-Zellen mit dem CEA-spezifischen CAR eine geringfügige Herabsetzung der Aktivierungsschwelle. Unter der Voraussetzung, dass beide CAR durch die bicistronische Expressionskassette in gleicher Dichte exprimiert werden und durch ein gleiche molare Konzentrationen der Antigene gleich stark kreuzvernetzt werden, bleibt die Effizienz, T-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 zu induzieren, jedoch erhalten.



**Abbildung 37: CAR #607, #714 und #1263 vermittelte T-Zell-Aktivierung**

T-Zellen wurden zur Expression der CAR #1156 BW431/26scFv-Fc-CD28, #710 C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ sowie durch die bicistronische Expressionskassette #1262 zur Koexpression der CAR transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt und betrug in einem repräsentativen Experiment 19% (#607), 23,8% (#714) und 9,7% (#1263). T-Zellen mit der CAR Koexpression wurden durch magnetische Zellsortierung auf einen Anteil von 50% angereichert. Mikrotiterplatten wurden mit dem BW2064/399 Antikörper und dem ErbB2-Fc Fusionsprotein in einer Verdünnungsreihe beschichtet. Jeweils  $5 \times 10^4$  CAR tragende Zellen wurden pro Vertiefung auf Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten für 72h kultiviert. Als Kontrolle wurden nicht modifizierte T-Zellen verwendet. In den Kulturüberständen der Kultivierung wurden die IFN-γ und IL-2 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Vierfachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. (→ Tab.4, S.135)

	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [Konz. Antigene]	Aktivierungsschwelle IL-2 [Konz. Antigene]	Maximal sezernierte IFN- $\gamma$ Konz.	Maximal sezernierte IL-2 Konz.
ohne CAR	-	-	-	-
#607 CAR	740 ng/ml	1,09 $\mu$ g/ml	9.6 ng/ml	1700 U/ml
#714 CAR	120 ng/ml	430 ng/ml	8,8 ng/ml	1600 U/ml
#1263 CAR+CAR	520 ng/ml	1,04 $\mu$ g/ml	8,3 ng/ml	1400 U/ml

①
②
③
④
⑤

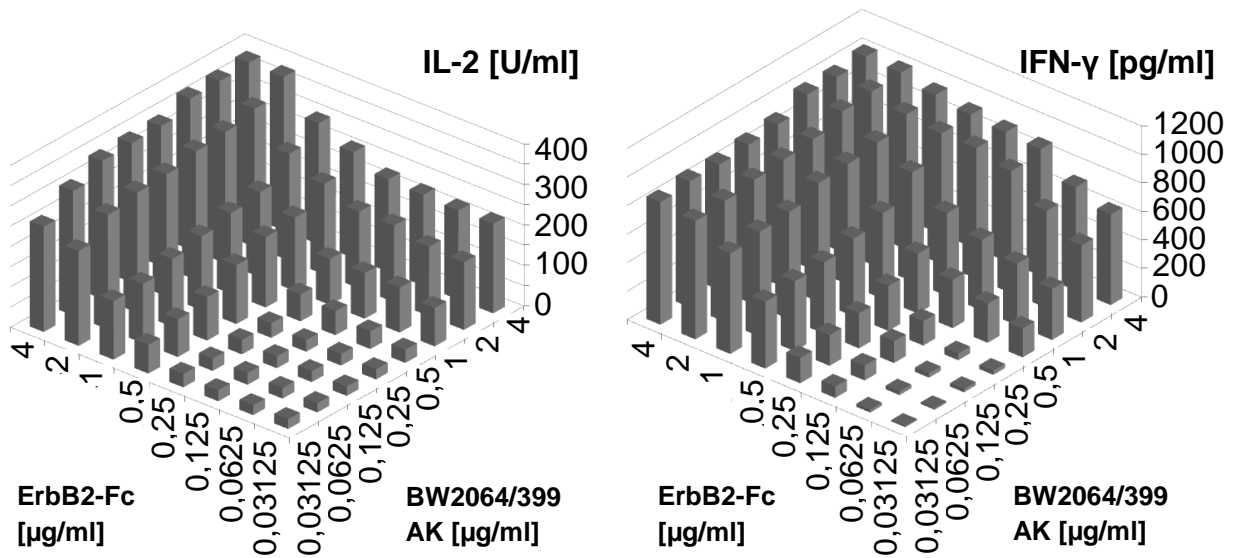
**Tabelle 4: Antigenkonzentration zur CAR #607, #714 und #1263 vermittelten T-Zell-Aktivierung**

Wertetabelle der Aktivierungsdaten aus Abbildung 37. In den Spalten 2 und 3 sind jeweils die Antigen-Konzentrationen angegeben, die zum Erreichen der halbmaximalen IFN- $\gamma$  Sekretion (Spalte 2) oder der halbmaximalen IL-2 Sekretion (Spalte 3) notwendig waren. Spalte 4 und 5 stellen die maximale erreichten Zytokinkonzentrationen für die Antigen-spezifische Aktivierung dar. Die jeweils zum Erreichen der halbmaximalen Zytokinkonzentration erforderliche Antigendichte wurde anhand logarithmischer Regression des linearen Bereichs berechnet.

Es sollte untersucht werden, wie sich ein verändertes molares Verhältnis beider Antigene auf die Aktivierung der T-Zelle mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  ausprägt. Das Fusionsprotein ErbB2-Fc und der Antikörper BW2064/399 wurden dazu in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen auf Mikrotiterplatten beschichtet. Der Anteil der T-Zellen mit der Koexpression der CAR durch die bicistronische Expressionskassette #1263 wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die gleiche Anzahl CAR-tragender T-Lymphozyten auf den beschichteten Mikrotiterplatten kultiviert. Die T-Zell-Aktivierung wurde im Anschluss anhand der IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen im Kulturüberstand ermittelt. Die zum Erreichen der jeweils halbmaximalen Zytokin-Konzentration erforderlichen Konzentrationen der beschichteten Antigene wurden als Maß für die Aktivierungsschwelle definiert (Abb.38 und 39, Tab.5).

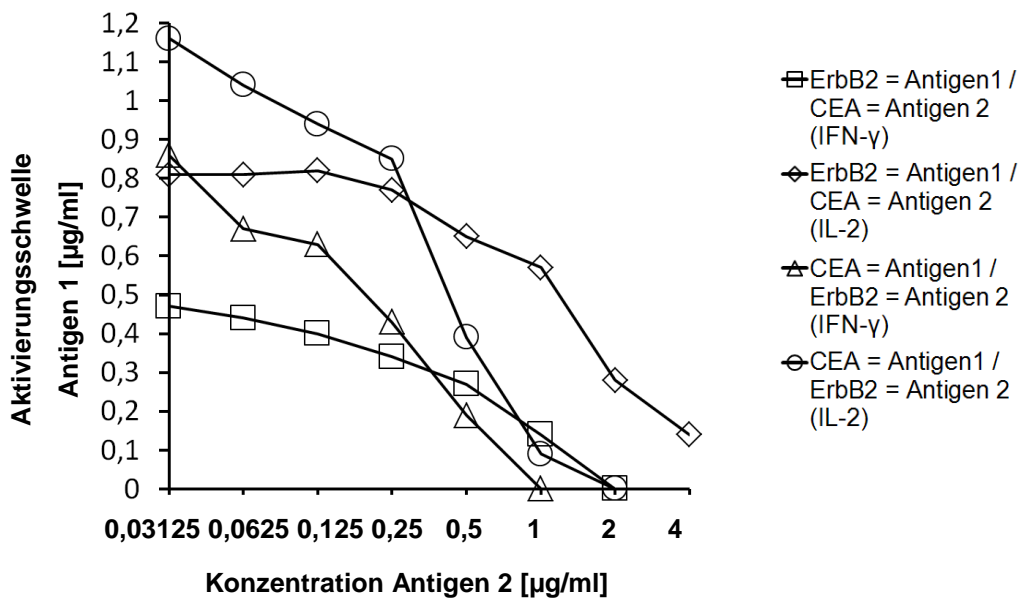
T-Zellen mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden durch die beschichteten Antigene zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert und die maximal sezernierten Zytokin-Konzentrationen durch die Anwesenheit des zweiten Antigens konzentrationsabhängig gesteigert. Zusätzliche Bindung an das Fusionsprotein ErbB2-Fc, das den anti-ErbB2-CAR kreuzvernetzt, steigerte die Zytokin-Sekretion effizienter als Bindung an den Antikörper BW2064/399, der den anti-CEA-CAR kreuzvernetzt. Die zum Erreichen der halbmaximalen Zytokin-Konzentration erforderliche Antigenkonzentration wurde durch Anwesenheit des zweiten Antigens konzentrationsabhängig verringert. Kostimulation mit dem Fusionsprotein ErbB2-Fc verringerte die Aktivierungsschwelle effizienter als Kostimulation mit dem Antikörper BW2064/399.

Es wurde zuvor nachgewiesen, dass die Aktivierungsschwelle von T-Zellen mit der Expression des ErbB2-spezifischen CAR mit fusionierter CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne durch Koexpression des CEA-spezifischen CAR mit fusionierter CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne erhöht wird. Durch zunehmende Expressionsdichte eines der Antigene wird diese jedoch herabgesetzt. Da beide CAR über eine fusionierte CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne verfügen, wird die Komplementation der CAR-Signale zur Induktion kostimulatorischer Effektorfunktionen durch die Anwesenheit eines Antigens gewährleistet. Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung wird mit zunehmender Expressionsdichte des zweiten Antigens gesteigert. Die Herabsetzung der Aktivierungsschwelle und die Steigerung der Zytokin-Sekretion werden durch zusätzliche Kreuzvernetzung des ErbB2-spezifischen CAR stärker ausgeprägt als die zusätzliche Kreuzvernetzung des CEA-spezifischen CAR.



**Abbildung 38: Zytokin-Sekretion der T-Zellen mit koexprimierten CAR #1263 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration**

Jeweils  $3 \times 10^4$  T-Zellen mit der Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurden auf Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten für 48h kultiviert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Zellen betrug in einem repräsentativen Experiment 34,7%. In den Kulturüberständen wurden die IFN- $\gamma$  und IL-2 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. (→ Abb. 39 und Tab.5, S.138)



**Abbildung 39: Aktivierungsschwelle der T-Zellen mit den koexprimierten CAR #1263 in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration**

Die Berechnung der exemplarischen Aktivierungsschwellen erfolgte durch logarithmische Regression des linearen Bereichs der entsprechenden Aktivierungsdaten aus Abbildung 38 (→ Tab.5, S.138).

Konzentration des jeweils zweiten Antigens	CEA		ErbB2	
	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [BW2064/399]	Aktivierungsschwelle IL-2 [BW2064/399]	Aktivierungsschwelle IFN- $\gamma$ [ErbB2-Fc]	Aktivierungsschwelle IL-2 [ErbB2-Fc]
31,25 ng/ml	0,86 $\mu$ g/ml	1,16 $\mu$ g/ml	0,47 $\mu$ g/ml	0,81 $\mu$ g/ml
62,5 ng/ml	0,67 $\mu$ g/ml	1,04 $\mu$ g/ml	0,44 $\mu$ g/ml	0,81 $\mu$ g/ml
125 ng/ml	0,63 $\mu$ g/ml	0,94 $\mu$ g/ml	0,4 $\mu$ g/ml	0,82 $\mu$ g/ml
250 ng/ml	0,43 $\mu$ g/ml	0,85 $\mu$ g/ml	0,34 $\mu$ g/ml	0,77 $\mu$ g/ml
0,5 $\mu$ g/ml	0,19 $\mu$ g/ml	0,39 $\mu$ g/ml	0,27 $\mu$ g/ml	0,65 $\mu$ g/ml
1 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	90 ng/ml	0,14 $\mu$ g/ml	0,57 $\mu$ g/ml
2 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	< 31,25 ng/ml	< 31,25 ng/ml	0,28 $\mu$ g/ml
4 $\mu$ g/ml	< 31,25 ng/ml	< 31,25 ng/ml	< 31,25 ng/ml	0,14 $\mu$ g/ml
①	②	③	④	⑤

**Tabelle 5: Schwellenwerte der Antigenkonzentrationen zur Aktivierung der T-Zellen mit den koexprimierten CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$**

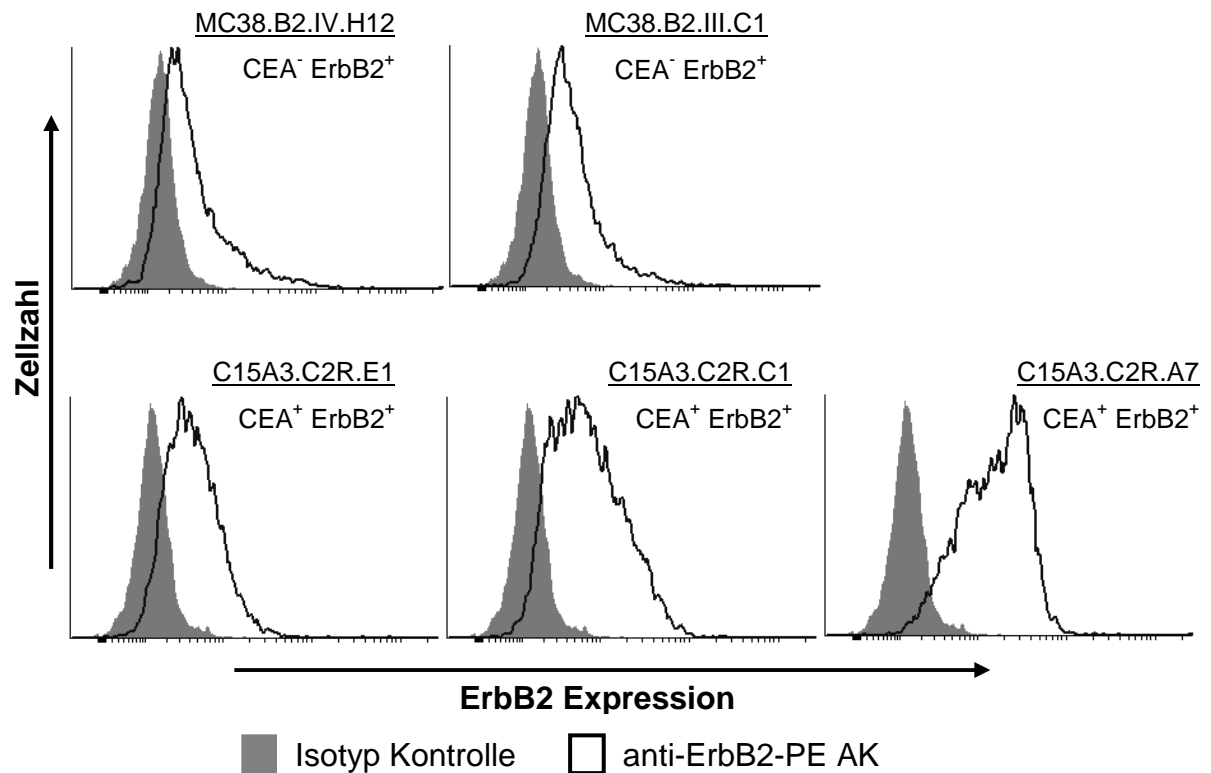
Wertetabelle der Aktivierungsdaten aus Abbildung 39. In den Spalten 2 bis 5 sind jeweils die Antigen-Konzentrationen angegeben, die zum Erreichen der halbmaximalen IFN- $\gamma$  Sekretion (Spalte 2 und 4) oder der halbmaximalen IL-2 Sekretion (Spalte 3 und 5) notwendig waren. Die Konzentration des jeweils zweiten Antigens wird in der Spalte 1 angegeben. Spalte 2 und 3 stellen die Schwellenwerte für die CEA-spezifische Aktivierung dar, Spalte 4 und 5 stellen die Schwellenwerte für die ErbB2-spezifische Aktivierung dar.



#### **4.14 Generierung von Tumorzelllinien mit unterschiedlicher ErbB2 Expressionsdichte**

Zur Untersuchung, wie die unterschiedliche Expressionsdichte eines Antigens die Aktivierung der T-Lymphozyten mit zwei unabhängigen CAR beeinflusst, wurden Derivate der Tumorzelllinie MC38 isoliert, die sich in der Expressionsdichte des jeweiligen Antigens unterschieden. Dieses wurde erreicht durch Einzelzellklonierungen der Zelllinien MC38.B2 (CEA<sup>-</sup>/ErbB2<sup>+</sup>) und C15A3.C2R (CEA<sup>+</sup>/ErbB2<sup>+</sup>). Zur Detektion von ErbB2 wurden Zellen mit dem PE-gekoppelten Maus anti-ErbB2 Antikörper markiert sowie zum Vergleich mit einem PE-gekoppelten Isotyp-Kontrollantikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb.43).

Es wurden drei Klone der Zelllinie C15A3.C2R identifiziert, die bei gleicher CEA Expressionsdichte humanes ErbB2 in unterschiedlicher Dichte exprimierten. Zwei Klone der CEA negativen Zelllinie MC38.B2, die eine unterschiedliche Expressionsdichte des humanen ErbB2 aufwiesen, wurden ebenfalls identifiziert. Der Klon III.C1 der Zelllinie MC38.B2 exprimierte ErbB2 in gleicher Dichte wie der Klon E1 der Zelllinie C15A3.C2R. Die Klone E1, C1 und A7 der Linie C15A3.C2R und der Klon III.C1 Zelllinie MC38.B2 wurden für weitere Untersuchungen verwendet.



**Abbildung 40: ErbB2 Expression der MC38.B2 und C15A3.C2R Subklone**

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellklonen der Linien MC38 und C15A3 zeigt die transgene ErbB2 Expression. Der Nachweis der ErbB2 Expression erfolgte mittels Markierung mit dem PE-gekoppelten anti-human-ErbB2 Antikörper (5  $\mu$ l). Als Isotypkontrolle diente die Inkubation mit einem PE-gekoppelten Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (5 $\mu$ l) irrelevanter Spezifität.

## 4.15 Zell-vermittelte Aktivierung durch die koexprimierten CAR #1263

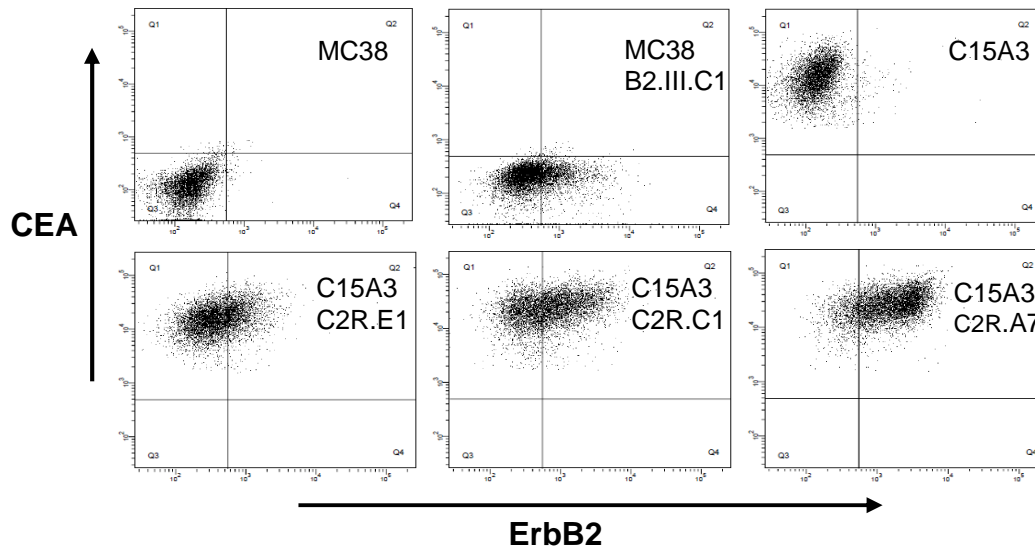
### 4.15.1 Antigen-spezifische Zytolyse von Tumorzellen

Im folgenden Experiment wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit des Antigens CEA auf die Aktivierung von T-Zellen mit der Koexpression zweier unabhängig funktionaler CAR durch Kontakt mit Tumorzellen ausprägt, die ErbB2 in unterschiedlicher Dichte exprimieren. Damit sollte die Aktivierung gegenüber gesundem Gewebe mit geringer Antigen-Expression simuliert und die Vorteile der Erkennung von Antigenmustern charakterisiert werden. T-Zellen wurden zur Koexpression der CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  mit der bicistronischen Expressionskassette #1263 ausgestattet sowie als Vergleich zur alleinigen Expression der jeweiligen CAR #607 und #714 transduziert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die koexprimierenden T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung auf einen Anteil von etwa 50% angereichert. Die T-Zellen wurden 48h ohne IL-2 kultiviert und die gleiche Anzahl CAR-tragender Zellen in einer Verdünnungsreihe zusammen mit Tumorzellen kokultiviert (Abb. 41). Als Kontrolle dienten Zellen der Linie MC38, die weder CEA noch ErbB2 exprimierten. Die CAR-vermittelte Zytotoxizität modifizierter T-Zellen wurde mittels eines XTT-basierenden Viabilitätstests bestimmt (Abb.42).

T-Lymphozyten mit der gleichzeitigen Expression der anti-CEA und anti-ErbB2 CAR #1263 wurden nach Bindung an CEA und ErbB2 koexprimierende Tumorzellen konzentrationsabhängig zur spezifischen Zytolyse der jeweiligen Zielzelllinien aktiviert. Abhängig von der ErbB2 Expressionsdichte wurde eine Steigerung der Zytotoxizität beobachtet. T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR wiesen bei Tumorzellen mit den koexprimierten Antigenen CEA und ErbB2 stets eine höhere Zytotoxizität auf, als T-Lymphozyten mit alleiniger Expression des ErbB2-spezifischen CAR #714. Das zeigt, dass T-Zellen mit der Koexpression zweier unabhängig funktionaler CAR Antigenmuster erkennen. Tumorzellen mit koexprimierten Antigenen werden effizienter durch T-Zellen mit koexprimierten CAR unterschiedlicher Spezifität lysiert als T-Zellen, die CAR-

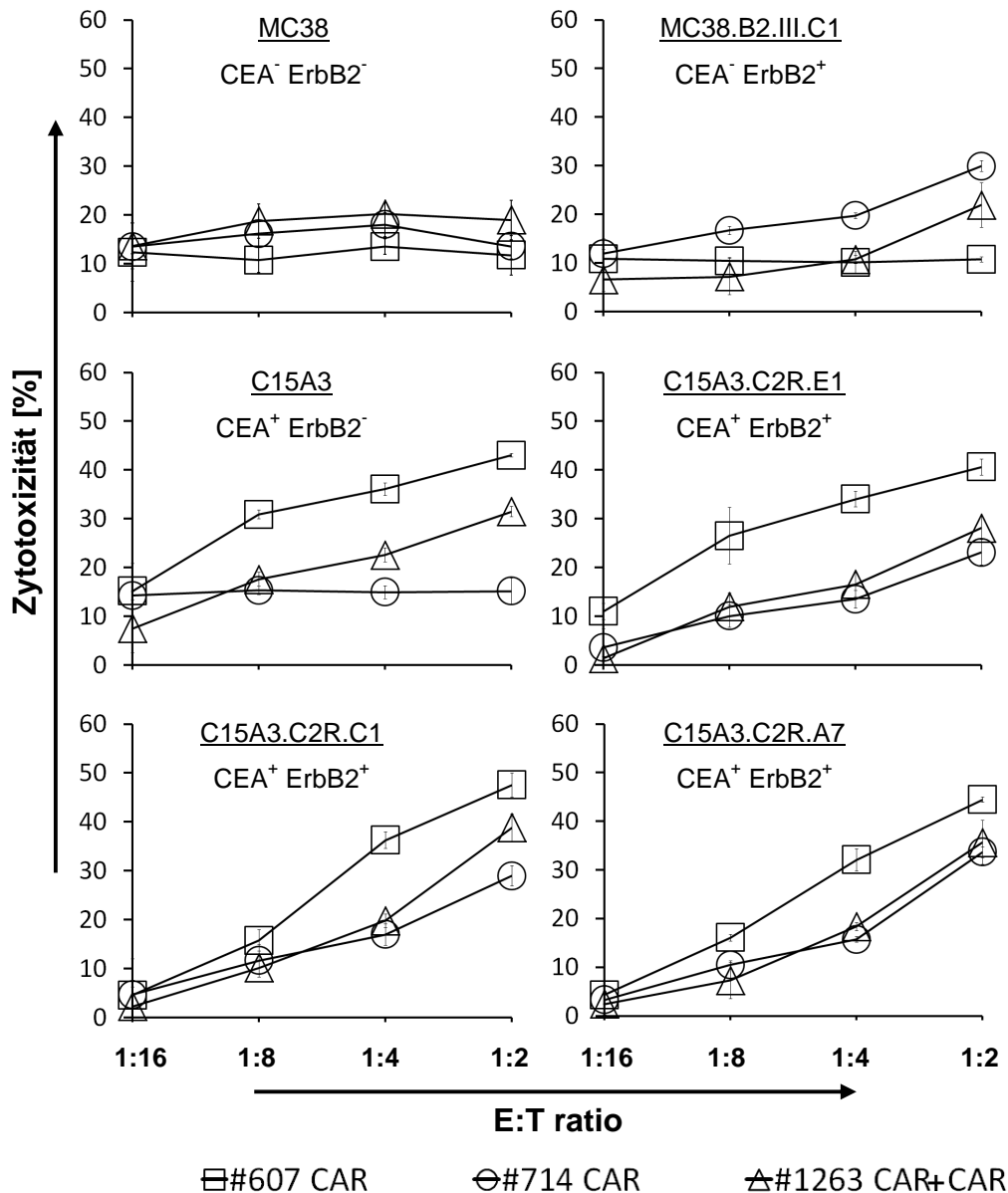
vermittelte Spezifität für ein Antigen aufweisen. T-Lymphozyten mit der Koexpression der CAR wurden durch Tumorzellen, die ausschließlich CEA oder ErbB2 exprimierten weniger stark zur Zytolyse aktiviert als T-Lymphozyten mit den jeweils einzelnen CAR. Es wurde damit nachgewiesen, dass die Koexpression zweier unterschiedlich spezifischer CAR mit CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne Tumorzellen mit einem Antigen weniger effizient erkennen und lysieren als T-Zellen, die nur einen CAR bestimmter Spezifität exprimieren. T-Lymphozyten mit dem anti-ErbB2 CAR #714 wurden durch Bindung an ErbB2 exprimierende Tumorzellen konzentrationsabhängig zur Zytolyse der jeweiligen Zielzellen aktiviert. Dabei wurde ebenfalls eine Zunahme der Zytotoxizität mit erhöhter ErbB2 Expressionsdichte beobachtet. Insbesondere Tumorzellen, die ausschließlich ErbB2 in niedriger Dichte exprimierten, wurden durch T-Zellen mit dem ErbB2-spezifischen CAR #714 effizienter lysiert als durch koexprimierende T-Zellen. T-Zellen mit der Koexpression der beiden CAR lysierten dagegen Tumorzellen effizienter als T-Zellen mit dem anti-ErbB2 CAR, wenn die Tumorzellen CEA koexprimierten. T-Zellen, die CAR koexprimieren, erkennen und lysieren Zellen mit niedriger Antigenexpression weniger gut, wenn ausschließlich ein Antigen exprimiert wird. Sobald das zweite Antigen koexprimiert wird, lysieren T-Zellen mit der CAR Koexpression die Tumorzellen effizienter als T-Zellen mit der alleinigen Expression des spezifischen CAR. T-Lymphozyten mit dem CEA-spezifischen CAR #607 wurden durch Kontakt mit CEA<sup>+</sup> Tumorzellen konzentrationsabhängig zur spezifischen Zytolyse der jeweiligen Zielzellen induziert. Aufgrund der hohen Expressionsdichte des Antigens CEA auf der Oberfläche der Tumorzellen, lysierten diese T-Zellen Antigen-positive Zellen effizienter als T-Zellen mit der Koexpression der CAR. Das bedeutet, dass T-Zellen mit der alleinigen Expression eines CAR Zellen wirksam erkennen und lysieren, die das Antigen in ausreichend hoher Dichte exprimieren. Es erfolgte keine Zytolyse bei Kokultivierung von T-Lymphozyten mit dem ErbB2-spezifischen CAR #714 mit der CEA<sup>+</sup> und ErbB2<sup>-</sup> Zelllinie C15A3. Umgekehrt lysierten T-Lymphozyten mit dem CEA-spezifischen CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  die CEA<sup>-</sup> und ErbB2<sup>+</sup> Zelllinie MC38.B2.III.C1 die T-Lymphozyten mit dem CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ . Die Zytolyse von Tumorzellen war Antigen-spezifisch, da die CEA<sup>-</sup>

und ErbB2<sup>-</sup> Zelllinie MC38 nicht durch CAR-exprimierende T-Zellen lysiert wurden.



**Abbildung 41: Antigenexpression der verwendeten Zielzellen**

Durchflusszytometrische Analyse der zur Kokultur eingesetzten Zielzellen: alle Zellklone sind Derivate der Linie MC38 mit transgener Expression von ErbB2 und/oder CEA. Die CEA Expression wurde durch Inkubation mit Kulturüberstand, welcher das Antikörper-Fusionsprotein SCA431scFv-Fc (#978; 50  $\mu$ l) enthielt und anschließender Detektion mit dem PE-gekoppelten Ziege anti-human-IgG<sub>1</sub> (2,5  $\mu$ g/ml) Antikörper bestimmt. Der Nachweis der ErbB2 Expression erfolgte durch Bindung des anti-human-ErbB2 Antikörpers (2  $\mu$ g/ml) und Detektion durch den FITC-gekoppelten anti-Maus-IgG<sub>1</sub> Antikörper (5  $\mu$ g/ml).



**Abbildung 42: Antigen-vermittelte Zytolyse von Tumorzellen mit unterschiedlicher Antigenexpression**

T-Zellen wurden mit DNS für den anti-CEA CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ , den anti-ErbB2 CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie beide CAR (#1263) transduziert und Zellen mit den koexprimierten CAR #1263 mittels magnetischer Zellsortierung auf einen Anteil von etwa 50% angereichert. Jeweils  $1,25 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  CAR-tragende T-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe zusammen mit  $2 \times 10^4$  Tumorzellen für 48h kokultiviert. Der Anteil der CAR-tragenden T-Lymphozyten betrug in einem repräsentativen Experiment 20,3% (#607), 22,5% (#714) und 50% (#1263). Die Zytotoxizität der Effektorzellen wurde mittels des XTT-Viabilitätstests bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die E:T ratio entspricht dem Verhältnis von Effektorzellen (CAR-tragenden T-Zellen) zu Tumorzellen bei der jeweiligen Kokultivierung.

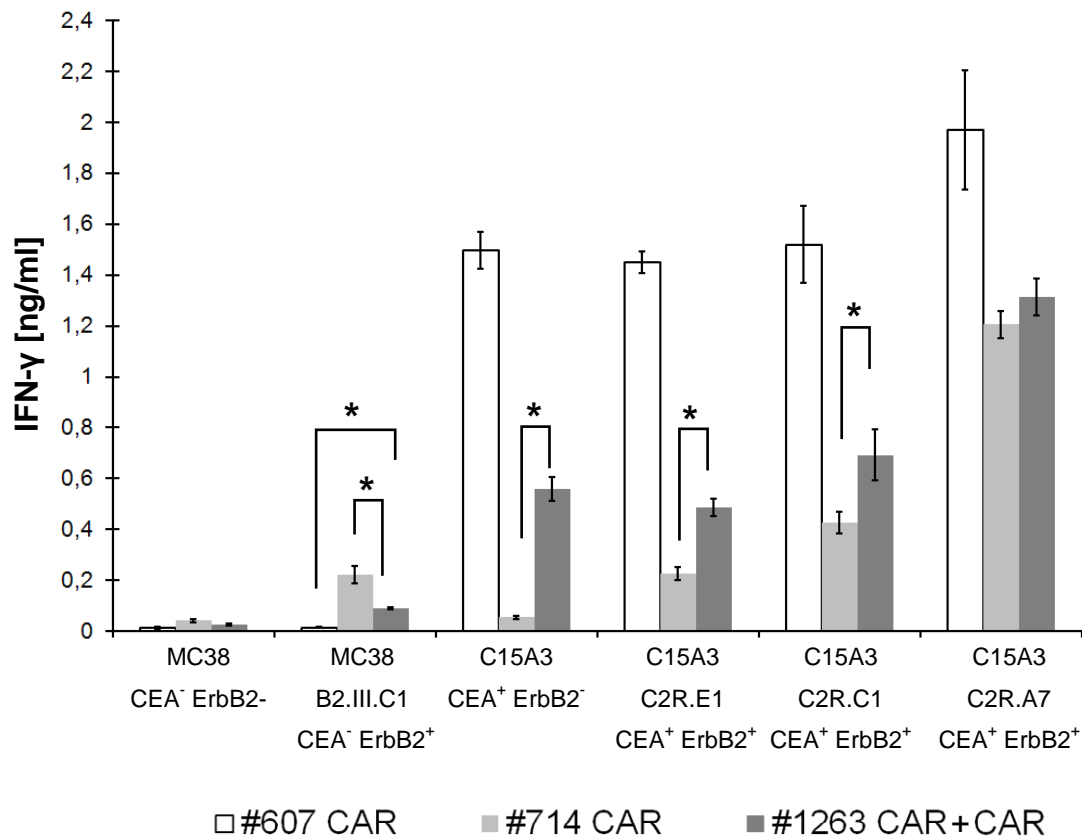
#### 4.15.2 CAR-vermittelte IFN- $\gamma$ -Sekretion

T-Lymphozyten mit der Koexpression der anti-CEA und anti-ErbB2 CAR #1263 wurden durch Zielzellen mit den koexprimierten Antigenen CEA und ErbB2 zur Sekretion von IFN- $\gamma$  aktiviert (Abb.43). Dabei wurde die Konzentration des sezernierten IFN- $\gamma$  mit steigender ErbB2 Expressionsdichte auf den Zielzellen erhöht. Außerdem wiesen T-Lymphozyten mit koexprimierten CAR bei Kokultur mit CEA<sup>+</sup> und ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen stets eine stärkere IFN- $\gamma$  Sekretion auf als T-Lymphozyten mit der alleinigen Expression des ErbB2-spezifischen CAR. T-Zellen mit der Koexpression zweier unabhängiger CAR erkennen demnach Antigenmuster und werden durch Kontakt mit Tumorzellen, welche die Antigene koexprimieren stärker zur IFN- $\gamma$  Sekretion aktiviert als T-Zellen, die lediglich ein Antigen erkennen. T-Lymphozyten mit den koexprimierten CAR wurden durch Tumorzellen, die ausschließlich CEA oder ErbB2 exprimierten weniger stark zur IFN- $\gamma$  Sekretion induziert als T-Lymphozyten mit den jeweils einzelnen CAR. Das zeigt, dass Tumorzellen ohne Antigenmuster von T-Zellen, die zwei unterschiedlich spezifische CAR mit CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne koexprimieren, weniger effizient erkannt werden und als von T-Zellen, die einen CAR bestimmter Spezifität exprimieren. T-Lymphozyten, die mit dem anti-ErbB2 CAR #714 ausgestattet waren, wurden durch Kontakt mit ErbB2 exprimierenden Tumorzellen zur IFN- $\gamma$  Sekretion aktiviert. Mit erhöhter ErbB2 Expressionsdichte wurde eine Steigerung der T-Zell-Aktivierung ermittelt. Bei Bindung von Tumorzellen, die ausschließlich ErbB2 in niedriger Dichte exprimierten, wurden die T-Zellen mit der alleinigen Expression des anti-ErbB2 CAR #714 effizienter aktiviert als die T-Zellen mit der Koexpression beider CAR. Hingegen aktivierte die Bindung von Tumorzellen mit dergleichen ErbB2 Expressionsdichte, aber zusätzlicher CEA Expression, T-Zellen mit den koexprimierten CAR effizienter als mit der alleinigen Expression des anti-ErbB2 CAR #714. Die Daten zeigen, dass T-Zellen, die CAR unterschiedlicher Spezifität und CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne koexprimieren, durch Zellen mit niedriger Antigenexpression weniger gut aktiviert werden, wenn ausschließlich ein Antigen exprimiert wird. Bei Koexpression der CEA und ErbB2 spezifischen CAR werden T-Zellen durch CEA<sup>+</sup> und ErbB2<sup>+</sup> Tumorzellen effizienter aktiviert als T-Zellen mit der alleinigen Expression eines spezifischen CAR. T-

Lymphozyten mit dem CEA-spezifischen CAR #607 wurden durch Bindung an CEA exprimierende Tumorzellen zur Antigen-vermittelten IFN- $\gamma$  Sekretion induziert. Die hohe CEA-Expressionsdichte führte zu einer stärkeren Aktivierung T-Zellen mit dem CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  als T-Zellen mit den koexprimierten der anti-CEA und anti-ErbB2 CAR. T-Zellen mit der alleinigen Expression eines CAR Zellen werden demnach durch Tumorzellen, die das Antigen in ausreichend hoher Dichte exprimieren, wirksam aktiviert. Durch die Kokultivierung von T-Lymphozyten mit dem ErbB2-spezifischen CAR #714 mit der CEA-positiven und ErbB2-negative Zelllinie C15A3 wurde keine Zytokin-Sekretion induziert. T-Lymphozyten, die den CEA-spezifischen CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  exprimierten, wurden durch die CEA<sup>-</sup> und ErbB2<sup>+</sup> Zelllinie MC38.B2.III.C1 ebenfalls nicht aktiviert. Die CEA<sup>-</sup> und ErbB2<sup>-</sup> Zelllinie MC38 induzierte keine IFN- $\gamma$  Sekretion bei CAR-exprimierende T-Zellen. Die IFN- $\gamma$  Konzentration durch Kontakt mit Tumorzellen war somit Antigen-vermittelt.

Durch diese Serie von Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Koexpression zweier unabhängiger CAR mit unterschiedlicher Spezifität in T-Zellen die Selektivität der Eliminierung von Tumorzellen mit Antigenmuster erhöht. Solche T-Zellen werden durch Tumorzellen mit der Koexpression zweier Antigene effizienter zur Zytokinsekretion und Zytolyse aktiviert als T-Zellen mit nur einem CAR. Dagegen wird durch die Koexpression der CAR die Fähigkeit von T-Zellen herabgesetzt, Tumorzellen mit nur einem Antigen zu erkennen, insbesondere wenn das Antigen in niedriger Dichte exprimiert wird.





**Abbildung 43: IFN- $\gamma$  Sekretion modifizierter T-Zellen durch Tumorzellen mit unterschiedlicher Antigenexpression**

In Überständen der Kokultivierung von Tumorzellen mit T-Lymphozyten, welche den anti-CEA CAR #607 BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ , den anti-ErbB2 CAR #714 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  sowie beide CAR (#1263) exprimierten, wurde die IFN- $\gamma$  Konzentration mittels ELISA bestimmt. Der Test wurde als Dreifachbestimmung angelegt und Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die Konzentrationen der jeweils höchsten Effektor-zu-Zielzell-Verhältnisse 1:2 wurden zusammengefasst und abgebildet. Die statistische Analyse wurde mit dem Student T-Test durchgeführt (\* $p \leq 0,05$ ).

## 5. Diskussion

Mit dem Konzept der zellulären Therapie mit CAR-modifizierten T-Zellen wird Patienten eine definierte Spezifität gegenüber Tumorzellen verliehen. Die Spezifität ist oft nicht ausreichend, um gesunde Zellen mit einer niedrigen TAA-Expression von Tumorzellen mit erhöhter TAA-Expression zu differenzieren. Dadurch ist es in der klinischen Erprobung zu schweren Nebenwirkungen gekommen, die sogar zum Tod von zwei Patienten führten. Weiterhin begrenzt heterogene Antigenexpression und Antigen-modulierende Immunselektion die Effizienz der Therapie wesentlich. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Verfahren zur Steigerung der Spezifität und Wirksamkeit der CAR-basierenden adoptiven T-Zell-Therapie darin bestehen kann, einen zweiten verschieden spezifischen CAR in T-Zellen zu exprimieren.

T-Zellen wurden durch Kotransduktion zweier CAR-Expressionskassetten generiert. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten die Koexpression der beiden CAR. Ein Vorteil dieser Methode bestand in einer vergleichsweise hohen Transduktionseffizienz der einzelnen Expressionskassetten. Die Koexpression war demnach mit Hilfe der Kotransfektion leicht realisierbar. Als Nachteil erwies sich, dass es bei der Kotransduktion zu einer zufälligen Infektion von T-Zellen mit den jeweiligen Retroviren und damit zur zufälligen Integration von Genkopien der jeweiligen CAR kommt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde ermittelt, dass daraus einerseits T-Zellen resultierten, die jeweils einen der CAR allein exprimierten oder die CAR in unterschiedlicher Dichte exprimierten. Der Anteil bispezifischer CAR T-Zellen betrug etwa 10% im Vergleich zu T-Zellen mit nur einem CAR, deren Anteil mehr als 30% betrug.

Zur Generierung von T-Zellen, die zwei CAR ausschließlich simultan exprimierten war deshalb eine bicistronische Expressionskassette erforderlich. Dazu wurden retrovirale, bicistronische Expressionsvektoren generiert, die für die DNS zweier CAR kodieren, welche mit DNS für das P2A-Peptid verknüpft waren. Nach Transfektion mit diesem Vektor koexprimierten infizierte T-Zellen beide CAR. Dieses beruht darauf, dass die Verwendung des P2A-Peptids eine Translation beider Transkripte in gleichem Verhältnis gewährleistet, wie

durchflusszytometrische Analysen bestätigten. Im Vergleich hat diese Methode eine verringerte Transduktionseffizienz von maximal 35% (monocistronisch bis 90%). CAR exprimierende T-Zellen konnten jedoch mit magnetischer Zellsortierung einfach angereichert werden.

Dimerisierungsstellen in der Fc-Domäne und der CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne verstärken die Bildung von Dimeren gleicher CAR auf der Zelloberfläche und damit die T-Zell-Aktivierung nach Bindung des Antigens. Bei Koexpression von CAR verschiedener Spezifität können bei gleicher Struktur Heterodimere entstehen. Dieses wurde gewährleistet durch die Koexpression von CAR, die mit einer humanen IgG<sub>1</sub>-Fc-Domäne ausgestattet waren. CAR mit CD3 $\zeta$  Transmembran- und Signaldomäne sind in der Lage über ihre Transmembrandomäne eine zusätzliche Verknüpfung zwischen den Monomeren zu erreichen und bilden daher stabilere Dimere als CD28 CAR und Monomere zweier unterschiedlicher CAR. Dass die beiden koexprimierten CAR zu ihren jeweiligen Homodimeren assoziieren wurde durch das Western Blot Verfahren bestätigt. Der sandwich-ELISA zeigte, dass zwei verschiedene CAR mit Fc-Domäne bei ihrer Koexpression Heterodimere bilden können.

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die Assoziation eine funktionelle Konsequenz für die CAR-vermittelte T-Zell-Aktivierung hat. Dieses wird sichtbar durch die Bindung des Antigens für den ersten CAR und die Aktivierung der Signalkette des zweiten CAR. Zur Identifikation der jeweiligen CAR-Signale wurden zwei CAR mit unterschiedlicher Signaldomäne verwendet. Als Indikator für die Aktivierung der T-Zellen wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine genutzt. Ein CAR mit CD3 $\zeta$  Signaldomäne aktiviert T-Zellen zur Sekretion von IFN- $\gamma$ , wogegen ein CAR mit alleiniger CD28 Signaldomäne T-Zellen nach Bindung des spezifischen Antigens nicht aktiviert. Lediglich in Verbindung mit einem CD3 $\zeta$  Signal kann dieser CAR die Kostimulation entfalten, durch die T-Zellen zur Sekretion von IL-2 angeregt werden. Aus diesem Grund wurden in T-Zellen ein CD3 $\zeta$  und ein CD28 Signal-CAR koexprimiert. Zur Generierung der individuellen CAR-Signale wurden CAR unterschiedlicher Spezifität eingesetzt. Tumor-assoziierte Antigene sind häufig gemeinsam auf gastrointestinalen Tumoren exprimiert. Anhand der Proteine

CA19-9, TAG-72, CEA und ErbB2 wurde *in vitro* eine sinnvolle Kombination der Tumorantigene simuliert, wie sie in Kolorektal-, Mamma- oder Ovarialkarzinomen auftreten kann. Um eine funktionelle Komplementation zweier koexprimierter CAR zu untersuchen, wurde überprüft, ob die Bindung des Antigens für den einen CAR die Signalkette des zweiten CAR aktiviert. Durch Bindung an die entsprechenden rekombinanten Antigene oder idiotypischen Antikörper, die als Surrogatantigen dienten, wurden bispezifische T-Zellen aktiviert. Bindung des Antigens für den CD3 $\zeta$  Signal-CAR führte zur Aktivierung der T-Zellen und einer IL-2-Sekretion durch Aktivierung der CD28 Signalkette des zweiten CAR. Umgekehrt wurden T-Zellen durch Bindung des Antigens für den CD28 Signal-CAR zur Sekretion von IFN- $\gamma$  durch die CD3 $\zeta$  Signalkette des zweiten CAR aktiviert. Diese Daten zeigen, dass koexprimierte CAR mit dem gewählten modularen Aufbau funktionell komplementieren. Anhand verschieden kombinierter Tumorantigene wurde gezeigt, dass die Kooperation der CAR mit Fc-Domäne nicht auf eine Antigenkombination festgelegt ist, sondern ein funktionales Prinzip darstellt. Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung wird von den Antigenen beeinflusst. Bindung von Carbohydrat-Antigenen bewirkte eine weniger effiziente Kooperation zur T-Zellaktivierung als Bindung von Polypeptidantigenen. Eine Aktivierung durch Kooperation der beiden koexprimierten CAR erwies sich stets als weniger effizient als eine Aktivierung durch gleichzeitige Bindung beider Antigene oder die Bindung beider CAR durch den anti-human-IgG<sub>1</sub> Antikörper, der spezifisch die Fc-Domäne beider CAR bindet. Dieses ist begründet durch die Kreuzvernetzung beider CAR und deren stabilere Assoziation zu Homodimeren. Die Aktivierung der Signaldomäne des CD3 $\zeta$  CAR durch direkte Bindung an dessen Antigen war effizienter als durch komplementative Bindung des CD28 Signal-CAR an sein Antigen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur etwa 10-15% der eingesetzten Zellen die CAR koexprimieren. Dagegen spricht, dass T-Zellen, welche zwei CAR dieser Konfiguration durch Transduktion der bicistronischen Expressionskassette #1262 koexprimierten, zu den gleichen Ergebnissen führten. In T-Zellen, welche das bicistronische Konstrukt exprimierten, war die Effizienz der kooperativen Aktivierung im Vergleich zur Aktivierung eines alleinigen CAR ebenfalls gering. Das könnte durch die

geringere Stabilität der Heterodimere zweier verschiedener CAR gegenüber den Homodimeren eines einzelnen exprimierten CAR verursacht werden. Eine geringere Expressionsdichte der Heterodimere führt damit zu einer weniger effizienten T-Zell-Aktivierung. Die Aktivierung der Signaldomäne des CD3 $\zeta$  CAR durch direkte Bindung an dessen Antigen war bei T-Zellen mit alleiniger CAR-Expression effizienter als bei T-Zellen mit der Koexpression zweier CAR. Dieses könnte in koexprimierenden T-Zellen durch eine verminderte Anzahl an Homodimeren des CD3 $\zeta$  CAR durch die Assoziation zu Heterodimeren beider CAR erklärt werden. Eine geringere Expressionsdichte der Homodimere führt damit zu einer weniger effizienten T-Zell-Aktivierung in T-Zellen mit der CAR Koexpression.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Bindung des Antigens für den CD28 Signal-CAR die Signalkette des zweiten CD3 $\zeta$  Signal-CAR aktiviert und die Zytolyse von Tumorzellen auslöst. Es wurde gezeigt, dass der CEA-spezifische CD28 Signal-CAR #1156 durch Bindung seines Antigens die CD3 $\zeta$  Signalkette des CAR #710 aktivierte und die Tumorzellen durch die T-Zellen lysiert wurden. Die T-Zell-Aktivierung wurde durch die Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 bestätigt. Die CD28 Signalkette des CAR #1156 wurde durch die Bindung des koexprimierten CD3 $\zeta$  Signal-CAR #710 an ErbB2 aktiviert, angezeigt durch die Sekretion von IL-2. Über den genauen Mechanismus der Komplementierung ist bisher wenig bekannt. Durch die Bildung der CAR-Heterodimere könnten Kofaktoren der CD28 Signaldomäne in direkte Nähe der CD3 $\zeta$  Signaldomäne rekrutiert werden. Finney et al. (1998) haben herausgefunden, dass die PI3-Kinase bei CAR mit funktionsfähiger CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne konstitutiv mit dem CAR assoziiert ist und damit den CD28-Signalweg initiieren kann. Dieser Mechanismus könnte auch bei dimerisierten CAR mit CD3 $\zeta$  und CD28 Signaldomäne zur Initiation des CD28 Signalweges führen und damit die Komplementation der CAR Signale auslösen.

Da T-Zellen durch die Kokultivierung mit CEA<sup>+</sup> Zellen IFN- $\gamma$  und IL-2 sezernierten, wurde die Aktivierung der CD3 $\zeta$  Kette des ErbB2-spezifischen CAR #710 und der CD28 Signalkette des CEA-spezifischen CAR #1156 durch Bindung an CEA nachgewiesen. Die Komplementation war CAR-vermittelt und erfolgte nur in koexprimierenden T-Zellen. Es wurde beobachtet, dass ErbB2<sup>+</sup>

Tumorzellen T-Zellen mit der alleinigen Expression des CD3 $\zeta$  Signal-CAR #710 stärker zur spezifischen Zytolyse aktivierten als T-Zellen mit der Koexpression der CD28 und CD3 $\zeta$  CAR. Offenkundlich ist die Aktivierung des CD3 $\zeta$  Signal-CAR #710 weniger effizient, wenn dieser mit dem CD28 Signal-CAR #1156 koexprimiert wird. Die Kostimulation beider koexprimierter CAR durch Tumorzellen, die ErbB2 und CEA gleichzeitig exprimierten, erwies sich darüber hinaus als wenig effizient. Die Aktivierung durch ein Antigen, die im Vergleich zu T-Zellen mit der alleinigen Expression des CD3 $\zeta$  CAR geringer effizient war, wurde durch die Kostimulation mit dem zweiten Antigen nicht kompensiert. Diese Ergebnisse wurden durch die IFN- $\gamma$  Sekretion als Marker für die T-Zell-Aktivierung bestätigt. Obwohl alle Zielzellen über einen identischen Hintergrund verfügten, kann eine unterschiedlich starke Aktivierung durch die jeweiligen Linien nicht ausgeschlossen werden, da die Expression von ErbB2 und CEA mit jeweils unterschiedlichen Antikörpern nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend zeigen alle Daten, dass durch die Koexpression von CD3 $\zeta$  Signal-CAR und CD28 Signal-CAR eine kooperative Aktivierung der T-Zelle erfolgte und damit die funktionelle Interaktion dieser CAR nachgewiesen wurde. Die kooperative Aktivierung innerhalb dieser CAR-Konfiguration ist weniger effizient als die Kostimulation mit beiden Antigenen. Zweitens scheint die Koexpression eines CD28 Signal-CAR die T-Zell-Aktivierung durch den CD3 $\zeta$  Signal-CAR herabzusetzen. Eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Wirksamkeit könnte erneut darauf hinweisen, dass durch den Transfer mit Hilfe der Kotransduktion T-Zellen, die ausschließlich den CD28 Signal-CAR exprimierten, weder zur kooperativen Aktivierung noch zur direkten Stimulation des CD3 $\zeta$  Signal-CAR beitragen. Andererseits könnten T-Zellen, die den CD28 Signal-CAR im Verhältnis zum CD3 $\zeta$  Signal-CAR stärker exprimierten, weniger stark zur Zytolyse aktiviert werden als T-Zellen mit stärkerer Expression des CD3 $\zeta$  Signal-CAR. Da die Zytolyse durch die Aktivierung der CD3 $\zeta$  Kette induziert wird, können CD28 CAR nicht zur T-Zell-Aktivierung beitragen und würden durch eine erhöhte Dichte die Oberflächen-Expression der CD3 $\zeta$  CAR weiter herabsetzen. Eine Lösung ist die Verwendung der bicistronischen Expressionskassette #1262. Derartig modifizierte T-Zellen mussten jedoch durch eine etwa zehnfache Menge Antigen stimuliert werden, um zur Sekretion

der halbmaximalen IFN- $\gamma$ -Konzentration aktiviert werden zu können als T-Zellen mit einem CD3 $\zeta$  Signal-CAR. Damit führt die Koexpression eines CD28 Signal-CAR zu einer Erhöhung der Aktivierungsschwelle. Die Koexpression des CD28 CAR führt zur Bildung von Heterodimeren beider CAR und könnte somit zu einer verminderten Anzahl an CD3 $\zeta$  CAR Homodimeren beitragen. Dieses bewirkt eine weniger effiziente T-Zell-Aktivierung. Dagegen wird die Qualität der T-Zell-Antwort geändert, da T-Zellen durch die Koexpression eines CD28 Signal-CAR zur Sekretion von IL-2 aktiviert werden. In T-Zellen, die einen CD3 $\zeta$  Signal-CAR und einen CD28 Signal-CAR koexprimieren, tritt demnach einerseits eine Interaktion auf, die eine kooperative Aktivierung verursacht. Andererseits führt die Koexpression eines CD28 CAR zu einer inhibierenden Wirkung, welche die Aktivierungseffizienz verringert und den Schwellenwert zur Antigen-spezifischen Aktivierung erhöht. Für eine klinische Anwendung würde eine kombinierte Expression von CD3 $\zeta$  Signal-CAR und CD28 Signal-CAR demnach eine Desensibilisierung gegenüber gesunden Zellen mit geringer TAA Expression bedeuten. Andererseits wird jedoch die Effizienz dieser bispezifischen T-Zellen verringert, was durch Erhöhung der Anzahl modifizierten T-Zellen kompensiert werden könnte. Das könnte jedoch zu einer höheren Belastung des Patienten führen und die eingesetzten T-Zellen müssten stärker expandiert werden, wodurch sie wiederum weniger effizient für eine Therapie werden.

Eine effizientere Lösung als die Koexpression von CD3 $\zeta$  Signal-CAR und CD28 Signal-CAR könnte daher die Expression eines niedrig affinen CD28/CD3 $\zeta$  Signal-CAR darstellen. Durch diesen könnte eine Desensibilisierung gegenüber gesunden Zellen mit niedriger TAA Expression erfolgen und gleichzeitig der Erhalt der Aktivierungseffizienz gewährleistet werden. Daher wurde untersucht, in wieweit die Koexpression eines CD3 $\zeta$  Signal-CAR und eines CD28 Signal-CAR einen Vorteil bei der T-Zell-Aktivierung in Abhängigkeit von der Antigendichte bedeuten kann. Die Titration der Antigene zeigte, dass die Kostimulation-vermittelte IL-2-Sekretion durch die Anwesenheit des zweiten Antigens beeinflusst wird. Die schwache kooperative Aktivierung der T-Zelle zur IL-2-Sekretion durch die koexprimierten CAR wird mit zunehmender Dichte des zweiten Antigens verstärkt. Die Schwelle zur Aktivierung von CD3 $\zeta$  Signalen

wie der IFN- $\gamma$ -Sekretion wird nicht wesentlich durch zunehmende Stimulation beeinflusst.

Für eine klinische Anwendung bedeutet dies, dass die Erkennung von Tumor-typischen Antigenmustern zu einer verstärkten Kostimulation von T-Zellen mit koexprimierten CD3 $\zeta$  Signal-CAR und CD28 Signal-CAR führt. Das kann eine Erhöhung der T-Zell-Proliferation und eine bessere Aktivierung anderer Immunzellen durch verstärkte IL-2-Sekretion bewirken. Eine kooperative Verstärkung der Zytotoxizität kann jedoch durch diese CAR Kombination nicht erreicht werden. Die Schwelle zur Aktivierung von CD3 $\zeta$  Signalen wie der IFN- $\gamma$ -Sekretion wird durch zunehmende Stimulation des CD28 Signal-CAR nicht wesentlich beeinflusst. Bei der Bindung von Tumorzellen mit etwa gleich stark exprimierten Antigenen kann die Koexpression unterschiedlich spezifischer CD28 und CD3 $\zeta$  CAR einen therapeutischen Vorteil bedeuten. Die vollständige Aktivierung der T-Zellen durch CD28-Kostimulation wird nur durch die Erkennung von Tumorzellen erreicht, die das Tumor-typische Antigenmuster exprimieren. Dadurch wird die Tumor-Spezifität im Vergleich zu T-Zellen mit einem CAR, der durch eine fusionierte CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne ebenfalls kostimulatorisch aktivieren kann, wesentlich erhöht. Die Kombination von CD3 $\zeta$  Signal CAR und CD28 Signal CAR kann jedoch auch einen therapeutischen Nachteil bedeuten, sofern das spezifische Tumorantigen für den CD3 $\zeta$  CAR in geringer Dichte exprimiert ist. Insbesondere im Fall einer Antigen-modulierenden Immunselektion kann das zu einer verminderten Wirksamkeit führen. T-Zellen mit den CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  und BW431/26scFv-Fc-CD28 sind in der Lage, Tumor-typische Antigenmuster zu erkennen. Die Kombination solcher CD3 $\zeta$  Signal CAR und CD28 Signal CAR kann die Spezifität einer therapeutischen Anwendung erhöhen und mittels Kooperation der CAR die Kostimulation bei unterschiedlicher Antigendichte gewährleisten. Gleichzeitig wird jedoch die Effizienz solcher T-Zellen zur Vermittlung von Zytotoxizität herabgesetzt und die Schwelle zur Aktivierung von Effektorfunktionen erhöht. Das Targeting von zwei TAA auf Tumorzellen mit T-Zellen, die CD3 $\zeta$  Signal-CAR und CD28 Signal-CAR koexprimieren, stellt ein vermindertes Risiko zu off-target Toxizität durch Erhöhung der Spezifität dar.



Eine Steigerung der Wirksamkeit kann durch diese CAR-Kombination nicht erreicht werden.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Assoziation verschiedener koexprimierten CAR weniger stabil ist als die Assoziation der Homodimeren gleicher CAR. Infolge dessen war die kooperative T-Zell-Aktivierung durch ein Antigen stets geringer als durch die direkte Bindung eines CAR und die Kostimulation beider CAR. Ein CD28 Signal-CAR kann zu dieser verringerten Aktivierungseffizienz beitragen, in dem er den koexprimierten CD3 $\zeta$  Signal-CAR weniger stark aktivieren kann als umgekehrt. Durch die Aktivierung mit titrierten Antigenen wurde gezeigt, dass die Dichte des Antigens, das der CD28 Signal-CAR bindet, die Aktivierungskinetik der T-Zellen weniger stark beeinflusst, als die Dichte des Antigens, das der CD3 $\zeta$  Signal-CAR bindet. Die Art des Antigens oder deren Mobilität auf der Zielzelle scheint einen Einfluss auf die funktionelle Kooperation zu haben. Dies zeigt sich insbesondere bei der Verwendung von bispezifischen T-Zellen mit CAR-Spezifität für Carbohydrat-Antigene, was zu einer weiteren Verringerung der kooperativen Aktivierung im Vergleich zur Stimulation mit Polypeptidantigenen führte. Um die geringere Aktivierung zu kompensieren, wurde statt des CD28 Signal-CAR ein CD28/CD3 $\zeta$  Signal-CAR mit einem CD3 $\zeta$  Signal-CAR koexprimiert. Mit dieser Kombination von CAR konnten T-Zellen durch funktionelle Interaktion effizienter zur Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 aktiviert werden. Einerseits bewirkt die Fusion der Signaldomänen CD28 und CD3 $\zeta$  einer verstärkte IFN- $\gamma$ - und IL-2-Sekretion. Andererseits wurde durch die Verwendung einer CD3 $\zeta$  Transmembrandomäne eine weitere Stabilisierung von Heterodimeren mit dem CD3 $\zeta$  Signal-CAR erreicht.

Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung war bei Koexpression der CAR #1263 C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  gegenüber den jeweiligen einzeln exprimierten CAR gleich. Der Vergleich mit der vorherigen CAR-Kombination zeigt somit, dass die Effizienz der T-Zell-Aktivierung von der Konfiguration der koexprimierten CAR abhängt. T-Zellen mit CAR mit fusionierten CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomänen verfügen ebenfalls über eine erhöhte Aktivierungsschwelle im Vergleich zu T-Zellen mit den entsprechend einzeln

exprimierten CAR. In T-Zellen, die zwei verschiedenen spezifische CD28/CD3 $\zeta$  Signal-CAR koexprimieren, findet demnach eine funktionelle Kooperation statt, welche die Aktivierungseffizienz erhält, obwohl der Schwellenwert zur Antigen-spezifischen Aktivierung erhöht wird. Für eine klinische Anwendung würde eine kombinierte Expression von CD28/CD3 $\zeta$  Signal-CAR eine Desensibilisierung gegenüber gesunden Zellen bedeuten, die das TAA in niedriger Dichte exprimieren. Durch die gleichzeitig hohe Wirksamkeit dieser bispezifischen T-Zellen würden Tumorzellen mit hoher TAA Expression effizient eliminiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kostimulation zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 durch die Anwesenheit des zweiten Antigens beeinflusst wird. Die kooperative Aktivierung der T-Zelle durch Bindung eines Antigens wird demnach mit zunehmender Dichte des zweiten Antigens verstärkt. Damit unterscheidet sich die Koexpression zweier verschiedenen spezifischer CD28/CD3 $\zeta$  CAR entscheidend von der zuvor untersuchten CAR-Kombination. Da beide CAR die Antigen-vermittelte Zytolyse induzieren können und gleichzeitig die Aktivierungsschwelle für das jeweils andere Antigen herabsetzen, würden Tumorzellen mit stark unterschiedlicher Expression der beiden Antigene ebenfalls wirksam eliminiert.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass T-Zellen mit der Koexpression zweier CD28/CD3 $\zeta$  CAR verschiedener Spezifität in der Lage sind, Tumor-typische Antigenmuster zu erkennen. Es wird erwartet, dass eine kombinierte Expression solcher CAR die Selektivität der adoptiven T-Zell-Therapie erhöht und dadurch eine Erhöhung der Schwelle zur Aktivierung gegenüber gesunden Zellen bewirkt, die eines der TAA in niedriger Dichte exprimieren. Die Effizienz solcher T-Zellen zur Vermittlung von Zytotoxizität bleibt dagegen erhalten. Durch die kooperative Aktivierung der koexprimierten CAR erhöht sich die Sensitivität gegenüber den Antigenmustern, wodurch ein vermindertes Risiko zur off-target Toxizität entsteht. Dieses zeigt sich besonders, wenn die spezifischen Tumorantigene in stark unterschiedlicher Dichte exprimiert sind.

Die Ursache für die Erhöhung der Aktivierungsschwelle ist nicht ausreichend untersucht. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass durch die Expression verschieden affiner Immunrezeptoren die Avidität der bispezifischen T-Zelle

verringert wird. Im Fall der Koexpression der anti-CEA CAR BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und anti-ErbB2 CAR C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  wurde eine Erhöhung der Schwelle im Vergleich zu Zellen mit der separaten Expression der nachgewiesen werden. Die Affinitäten der jeweiligen Bindedomänen betragen für den anti-CEA CAR  $K_D = 10^{-10}$  M (Boeckmann et al. 1990) sowie für den anti-ErbB2 CAR  $K_D = 1,5 \times 10^{-11}$  M (Chmielewski et al. 2004). Eine simultane Expression dieser CAR verändert die Avidität der T-Zellen. Der Einfluss unterschiedlicher CAR-Affinitäten auf die Erhöhung der Aktivierungsschwellen könnte mittels Koexpression zweier CAR mit gleicher Spezifität aber unterschiedlicher Affinität, wie sie in Chmielewski et al. (2004) beschrieben wurden, untersucht werden. Durch die Verwendung gering affiner Bindedomänen könnte das Risiko der off-target Toxizität weiter minimiert werden. In bispezifischen T-bodies kann auch bei weniger affinen CAR aufgrund der beobachteten kooperativen Wirkung eine hohe Selektivität gegenüber Antigenmustern beibehalten werden.

Um Effektorfunktionen effizienter zu vermitteln, müssen CAR Dimere bilden (Bridgeman et al. 2010). Durch die Dimerisierung verschiedener CAR kann andererseits die Dichte an Homodimeren herabgesetzt und somit eine Erhöhung der Aktivierungsschwelle bewirkt werden, wenn Monomere nicht bindungsfähig sind (Moritz und Groner 1995; Hombach et al. 2000). Durch die Expression eines zweiten rekombinanten CAR ohne Dimerisierungspotential könnte die Bildung von Heterodimeren verhindert und so die Folgen auf die Aktivierungsschwelle untersucht werden. Dieses könnte beispielsweise dadurch erreicht werden, dass ein CAR ohne IgG<sub>1</sub>-Fc-Domäne mit einem CAR mit Brückendomäne und unterschiedlicher Transmembrandomäne koexprimiert wird. Nicht-funktionale, nicht-spezifische „dummy“-CAR mit hohem Dimerisierungspotential könnten therapeutisch eingesetzt werden. Mit solchen CAR könnte man die Dichte an Homodimeren des spezifischen, funktionalen CAR herabsetzen und so das Risiko einer off-target Toxizität minimieren. Dieses könnte eine Rolle spielen, wenn hochaffine Bindedomänen eingesetzt werden müssen, Antigenmuster nicht zur Verfügung stehen und durch Expression des Zielantigens in gesundem Gewebe Komplikationen zu erwarten sind.

Das Risiko einer zunehmend ineffizienten T-Zell-Aktivierung steigt mit der Dauer einer T-Zell-Therapie. In klinischen Studien wurde beobachtet, dass ein Großteil der persistierenden spezifischen T-Zellen inaktiv war. Die Ausstattung von EBV-spezifischen T-Zellen mit CAR hat gezeigt, dass diese Zellen durch eine künstliche EBV-Infektion erneut zu Tumor-spezifischer Zytolyse aktiviert werden konnten (Savoldo et al. 2007). Mit der Einführung eines zweiten CAR könnte die Reaktivierung solcher Zellen ebenfalls erreicht werden. Dessen Bindedomäne, die keine körpereigenen Proteine erkennen sollte, könnte durch systemische Gabe eines geeigneten Liganden gegen diese Bindedomäne zur Signalgenerierung aktiviert werden. Die Kombination von mehreren kostimulatorischen Domänen wie CD28, CD137 oder CD134 könnte zu einer optimalen Reaktivierung der Zellen genutzt werden. Insgesamt ergibt sich aus der Koexpression eines zweiten CAR in T-Zellen eine Vielzahl an Möglichkeiten, um eine adoptive T-Zell-Therapie wirksamer und sicherer zu gestalten.

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen an T-Zellen mit einer Koexpression von CAR oder zu bispezifischen T-Zellen. Alvarez-Vallina und Hawkins (1996) entwickelten die Möglichkeit, fehlende Kostimulation durch die Expression eines CAR mit CD28 Signaldomäne zu kompensieren. Die unterschiedlich spezifischen CAR aktivierten T-Zellen nach Bindung beider Antigene synergistisch. Beide CAR waren nicht mit Brückendomänen ausgestattet und konnten nicht dimerisieren, sodass eine kooperative Aktivierung und die Komplementation beider CAR nicht im Fokus der Untersuchungen stand. Patel et al. (2000) generierten CAR mit zwei verknüpften Bindedomänen zur Erkennung von zwei unterschiedlichen Tumorantigenen. Mit dieser Strategie sollte die Spezifität der T-Zellen erhalten werden, wenn ein Antigen während der Progression der Tumorerkrankungen supprimiert wird. Eine verbesserte Differenzierung zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen mit niedriger TAA Expression wurde mit diesem Konzept jedoch nicht angestrebt. Aufgrund der in jüngster Zeit in klinischen Studien aufgetretenen fatalen Nebenwirkungen wird die Koexpression eines zweiten CAR zur Erhöhung der Tumor-Selektivität erneut diskutiert. Daher ist eine präklinische Evaluation dieser Strategie von großem Interesse.

## 6. Zusammenfassung

Die adoptive Immuntherapie mit Tumor-reaktiven T-Zellen mit chimären Antigen-Rezeptoren ist eine vielversprechende Strategie zur Behandlung fortgeschrittener Tumorerkrankungen. Die Selektivität modifizierter T-Zellen hat sich in klinischen Studien jedoch als nicht ausreichend erwiesen. Jüngste klinische Studien zeigten fatale Nebenwirkungen durch mangelnde Selektivität CAR-exprimierender T-Zellen, die gesunde Zellen erkannten und eine massive Autoaggression induzierten. Die simultane Erkennung von zwei Antigenen durch zwei CAR stellt möglicherweise eine Lösung dieser Probleme dar.

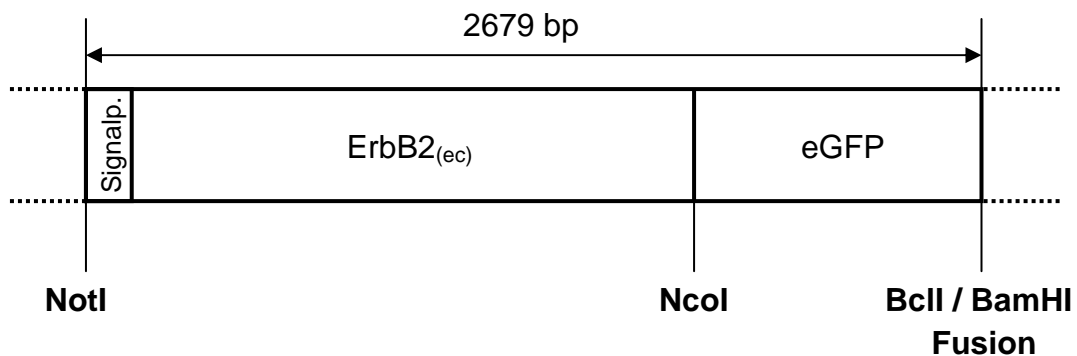
Diese Arbeit hat sich deshalb mit der Koexpression von zwei CAR verschiedener Spezifität in T-Lymphozyten befasst. Bispezifische T-Zellen wurden mit Hilfe der Kotransduktion der jeweiligen CAR oder durch eine bicistronische Expressionskassette generiert. CAR mit einer IgG<sub>1</sub>-Brückendomäne zeigen bevorzugte Dimer-Bildung. Die CAR-Assoziation führte zu Homo- wie auch zu Heterodimeren. Die Effizienz der T-Zell-Aktivierung ist von der Konfiguration der CAR abhängig und wurde durch Verwendung der fusionierten CD28/CD3 $\zeta$  Signaldomäne weiterhin verbessert im Vergleich zur Koexpression eines CD28 und eines CD3 $\zeta$  CAR. Die Selektivität der bispezifischen T-Zellen gegenüber koexprimierten Antigenen wurde erheblich verbessert, wobei die Bindung des zweiten Antigens zur gesteigerten T-Zell-Aktivierung führte. Die Aktivierungsschwelle der T-Zelle für das Antigen wurde dabei erhöht, so dass Zellen mit geringer Antigenexpression nicht mehr erkannt wurden.

Durch diese Strategie werden eine Desensibilisierung CAR-modifizierter T-Zellen gegenüber gesunden Zellen mit einem Antigen und die Erkennung von Antigenmustern ermöglicht. Die Koexpression zweier unterschiedlich spezifischer CAR in T-Zellen ist deshalb einer Modifikation mit nur einem CAR überlegen und ermöglicht die Verbesserung der Selektivität der gerichteten adoptiven T-Zell-Therapie.

## 7. Anhang

### 7.1 DNS-Sequenz des Fusionsproteins ErbB2-eGFP (#1192)

Die DNS für das rekombinante Fusionsprotein ErbB2-eGFP im pQCXIH-Vektor (#1192) umfasst 2679 bp. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung dienen, sind mit Fettdruck gekennzeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird im Ein-Buchstaben-Code über der Nukleotidsequenz aufgeführt und ist annotiert. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern (\*) markiert. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern (\*) markiert.



#### ErbB2-eGFP (#1192)

Nukleotidsequenz incl. Stopp-Codon und Signal-Peptid [bp]: 2679

Proteinmasse ohne Signalpeptid [kDa]: 96,3

Aminosäuresequenz ohne Signalpeptid [AS]: 870

Position Signal-DNS-Sequenz [bp]: 1 – 66

Position ErbB2<sub>(ec)</sub> [bp]: 67 – 1956

Position eGFP [bp]: 1960 - 2676

Position Stopp-Codon [bp]: 2677 - 2679

1 → ErbB2 Signalpeptid

M E L A A L C R W G L L L A L L

-12 ATCCGCGGCC GCATGGAGCT GCGGGCCTTG TGCCGCTGGG GGCTCCTCCT CGCCCTCTTG  
TAGGCGCCCG CGTACCTCGA CCGCCGGAAC ACGGCGACCC CCGAGGAGGA GCGGGAGAAC

67 → ErbB2 extrazelluläre Domäne

P P G A A S T Q V C T G T D M K L R L P

49 CCCCCGGAG CCGCGAGCAC CCAAGTGTGC ACCGGCACAG ACATGAAGCT GCGGCTCCCT  
GGGGGCCTC GGCCTCTGTG GGTTCACACG TGGCCGTGTC TGTACTTCGA CGCCGAGGGA

A S P E T H L D M L R H L Y Q G C Q V V

109 GCCAGTCCCG AGACCCACCT GGACATGCTC CGCCACCTCT ACCAGGGGTG CCAGGTGGTG  
CGGTCAGGGC TCTGGGTGGA CCTGTACGAG GCGGTGGAGA TGGTCCCGAC GGTCCACCAC

Q G N L E L T Y L P T N A S L S F L Q D

169 CAGGGAAACC TGGAACCTAC CTACCTGCCC ACCAATGCCA GCCTGTCTTT CCTGCAGGAT  
GTCCCTTTGG ACCTTGAGTG GATGGACGGG TGTTTACGGT CGGACAGGAA GGACGTCTTA

I Q E V Q G Y V L I A H N Q V R Q V P L

229 ATCCAGGAGG TGCAGGGCTA CGTGCTCATC GCTCACAACC AAGTGAGGCA GGTCCCCTG  
TAGGTCCTCC ACGTCCCGAT GCACGAGTAG CGAGTGTGTTG TTTACTCCGT CCAGGGTGAC

Q R L R I V R G T Q L F E D N Y A L A V

289 CAGAGGCTGC GGATTGTGCG AGGCACCCAG CTCTTTGAGG ACAACTATGC CCTGGCCGTG  
GTCTCCGACG CCTAACACGC TCCGTGGGTC GAGAACTCC TGTTGATACG GGACCGGCAC

L D N G D P L N N T T P V T G A S P G G

349 CTAGACAATG GAGACCCGCT GAACAATACC ACCCCTGTCA CAGGGGCCTC CCCAGGAGGC  
GATCTGTTAC CTCTGGGCGA CTTGTTATGG TGGGGACAGT GTCCCCGGAG GGGTCCTCCG

L R E L Q L R S L T E I L K G G V L I Q

409 CTGCGGGAGC TGCAGCTTCG AAGCCTCACA GAGATCTTGA AAGGAGGGGT CTTGATCCAG  
GACGCCCTCG ACGTCAAGC TTCGGAGTGT CTCTAGAACT TTCCTCCCCA GAACTAGGTC

R N P Q L C Y Q D T I L W K D I F H K N

469 CGGAACCCCC AGCTCTGCTA CCAGGACACG ATTTTGTGGA AGGACATCTT CCACAAGAAC  
GCCTTGGGGG TCGAGACGAT GGTCTGTGTC TAAAACACCT TCCTGTAGAA GGTGTTCTTG

N Q L A L T L I D T N R S R A C H P C S

529 AACCAGCTGG CTCTCACACT GATAGACACC AACCGCTCTC GGGCCTGCCA CCCCTGTCTT  
TTGGTCGACC GAGAGTGTGA CTATCTGTGG TTGGCGAGAG CCCGGACGGT GGGGACAAGA

P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T

589 CCGATGTGTA AGGGCTCCCG CTGCTGGGGA GAGAGTTCTG AGGATTGTCA GAGCCTGACG  
GGCTACACAT TCCCAGGGC GACGACCCCT CTCTCAAGAC TCCTAACAGT CTCGGACTGC

R T V C A G G C A R C K G P L P T D C C

649 CGCACTGTCT GTGCCGGTGG CTGTGCCCGC TGCAAGGGGC CACTGCCAC TGACTGCTGC  
GCGTGACAGA CACGGCCACC GACACGGGCG ACGTTCCCCG GTGACGGGTG ACTGACGACG

H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L

709 CATGAGCAGT GTGCTGCCGG CTGCACGGGC CCCAAGCACT CTGACTGCCT GGCCTGCCTC  
GTACTCGTCA CACGACGGCC GACGTGCCCG GGGTTCTGTA GACTGACGGA CCGGACGGAG

H F N H S G I C E L H C P A L V T Y N T

769 CACTTCAACC ACAGTGGCAT CTGTGAGCTG CACTGCCCAG CCCTGGTCAC CTACAACACA  
GTGAAGTTGG TGTCACCGTA GACTCTGAC GTGACGGGTC GGGACCAGTG GATGTTGTGT

D T F E S M P N P E G R Y T F G A S C V

829 GACACGTTTG AGTCCATGCC CAATCCCGAG GGCCGGTATA CATTCCGGGC CAGCTGTGTG  
CTGTGCAAAC TCAGGTACGG GTTAGGGCTC CCGGCCATAT GTAAGCCGCG GTCGACACAC

T A C P Y N Y L S T D V G S C T L V C P

889 ACTGCCTGTC CCTACAATA CCTTTCTACG GACGTGGGAT CCTGCACCCT CGTCTGCCCC  
TGACGGACAG GGATGTTGAT GGAAAGATGC CTGCACCCTA GGACGTGGGA GCAGACGGGG

ErbB2 extrazelluläre Domäne →

L H N Q E V T A E D G T Q R C E K C S K  
 949 CTGCACAACC AAGAGGTGAC AGCAGAGGAT GGAACACAGC GGTGTGAGAA GTGCAGCAAG  
 GACGTGTTGG TTCTCCACTG TCGTCTCCTA CCTTGTGTGCG CCACACTCTT CACGTCGTTG

P C A R V C Y G L G M E H L R E V R A V  
 1009 CCCTGTGCCC GAGTGTGCTA TGGTCTGGGC ATGGAGCACT TGCGAGAGGT GAGGGCAGTT  
 GGGACACGGG CTCACACGAT ACCAGACCCG TACCTCGTGA ACGCTCTCCA CTCCCCTCAA

T S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F  
 1069 ACCAGTGCCA ATATCCAGGA GTTTGCTGGC TGCAAGAAGA TCTTTGGGAG CCTGGCATT  
 TGGTCACGGT TATAGGTCCT CAAACGACCG ACGTTCTTCT AGAAACCCTC GGACCGTAAA

L P E S F D G D P A S N T A P L Q P E Q  
 1129 CTGCCGAGGA GCTTTGATGG GGACCCAGCC TCCAACACTG CCCCCTCCA GCCAGAGCAG  
 GACGGCCTCT CGAACTACC CCTGGGTCGG AGGTTGTGAC GGGGCGAGGT CGGTCTCGTC

L Q V F E T L E E I T G Y L Y I S A W P  
 1189 CTCCAAGTGT TTGAGACTCT GGAAGAGATC ACAGGTTACC TATACATCTC AGCATGGCCG  
 GAGGTTACA AACTCTGAGA CCTTCTCTAG TGTCCAATGG ATATGTAGAG TCGTACCGCG

D S L P D L S V F Q N L Q V I R G R I L  
 1249 GACAGCCTGC CTGACCTCAG CGTCTTCCAG AACCTGCAAG TAATCCGGGG ACGAATTCTG  
 CTGTCCGACG GACTGGAGTC GCAGAAGGTC TTGGACGTTT ATTAGGCCCC TGCTTAAGAC

H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R  
 1309 CACAATGGCG CCTACTCGCT GACCCTGCAA GGGCTGGGCA TCAGCTGGCT GGGGCTGCGC  
 GTGTTACCGC GGATGAGCGA CTGGGACGTT CCCGACCCGT AGTCGACCGA CCCCACCGCG

S L R E L G S G L A L I H H N T H L C F  
 1369 TCACTGAGGG AACTGGGCG TGGACTGGCC CTCATCCACC ATAACACCCA CCTCTGCTTC  
 AGTGACTCCC TTGACCCGTC ACCTGACCGG GAGTAGGTGG TATTGTGGGT GGAGACGAAG

V H T V P W D Q L F R N P H Q A L L H T  
 1429 GTGCACACGG TGCCCTGGGA CCAGCTCTTT CGGAACCCGC ACCAAGCTCT GCTCCACACT  
 CACGTGTGCC ACGGGACCCT GGTGAGAAA GCCTTGGGCG TGGTTCGAGA CGAGGTGTGA

A N R P E D E C V G E G L A C H Q L C A  
 1489 GCCAACCAGC CAGAGGACGA GTGTGTGGGC GAGGGCCTGG CCTGCCACCA GCTGTGCGCC  
 CCGTTGGCCG GTCTCTGTCT CACACACCCG CTCCCGGACC GGACGGTGGT CGACACGCGG

R G H C W G P G P T Q C V N C S Q F L R  
 1549 CGAGGGCACT GCTGGGGTCC AGGGCCACC CAGTGTGTCA ACTGCAGCCA GTTCTTCCG  
 GCTCCCCTGA CGACCCAGG TCCCGGGTGG GTCACACAGT TGACGTCGGT CAAGGAAGCC

G Q E C V E E C R V L Q G L P R E Y V N  
 1609 GGCCAGGAGT GCGTGGAGGA ATGCCGAGTA CTGCAGGGC TCCCAGGGA GTATGTGAAT  
 CCGTCTCTCA CGCACCTCCT TACGGTCTAT GACGTCCCCG AGGGTCCCT CATACTTA

A R H C L P C H P E C Q P Q N G S V T C  
 1669 GCCAGGCACT GTTTGCCGTG CCACCCTGAG TGTCAGCCCC AGAATGGCTC AGTGACCTGT  
 CCGTCCGTGA CAAACGGCAC GGTGGGACTC ACAGTCGGGG TCTTACCGAG TCACTGGACA

F G P E A D Q C V A C A H Y K D P P F C  
 1729 TTTGGACCGG AGGCTGACCA GTGTGTGGCC TGTGCCACT ATAAGGACCC TCCCTTCTGC  
 AAACCTGGCC TCCGACTGGT CACACACCCG ACACGGGTGA TATTCCTGGG AGGGAAGACG

V A R C P S G V K P D L S Y M P I W K F  
 1789 GTGGCCCGCT GCCCAGCGG TGTGAAACCT GACCTCTCCT ACATGCCCAT CTGGAAGTTT  
 CACCGGGCGA CGGGGTCGCC AACTTTGGGA CTGGAGAGGA TGTACGGGTA GACCTTCAA

P D E E G A C Q P C P I N C T H S C V D  
 1849 CCAGATGAGG AGGGCGCATG CCAGCCTTGC CCCATCAACT GCACCCACTC CTGTGTGGAC  
 GGTCTACTCC TCCCGCGTAC GGTGGAACG GGGTAGTTGA CGTGGGTGAG GACACACCTG



**ErbB2 extrazelluläre Domäne**      ← 1956      1960 →

1909 L D D K G C P A E Q R A S P L T A M V S  
 CTGGATGACA AGGGCTGCCC CGCCGAGCAG AGAGCCAGCC CTCTGACGGC **CATGGT**GAGC  
 GACCTACTGT TCCCACGGG GCGGCTCGTC TCTCGGTCGG GAGACTGCCG **GTACCA**CTCG

**eGFP** →

1969 K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V  
 AAGGGCGAGG AGCTGTTCAC CGGGGTGGTG CCCATCCTGG TCGAGCTGGA CGGCGACGTA  
 TTCCCGCTCC TCGACAAGTG GCCCCACCAC GGGTAGGACC AGCTCGACCT GCCGCTGCAT

2029 N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L  
 AACGGCCACA AGTTCAGCGT GTCCGGCAGG GCGGAGGGCG ATGCCACCTA CGGCAAGCTG  
 TTGCCGGTGT TCAAGTCGCA CAGGCCGCTC CCGCTCCCGC TACGGTGGAT GCCGTTCCGAC

2089 T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T  
 ACCCTGAAGT TCATCTGCAC CACCGGCAAG CTGCCCCGTGC CCTGGCCCCAC CCTCGTGACC  
 TGGGACTTCA AGTAGACGTG GTGGCCGTTT GACGGGCACG GGACCGGGTG GGAGCACTGG

2149 T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D  
 ACCCTGACCT ACGGCGTGCA GTGCTTCAGC CGTACCCCCG ACCACATGAA GCAGCACGAC  
 TGGGACTGGA TGCCGCACGT CACGAAGTCG CCGATGGGGC TGGTGTACTT CGTCTGTGCTG

2209 F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D  
 TTCTTCAAGT CCGCCATGCC CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC  
 AAGAAGTTCA GCGGTACGG GCTTCCGATG CAGGTCCTCG CGTGGTAGAA GAAGTTCCTG

2269 D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R  
 GACGGCAACT ACAAGACCCG CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC  
 CTGCCGTTGA TGTTCTGGGC GCGGCTCCAC TTCAAGCTCC CGCTGTGGGA CCACTTGGCC

2329 I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E  
 ATCGAGCTGA AGGGCATCGA CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA CAAGCTGGAG  
 TAGCTCGACT TCCCGTAGCT GAAGTTCCTC CTGCCGTTGT AGGACCCCGT GTTCCGACCTC

2389 Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K  
 TACAAC TACA ACAGCCACAA CGTCTATATC ATGGCCGACA AGCAGAAGAA CGGCATCAAG  
 ATGTTGATGT TGTCGGTGT GCAGATATAG TACCGGCTGT TCGTCTTCTT GCCGTAGTTC

2449 V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y  
 GTGAAC T TCA AGATCCGCCA CAACATCGAG GACGGCAGCG TGCAGCTCGC CGACCACTAC  
 CACTTGAAGT TCTAGGCGGT GTTGTAGCTC CTGCCGTCGC ACGTCGAGCG GCTGGTGATG

2509 Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S  
 CAGCAGAACA CCCCATCGG CGACGGCCCC GTGCTGCTGC CCGACAACCA CTACCTGAGC  
 GTCGTCTTGT GGGGGTAGCC GCTGCCGGGG CACGACGACG GGCTGTTGGT GATGGACTCG

2569 T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E  
 ACCCAGTCCG CCCTGAGCAA AGACCCCAAC GAGAAGCGCG ATCACATGGT CCTGCTGGAG  
 TGGGTCAGGC GGGACTCGTT TCTGGGGTTG CTCTTCGCGC TAGTGTACCA GGACGACCTC

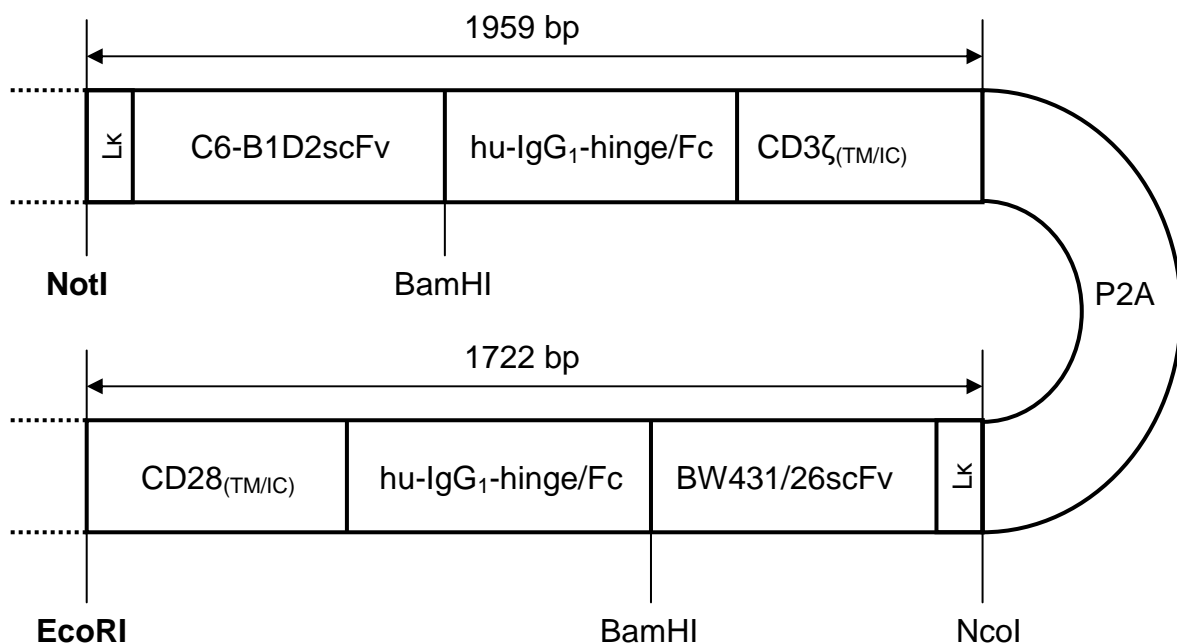
**eGFP** ← 2676

2629 F V T A A G I T L G M D E L Y K \*  
 TTCGTGACCG CCGCCGGGAT CACTCTCGGC ATGGACGAGC TGTACAAGTA **ATGATCCGGA**  
 AAGCACTGGC GCGGCCCTA GTGAGAGCCG TACCTGCTCG ACATGTTCA **TACTAGGCCT**

## 7.2 DNS-Sequenz der bicistronischen Expressionskassetten

### 7.2.1 pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28 (#1262)

Die DNS für die P2A-verknüpften rekombinanten Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-CD28 und C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$  im pMP71-Vektor (#1262) umfasst 3747 bp. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung dienen, sind mit Fettdruck gekennzeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird im Ein-Buchstaben-Code über der Nukleotidsequenz aufgeführt und ist annotiert. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern (\*) markiert.



#### Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28

Nukleotidsequenz incl. Stopp-Codon und Signal-Peptiden [bp]: 3747

Position P2A-DNS-Sequenz [bp]: 1960 - 2025

Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD3ζ

Proteinmasse ohne Signalpeptid [kDa]: 69,3

Aminosäuresequenz ohne Signalpeptid [AS]: 632

Position Signal-DNS-Sequenz [bp]: 1 – 63

Position C6-B1D2scFv [bp]: 64 – 843

Position human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc [bp]: 844 - 1560Position CD3ζ<sub>(TM/IC)</sub> [bp]: 1561 - 1959Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28

Proteinmasse [kDa]: 61

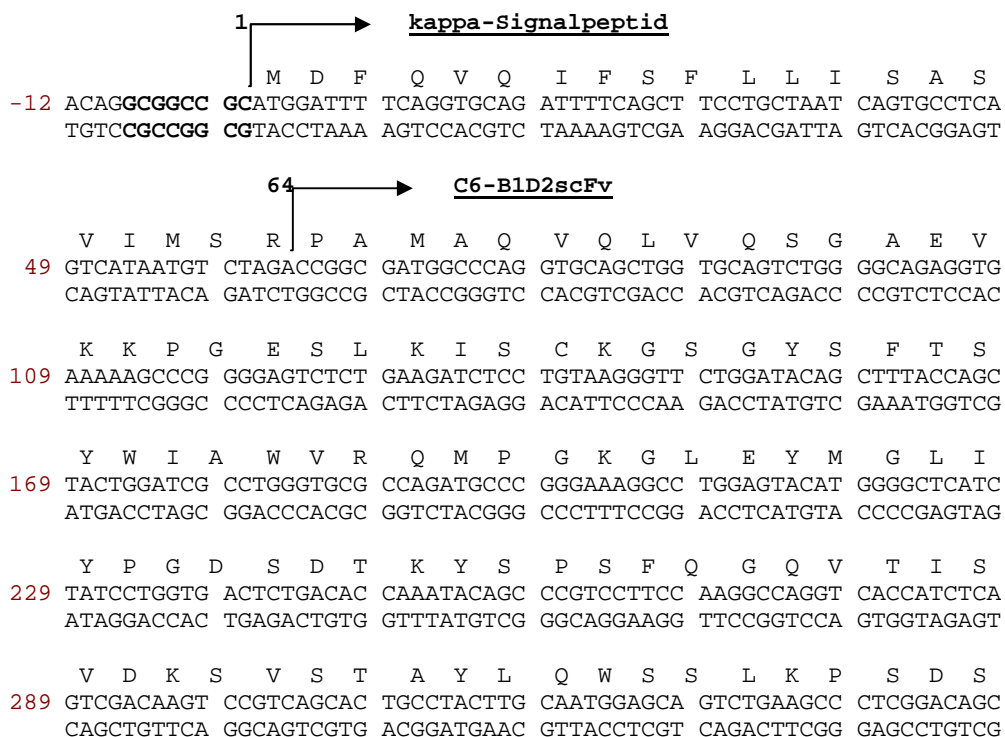
Aminosäuresequenz ohne leader-Peptid [AS]: 553

Position Signal-DNS-Sequenz [bp]: 2026 – 2088

Position BW431/26scFv [bp]: 2089 – 2823

Position human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc [bp]: 2824 - 3540Position CD28<sub>(TM/IC)</sub> [bp]: 3541 - 3744

Position Stopp-Codon [bp]: 3745 - 3747



**C6-B1D2scFv** →

A V Y F C A R H D V G Y C T D R T C A K  
 349 GCCGTGTATT TTTGTGCGAG ACATGACGTG GGATATTGCA CCGACCGGAC TTGCGCAAAG  
 CGGCACATAA AAACACGCTC TGTACTGCAC CCTATAACGT GGCTGGCCTG AACCGTTC

W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G  
 409 TGGCCTGAAT GGCTGGGCGT ATGGGGCCAG GGCACCCTGG TCACCGTCTC CTCAGGTGGA  
 ACCGGACTTA CCGACCCGCA TACCCCGGTC CCGTGGGACC AGTGGCAGAG GAGTCCACCT

G G S G G G G S G G G G S Q S V L T Q P  
 469 GGCGTTTCAG GCGGAGGTGG CTCTGGCGGT GGCGGATCGC AGTCTGTGTT GACGCAACCG  
 CCGCCAAGTC CGCCTCCACC GAGACCGCCA CCGCCTAGCG TCAGACACAA CTGCGTTGGC

P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S  
 529 CCCTCAGTGT CTGCGGCCCC AGGACAGAAG GTCACCATCT CCTGCTCTGG AAGCAGCTCC  
 GGGAGTCACA GACGCCGGG TCCTGTCTTC CAGTGGTAGA GGACGAGACC TTCGTCGAGG

N I G N N Y V S W Y Q Q L P G T A P K L  
 589 AACATTGGGA ATAATTATGT ATCCTGGTAC CAGCAGCTCC CAGGAACAGC CCCCAAACTC  
 TTGTAACCCT TATTAATACA TAGGACCATG GTCGTCGAGG GTCCTTGTCT GGGGTTTGAG

L I Y D H T N R P A G V P D R F S G S K  
 649 CTCATCTATG ATCACACCAA TCGGCCCGCA GGGGTCCCTG ACCGATTCTC TGGCTCCAAG  
 GAGTAGATAC TAGTGTGGTT AGCCGGGCGT CCCCAGGGAC TGGCTAAGAG ACCGAGGTTC

S G T S A S L A I S G F R S E D E A D Y  
 709 TCTGGCACCT CAGCCTCCCT GGCCATCAGT GGGTTCCGGT CCGAGGATGA GGCTGATTAT  
 AGACCGTGGG GTCGGAGGGA CCGGTAGTCA CCCAAGGCCA GGCTCCTACT CCGACTAATA

Y C A S W D Y T L S G W V F G G G T K L  
 769 TACTGTGCCT CCTGGGACTA CACCCTCTCG GGCTGGGTGT TCGGCGGAGG GACCAAGCTG  
 ATGACACGGA GGACCTGAT GTGGGAGAGC CCGACCCACA AGCCGCCTCC CTGGTTCGAG

844 → **human Ig<sub>1</sub>-hinge/Fc**

T V L G A D P A E P K S P D K T H T C P  
 829 ACCGTCCTAG GTGCGGATCC CGCCGAGCCC AAATCTCCTG ACAAACCTCA CACATGCCCA  
 TGGCAGGATC CACGCCTAGG GCGGCTCGGG TTTAGAGGAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT

P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P  
 889 CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAACCC  
 GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG

K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 949 AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
 TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG

H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A  
 1009 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
 1069 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GGGTGGTCAG CGTCCTCACC  
 TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CCCACCAGTC GCAGGAGTGG

V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A  
 1129 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC  
 CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCAGAG GTTGTTCGG

L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
 1189 CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG  
 GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTCT

V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C  
 1249 GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC  
 CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCTACTC GACTGGTTC TGGTCCAGTC GGACTGGACG

human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc →

1309 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
 CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

1369 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCCTCTAC  
 CTCTTGTGTA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG

1429 S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V  
 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG  
 TCGTTCCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

1489 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA  
 TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT

1561 → CD3ζ-TM

1549 K D P K L C Y L L D G I L F I Y G V I L  
 AAAGATCCCA AACTCTGCTA CCTGCTGGAT GGAATCCTCT TCATCTATGG TGTCATTCTC  
 TTTCTAGGGT TTGAGACGAT GGACGACCTA CCTTAGGAGA AGTAGATACC ACAGTAAGAG

1624 → CD3ζ-IC

1609 T A L F L R V K F S R S A D A P A Y Q Q  
 ACTGCCTTGT TCCTGAGAGT GAAGTTCAGC AGGAGCGCAG ACGCCCCCGC GTACCAGCAG  
 TGACGGAACA AGGACTCTCA CTTCAAGTCG TCCTCGCGTC TCGGGGGGCG CATGGTCTGC

1669 G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L  
 GGCCAGAACC AGCTCTATAA CGAGCTCAAT CTAGGACGAA GAGAGGAGTA CGATGTTTTG  
 CCGGTCTTGG TCGAGATATT GCTCGAGTTA GATCCTGCTT CTCTCCTCAT GCTACAAAAC

1729 D K R R G R D P E M G G K P R R K N P Q  
 GACAAGAGAC GTGGCCGGGA CCCTGAGATG GGGGGAAAGC CGAGAAGGAA GAACCCTCAG  
 CTGTTCTCTG CACCGGCCCT GGGACTCTAC CCCCCTTTCG GCTCTTCCTT CTTGGGAGTC

1789 E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G  
 GAAGGCCTGT ACAATGAACT GCAGAAAGAT AAGATGGCGG AGGCCTACAG TGAGATTGGG  
 CTTCCGGACA TGTTACTTGA CGTCTTTCTA TTCTACCGCC TCCGGATGTC ACTCTAACCC

1849 M K G E R R R G K G H D G L Y Q G L S T  
 ATGAAAGGCG AGCGCCGGAG GGGCAAGGGG CACGATGGCC TTTACCAGGG TCTCAGTACA  
 TACTTTCCGC TCGCGGCCCT CCCGTTCCCC GTGCTACCGG AAATGGTCCC AGAGTCATGT

## 1960 →

1909 A T K D T Y D A L H M Q A L P P R G S G  
 GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTTAC ATGCAGGCC TGCCCCCTCG CGGAAGCGGC  
 CGGTGGTTCC TGTGGATGCT GCGGGAAGTG TACGTCCGGG ACGGGGGAGC GCCTTCGCCG

P2A →

## 2026 →

1969 A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P M  
 GCCACGAACT TCTCTCTGTT AAAGCAAGCA GGAGACGTGG AAGAAAACCC CGGTCCCATG  
 CGGTGCTTGA AGAGAGACAA TTTCGTTCTG CCTCTGCACC TTCTTTTGGG GCCAGGGTAC

kappa-Signalpeptid →

2029 D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S R  
 GATTTTCAGG TGCAGATTTT CAGCTTCCTG CTAATCAGTG CCTCAGTCAT AATGTCTAGA  
 CTAAAAGTCC ACGTCTAAAA GTCGAAGGAC GATTAGTCAC GGAGTCAGTA TTACAGATCT

**BW431/26scFv**

2089 G V H S Q V Q L Q E S G P G L V R P S Q  
 GGTGTCCACT CCCAGGTCCA ACTGCAGGAG TCAGGTCCAG GTCTTGTGAG ACCTAGCCAG  
 CCACAGGTGA GGGTCCAGGT TGACGTCCTC AGTCCAGGTC CAGAACACTC TGGATCGGTC

**BW431/26scFv**

2149 T L S L T C T V S G F T I S S G Y S W H  
 ACCCTGAGCC TGACCTGCAC CGTGTCTGGC TTCACCATCA GCAGTGGTTA TAGCTGGCAC  
 TGGGACTCGG ACTGGACGTG GCACAGACCG AAGTGGTAGT CGTCACCAAT ATCGACCGTG

2209 W V R Q P P G R G L E W I G Y I Q Y S G  
 TGGGTGAGAC AGCCACCTGG ACGAGGTCTT GAGTGGATTG GATACATACA GTACAGTGGT  
 ACCCACTCTG TCGGTGGACC TGCTCCAGAA CTCACCTAAC CTATGTATGT CATGTCACCA

2269 I T N Y N P S L K S R V T M L V D T S K  
 ATCACTAACT ACAACCCCTC TCTCAAAAGT AGAGTGACAA TGCTGGTAGA CACCAGCAAG  
 TAGTGATTGA TGTTGGGGAG AGAGTTTTCA TCTCACTGTT ACGACCATCT GTGGTCTGTT

2329 N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y C  
 AACCAGTTCA GCCTGAGACT CAGCAGCGTG ACAGCCGCCG ACACCGCCGT CTATTATTGT  
 TTGGTCAAGT CGGACTCTGA GTCGTGCGAC TGTGCGCGGC TGTGGCGCCA GATAATAACA

2389 A R E D Y D Y H W Y S D V W G Q G T T V  
 GCAAGAGAAG ACTATGATTA CCACTGGTAC TCCGATGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC  
 CGTTCTCTTC TGATACTAAT GGTGACCATG AGGCTACAGA CCCCAGTTCC CTGGTGCCAG

2449 T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D  
 ACCGTCTCCT CAGGAGGTGG TGGATCGGGC GGTGGCGGGT CGGGTGGCGG CGGATCTGAC  
 TGGCAGAGGA GTCCTCCACC ACCTAGCCCG CCACCGCCCA GCCCACCGCC GCCTAGACTG

2509 I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I  
 ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGTGACAG AGTGACCATC  
 TAGGTGCACT GGGTCTCGGG TTCGTGCGAC TCGCGGTGCG ACCCACTGTC TCACTGGTAG

2569 T C S T S S S V S Y M H W Y Q Q K P G K  
 ACCTGTAGTA CCAGCTCGAG TGTAAGTTAC ATGCACTGGT ACCAGCAGAA GCCAGGTAAG  
 TGGACATCAT GGTGAGCTC ACATTCAATG TACGTGACCA TGGTCTGCTT CGGTCCATTC

2629 A P K L L I Y S T S N L A S G V P S R F  
 GCTCAAAGC TGCTGATCTA CAGCACATCC AACCTGGCTT CTGGTGTGCC AAGCAGATTC  
 CGAGGTTTCG ACGACTAGAT GTCGTGTAGG TTGGACCGAA GACCACACGG TTCGTCTAAG

2689 S G S G S G T D F T S T I S S L Q P E D  
 AGCGGTAGCG GTAGCGGTAC CGACTTCACC TCCACCATCA GCAGCCTCCA GCCAGAGGAC  
 TCGCCATCGC CATCGCCATG GCTGAAGTGG AGGTGGTAGT CGTCGGAGGT CGGTCTCCTG

2749 I A T Y Y C H Q W S S Y P T F G Q G T K  
 ATCGCCACCT ACTACTGCCA TCAGTGGAGT AGTTATCCCA CGTTCGGCCA AGGGACCAAG  
 TAGCGGTGGA TGATGACGGT AGTCACCTCA TCAATAGGTT GCAAGCCGGT TCCCTGGTTC

**2824** → **human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc**

2809 V E I K V D P A E P K S P D K T H T C P  
 GTGGAGATCA AAGTGGATCC CGCCGAGCCC AAATCTCCTG ACAAAACTCA CACATGCCCA  
 CACCTCTAGT TTCACCTAGG GCGGCTCGGG TTTAGAGGAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT

2869 P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P  
 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC  
 GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG

2929 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
 TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG

human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc →

H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A  
 2989 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
 3049 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GGGTGGTCAG CGTCCTCACC  
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CCCACCAGTC GCAGGAGTGG

V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A  
 3109 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC  
 CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCCAGAG GTTGTTCGG

L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
 3169 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG  
 GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTCT

V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C  
 3229 GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC  
 CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCCTACTC GACTGGTTC TGGTCCAGTC GGACTGGACG

L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
 3289 CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
 3349 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG

S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V  
 3409 AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG  
 TCGTTCCAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
 3469 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA  
 TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT

3541 → CD28-TM

K D P K F W V L V V V G G V L A C Y S L  
 3529 AAAGATCCCA AATTTTGGGT GCTGGTGGTG GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG  
 TTTCTAGGGT TTAAAACCCA CGACCACCAC CAACCACCTC AGGACCGAAC GATATCGAAC

3622 → CD28-IC

L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H  
 3589 CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTTCTGG GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GCTCCTGCAC  
 GATCATTGTC ACCGAAATA ATAAAAGACC CACTCCTCAT TCTCCTCGTC CGAGGACGTG

S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P  
 3649 AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCCGCCGC CCCGGGCCCA CCCGCAAGCA TTACCAGCCC  
 TCACTGATGT ACTTGACTG AGGGGCGGCG GGGCCCGGGT GGGCGTTCGT AATGGTCGGG

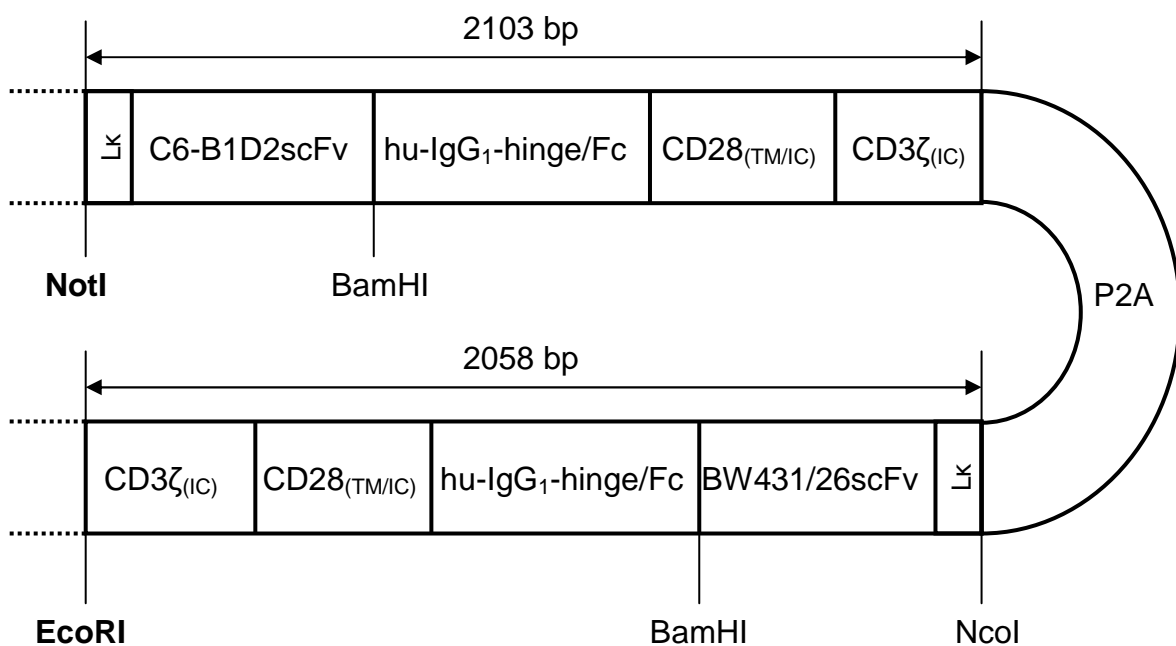
CD28-IC

← 3744

Y A P P R D F A A Y R S \*  
 3709 TATGCCCCC CACGCGACTT CGCAGCCTAT CGCTCCTGAA GATCCGGAAT TCGAGCATCT  
 ATACGGGGGG GTGCGCTGAA GCGTCGGATA GCGAGGACTT CTAGGCCCTTA AGCTCGTAGA

### 7.2.2 pMP71-Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ (#1263)

Die DNS für die P2A-verknüpften rekombinanten Immunrezeptoren BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  und C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  im pMP71-Vektor (#1263) umfasst 4230 bp. Restriktionsschnittstellen, die der Klonierung dienen, sind mit Fettdruck gekennzeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird im Ein-Buchstaben-Code über der Nukleotidsequenz aufgeführt und ist annotiert. Das Stopp-Codon ist mit einem Stern (\*) markiert.



#### Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ -P2A-Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 $\zeta$

Nukleotidsequenz incl. Stopp-Codon und Signal-Peptiden [bp]: 4230

Position P2A-DNS-Sequenz [bp]: 2104 - 2169



Lk-C6-B1D2scFv-Fc-CD28-CD3ζ

Proteinmasse ohne Signalpeptid [kDa]: 75

Aminosäuresequenz ohne Signalpeptid [AS]: 680

Position Signal-DNS-Sequenz [bp]: 1 – 63

Position C6-B1D2scFv [bp]: 64 – 843

Position human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc [bp]: 844 – 1560Position CD28<sub>(TM/IC)</sub> [bp]: 1561- 1764Position CD3ζ<sub>(IC)</sub> [bp]: 1765 - 2103Lk-BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3ζ

Proteinmasse ohne Signalpeptid [kDa]: 74

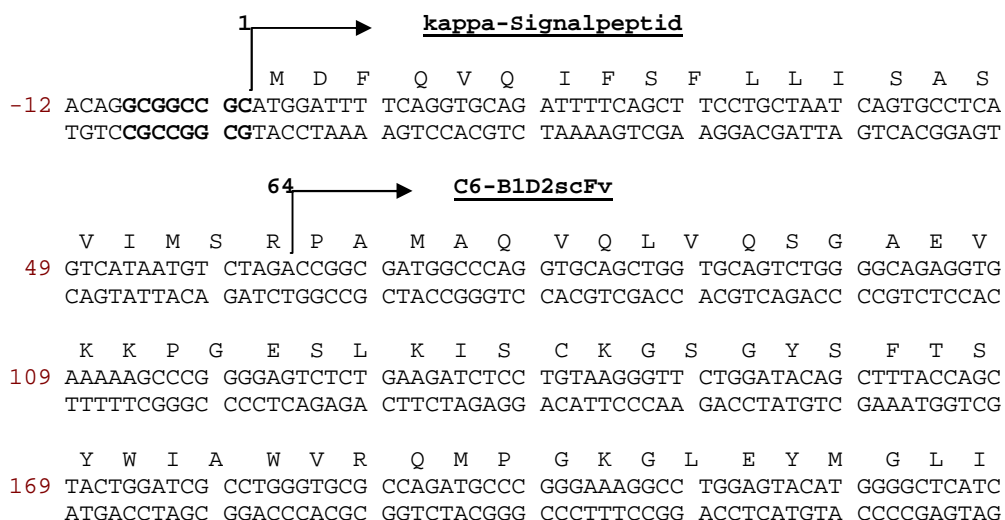
Aminosäuresequenz ohne Signalpeptid [AS]: 665

Position Signal-DNS-Sequenz [bp]: 2170 – 2232

Position BW431/26scFv [bp]: 2233 – 2967

Position human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc [bp]: 2968 - 3684Position CD28<sub>(TM/IC)</sub> [bp]: 3685 – 3888Position CD3ζ<sub>(IC)</sub> [bp]: 3889 - 4227

Position Stopp-Codon [bp]: 4228 – 4230



**C6-B1D2scFv** →

Y P G D S D T K Y S P S F Q G Q V T I S  
 229 TATCCTGGTG ACTCTGACAC CAAATACAGC CCGTCCTTCC AAGGCCAGGT CACCATCTCA  
 ATAGACCAC TGAGACTGTG GTTTATGTGCG GGCAGGAAGG TTCCGGTCCA GTGGTAGAGT

V D K S V S T A Y L Q W S S L K P S D S  
 289 GTCGACAAGT CCGTCAGCAC TGCCTACTTG CAATGGAGCA GTCTGAAGCC CTCGGACAGC  
 CAGCTGTTCA GGCAGTCGTG ACGGATGAAC GTTACCTCGT CAGACTTCGG GAGCCTGTCC

A V Y F C A R H D V G Y C T D R T C A K  
 349 GCCGTGTATT TTTGTGCGAG ACATGACGTG GGATATTGCA CCGACCGGAC TTGCGCAAAG  
 CGGCACATAA AAACACGCTC TGTACTGCAC CCTATAACGT GGCTGGCCTG AACCGTTCCT

W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G  
 409 TGGCCTGAAT GGCTGGGCGT ATGGGGCCAG GGCACCCCTG TCACCGTCTC CTCAGGTGGA  
 ACCGGACTTA CCGACCCGCA TACCCCGGTC CCGTGGGACC AGTGGCAGAG GAGTCCACCT

G G S G G G G S G G G G S Q S V L T Q P  
 469 GCGGTTTCCAG GCGGAGGTGG CTCTGGCGGT GCGGATCGC AGTCTGTGTT GACGCAACCG  
 CCGCCAAGTC CGCCTCCACC GAGACCGCCA CCGCCTAGCG TCAGACACAA CTGCGTTGGC

P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S  
 529 CCCTCAGTGT CTGCGGCCCC AGGACAGAAG GTCACCATCT CCTGCTCTGG AAGCAGCTCC  
 GGGAGTCACA GACGCCGGGG TCCTGTCTTC CAGTGGTAGA GGACGAGACC TTCGTCGAGG

N I G N N Y V S W Y Q Q L P G T A P K L  
 589 AACATTGGGA ATAATTATGT ATCCTGGTAC CAGCAGCTCC CAGGAACAGC CCCCAAACTC  
 TTGTAACCCCT TATTAATACA TAGGACCATG GTCGTCGAGG GTCCTTGTCG GGGGTTTGAG

L I Y D H T N R P A G V P D R F S G S K  
 649 CTCATCTATG ATCACACCAA TCGGCCCGCA GGGGTCCCTG ACCGATTCTC TGGCTCCAAG  
 GAGTAGATAC TAGTGTGGTT AGCCGGGCGT CCCCAGGGAC TGGCTAAGAG ACCGAGGTTC

S G T S A S L A I S G F R S E D E A D Y  
 709 TCTGGCACCT CAGCCTCCCT GGCCATCAGT GGGTTCCGGT CCGAGGATGA GGCTGATTAT  
 AGACCGTGGA GTCGGAGGGA CCGGTAGTCA CCAAGGCCA GGCTCCTACT CCGACTAATA

Y C A S W D Y T L S G W V F G G G T K V  
 769 TACTGTGCCT CCTGGGACTA CACCCTCTCG GGCTGGGTGT TCGGCGGAGG GACCAAGGTC  
 ATGACACGGA GGACCCTGAT GTGGGAGAGC CCGACCCACA AGCCGCCTCC CTGGTTCCAG

844 → **human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc**

T V L G A D P A E P K S P D K T H T C P  
 829 ACCGTCCTAG GTGCGGATCC CGCCGAGCCC AAATCTCCTG ACAAACCTCA CACATGCCCA  
 TGGCAGGATC CACGCCTAGG GCGGCTCGGG TTTAGAGGAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT

P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P  
 889 CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAACCC  
 GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG

K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 949 AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC  
 TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG

H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A  
 1009 CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
 1069 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTTCAG CGTCCTCACC  
 TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC GCAGGAGTGG

V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A  
 1129 GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC  
 CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCAGAG GTTGTTCGG

human IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc →

1189 L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG  
GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG

1249 V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C  
GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC  
CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCTACTC GACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG

1309 L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

1369 E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC  
CTCTTGTGA TGTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG

1429 S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V  
AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG  
TCGTTCCAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

1489 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA  
TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT

1561 → CD28-TM

1549 K D P K F W V L V V V G G V L A C Y S L  
AAAGATCCCA AATTTTGGGT GCTGGTGGTG GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG  
TTTCTAGGGT TTAAAACCCA CGACCACCAC CAACCACCTC AGGACCGAAC GATATCGAAC

1642 → CD28-IC

1609 L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H  
CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTTCTGG GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GCTCCTGCAC  
GATCATTGTC ACCGAAATA ATAAAAGACC CACTCCTCAT TCTCCTCGTC CGAGGACGTG

1669 S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P  
AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCCGCCG CCCGGGCCCA CCCGCAAGCA TTACCAGCCC  
TCACTGATGT ACTTGACTG AGGGGCGGG GGGCCCGGT GGGCGTTCTT AATGGTCGGG

1765 → CD3ζ-IC

1729 Y A P P R D F A A Y R S L R V K F S R S  
TATGCCCCAC CACGCGACTT CGCAGCCTAT CGCTCCCTGA GAGTGAAGTT CAGCAGGAGC  
ATACGGGGTG GTGCGCTGAA GCGTCGGATA GCGAGGGACT CTCACTCAA GTCGTCCTCG

1789 A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G  
GCAGACGCC CCGCGTACCA GCAGGGCCAG AACCAGCTCT ATAACGAGCT CAATCTAGGA  
CGTCTGCGGG GGCATGTTT CGTCCCCTGC TTGGTTCGAGA TATTGCTCGA GTTAGATCCT

1849 R R E E Y D V L D K R R G R D P E M G G  
CGAAGAGAGG AGTACGATGT TTTGGACAAG AGACGTGGCC GGGACCCTGA GATGGGGGGA  
GCTTCTCTCC TCATGCTACA AAACCTGTTT TCTGCACCGG CCCTGGGACT CTACCCCTCT

1909 K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M  
AAGCCGAGAA GGAAGAACCC TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG  
TTCGGCTCTT CCTTCTTGGG AGTCCTTCCG GACATGTTAC TTGACGTCTT TCTATTCTAC

1969 A E A Y S E I G M K G E R R R G K G H D  
GCGGAGGCC ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GGCAGCGCC GGAGGGGCAA GGGGCACGAT  
CGCCTCCGGA TGTACTCTA ACCCTACTTT CCGCTCGCGG CCTCCCCGTT CCCCCTGCTA

2029 G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q  
GGCCTTTACC AGGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT TCACATGCAG  
CCGAAATGG TCCAGAGTC ATGTCGGTGG TTCCTGTGGA TGCTGCGGGA AGTGTACGTC

2104 → P2A  
 A L P P R | G S G A T N F S L L K Q A G D  
 2089 GCCCTGCCCC CTCGCGGAAG CGGCGCCACG AACTTCTCTC TGTAAAGCA AGCAGGAGAC  
 CGGGACGGGG GAGCGCCTTC GCCGCGGTGC TTGAAGAGAG ACAATTTCTG TCGTCTCTG

2170 → kappa-Signalpeptid  
 V E E N P G P | M D F Q V Q I F S F L L I  
 2149 GTGGAAGAAA ACCCCGGTCC CATGGATTTT CAGGTGCAGA TTTTCAGCTT CCTGCTAATC  
 CACCTTCTTT TGGGGCCAGG GTACCTAAAA GTCCACGTCT AAAAGTCGAA GGACGATTAG

2233 → BW431/26scFv  
 S A S V I M S | R | G V H S Q V Q L Q E S G  
 2209 AGTGCCTCAG TCATAATGTC TAGAGGTGTC CACTCCCAGG TCCAACGCA GGAGTCAGGT  
 TCACGGAGTC AGTATTACAG ATCTCCACAG GTGAGGGTCC AGGTTGACGT CCTCAGTCCA

P G L V R P S | Q T L S L T C T V S G F T  
 2269 CCAGGTCTTG TGAGACCTAG CCAGACCCTG AGCCTGACCT GCACCGTGTC TGGCTTCACC  
 GGTCCAGAAC ACTCTGGATC GGTCTGGGAC TCGGACTGGA CGTGGCACAG ACCGAAGTGG

I S S G Y S W H W V R Q P P G R G L E W  
 2329 ATCAGCAGTG GTTATAGCTG GCACTGGGTG AGACAGCCAC CTGGACGAGG TCTTGAGTGG  
 TAGTCGTAC CAATATCGAC CGTGACCCAC TCTGTGGTG GACCTGCTCC AGAACTCACC

I G Y I Q Y S G I T N Y N P S L K S R V  
 2389 ATTGGATACA TACAGTACAG TGGTATCACT AACTACAACC CCTCTCTCAA AAGTAGAGTG  
 TAACCTATGT ATGTCATGTC ACCATAGTGA TTGATGTTGG GGAGAGAGTT TTCATCTCAC

T M L V D T S K N Q F S L R L S S V T A  
 2449 ACAATGCTGG TAGACACCAG CAAGAACCAG TTCAGCCTGA GACTCAGCAG CGTGACAGCC  
 TGTTACGACC ATCTGTGGTC GTTCTTGGTC AAGTCGGACT CTGAGTCGTC GCACTGTCCG

A D T A V Y Y C A R E D Y D Y H W Y F D  
 2509 GCCGACACCG CGGTCTATTA TTGTGCAAGA GAAGACTATG ATTACCACTG GACTTTCGAT  
 CGGCTGTGGC GCCAGATAAT AACACGTTCT CTTCTGATAC TAATGGTGAC CATGAAGCTA

V W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G  
 2569 GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTACCGTTC TCCTCAGGAG GTGGTGGATC GGGCGGTGGC  
 CAGACCCCG TTCCCTGGTG CCAGTGGCAG AGGAGTCCTC CACCACCTAG CCCGCCACCG

G S G G G G S D I Q L T Q S P S S L S A  
 2629 GGGTCGGGTG GCGGCGGATC TGACATCCAG CTGACCCAGA GCCCAAGCAG CCTGAGCGCC  
 CCCAGCCAC CGCCGCCTAG ACTGTAGGTC GACTGGGTCT CGGGTTCGTC GGACTCGCGG

S V G D R V T I T C S T S S S V S Y M H  
 2689 AGCGTGGGTG ACAGAGTGAC CATCACCTGT AGTACCAGCT CGAGTGTAAG TTACATGCAC  
 TCGACCCAC TGTCTACTG GTAGTGGACA TCATGGTCGA GCTCACATTC AATGTACGTG

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S T S N L  
 2749 TGGTACCAGC AGAAGCCAGG TAAGGCTCCA AAGCTGCTGA TCTACAGCAC ATCCAACCTG  
 ACCATGGTCG TCTTCGGTCC ATTCCGAGGT TTCGACGACT AGATGTCGTG TAGGTTGGAC

A S G V P S R F S G S G S G T D F T F T  
 2809 GCTTCTGGTG TGCCAAGCAG ATTCAGCGGT AGCGGTAGCG GTACCGACTT CACCTTCACC  
 CGAAGACCAC ACGGTTCTGTC TAAGTCGCCA TCGCCATCGC CATGGCTGAA GTGGAAGTGG

I S S L Q P E D I A T Y Y C H Q W S S Y  
 2869 ATCAGCAGCC TCCAGCCAGA GGACATCGCC ACCTACTACT GCCATCAGTG GAGTAGTTAT  
 TAGTCGTCCG AGGTCCGGTCT CCTGTAGCGG TGGATGATGA CGGTAGTCAC CTCATCAATA

2968 → human-IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc  
 P T F G Q G T K V E I K V | D P A E P K S  
 2929 CCCACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAAGTGG ATCCCGCCGA GCCCAAATCT  
 GGGTGAAGC CGGTTCCCTG GTTCCACCTC TAGTTTCACC TAGGGCGGCT CGGGTTTAGA

human-IgG<sub>1</sub>-hinge/Fc →

2989 P D K T H T C P P C P A P E L L G G P S  
 CCTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA  
 GGACTGTTTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT

3049 V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V  
 GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC  
 CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT TGGGTTCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG

3109 T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V  
 ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
 TGTACGCACC ACCACCTGCA CTCGGTGCCT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

3169 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T  
 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG  
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT GTTGTCTGTC

3229 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y  
 TACCGGGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCTCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC  
 ATGGCCACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTCTGA CCGACTTACC GTTCTCTCAT

3289 K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A  
 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC  
 TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT CGGGGGTAGC TCTTTTGTA GAGGTTTCGG

3349 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T  
 AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGGA TGAGCTGACC  
 TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT ACTCGACTGG

3409 K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V  
 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG  
 TTCTTGGTCC AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

3469 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D  
 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC  
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG GCACGACCTG

3529 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q  
 TCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG  
 AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATGTCGTTT GAGTGGCACC TGTTCTCTCT CACCGTCTCT

3589 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K  
 GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG  
 CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTCT

3685 → CD28-TM

3649 S L S L S P G K K D P K F W V L V V V G  
 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAAAAAGAT CCCAAATTTT GGGTGTGGT GGTGGTTGGT  
 TCGGAGAGGG ACAGAGGCC ATTTTTTCTA GGGTTTAAAA CCCACGACCA CCACCAACCA

## 3766 →

3709 G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R  
 GGAGTCCTGG CTTGCTATAG CTTGCTAGTA ACAGTGGCCT TTATTATTTT CTGGGTGAGG  
 CCTCAGGACC GAACGATATC GAACGATCAT TGTCACCGGA AATAATAAAA GACCCACTCC

CD28-TM →

3769 S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G  
 AGTAAGAGGA GCAGGCTCCT GCACAGTGAC TACATGAACA TGACTCCCCG CCGCCCCGGG  
 TCATTCTCCT CGTCCGAGGA CGTGTCACTG ATGTACTTGT ACTGAGGGC GGCGGGGCCC

3829 P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S  
 CCCACCCGCA AGCATTACCA GCCCTATGCC CCCCCACGCG ACTTCGCAGC CTATCGCTCC  
 GGGTGGGCGT TCGTAATGGT CGGGATACGG GGGGGTGC GC TGAAGCGTCG GATAGCGAGG

CD3ζ-IC →

3889 L R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q  
 CTGAGAGTGA AGTTCAGCAG GAGCGCAGAC GCCCCCGCGT ACCAGCAGGG CCAGAACCAG  
 GACTCTCACT TCAAGTCGTC CTCGCGTCTG CGGGGGCGCA TGGTCGTCCC GGTCTTGGTC

3949 L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R  
 CTCTATAACG AGCTCAATCT AGGACGAAGA GAGGAGTACG ATGTTTTGGA CAAGAGACGT  
 GAGATATTGC TCGAGTTAGA TCCTGCTTCT CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA

4009 G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y  
 GGCCGGGACC CTGAGATGGG GGGAAAGCCG AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC  
 CCGGCCCTGG GACTCTACCC CCCTTTCGGC TCTTCCTTCT TGGGAGTCCT TCCGGACATG

4069 N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E  
 AATGAACTGC AGAAAGATAA GATGGCGGAG GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG  
 TTACTTGACG TCTTCTATT CTACCGCCTC CGGATGTCAC TCTAACCTA CTTTCCGCTC

4129 R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D  
 CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC  
 GCGGCCTCCC CGTTCCCCGT GCTACCGGAA ATGGTCCCAG AGTCATGTCG GTGGTTCCTG

CD3ζ-IC ← 4227

4189 T Y D A L H M Q A L P P R \*  
 ACCTACGACG CCCTTCACAT GCAGGCCCTG CCCCCTCGCT AAAGATCCGG **AATTTCGAGCA**  
 TGGATGCTGC GGGAAAGTGTG CGTCCGGGAC GGGGGAGCGA TTTCTAGGCC **TTAAGCTCGT**

## 8. Literaturverzeichnis

- Alvarez-Vallina, L, and R E Hawkins. 1996.** Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *European Journal of Immunology* 26, no. 10 (October): 2304-2309.
- Anderson, D R, A Grillo-López, C Varns, K S Chambers, and N Hanna. 1997.** Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochemical Society Transactions* 25, no. 2 (May): 705-708.
- von Andrian, U H, and C R Mackay. 2000.** T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England Journal of Medicine* 343, no. 14 (October 5): 1020-1034.
- Atkins, M B, J A Gould, M Allegretta, J J Li, R A Dempsey, R A Rudders, D R Parkinson, S Reichlin, and J W Mier. 1986.** Phase I evaluation of recombinant interleukin-2 in patients with advanced malignant disease. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 4, no. 9 (September): 1380-1391.
- Beecham, E J, Q Ma, R Ripley, and R P Junghans. 2000.** Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: the dynamics of T-cell proliferation and death. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 23, no. 6 (December): 631-642.
- Bendle, Gavin M, Carsten Linnemann, Anna I Hooijkaas, Laura Bies, Moniek A de Witte, Annelies Jorritsma, Andrew D M Kaiser, et al. 2010.** Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nature Medicine* 16, no. 5 (May): 565-570, 1p following 570.
- Berkey, Franklin J. 2010.** Managing the adverse effects of radiation therapy. *American Family Physician* 82, no. 4 (August 15): 381-388, 394.
- Birkholz, K, A Hombach, C Krug, S Reuter, M Kershaw, E Kämpgen, G Schuler, H Abken, N Schaft, and J Dörrie. 2009.** Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Therapy* 16, no. 5 (May): 596-604.

- Biswas, Swethajit, and Tim Eisen. 2009.** Immunotherapeutic strategies in kidney cancer--when TKIs are not enough. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 6, no. 8 (August): 478-487.
- Blaese, R M, K W Culver, A D Miller, C S Carter, T Fleisher, M Clerici, G Shearer, et al. 1995.** T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)* 270, no. 5235 (October 20): 475-480.
- Boeckmann, W, R P Baum, H Schuldes, W Kramer, A Hertel, T Baew-Christow, P Hanke, D Jonas, and G Hör. 1990.** Tumour imaging of bladder carcinomas and their metastases with 111indium-labelled monoclonal anti-CEA antibody BW 431/26. *The British Journal of Cancer. Supplement* 10 (July): 81-84.
- Böyum, A. 1968.** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum* 97: 77-89.
- Brentjens, Renier, Raymond Yeh, Yvette Bernal, Isabelle Riviere, and Michel Sadelain. 2010.** Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, no. 4 (April): 666-668.
- Brentjens, Renier J, Jean-Baptiste Latouche, Elmer Santos, Francesc Marti, Michael C Gong, Clay Lyddane, Philip D King, et al. 2003.** Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine* 9, no. 3 (March): 279-286.
- Bridgeman, John S, Robert E Hawkins, Steve Bagley, Morgan Blaylock, Mark Holland, and David E Gilham. 2010.** The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184, no. 12 (June 15): 6938-6949.



- Chmielewski, Markus, Andreas Hombach, Claudia Heuser, Gregory P Adams, and Hinrich Abken. 2004.** 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, no. 12 (December 15): 7647-7653.
- Curigliano, Giuseppe, Erica L Mayer, Harold J Burstein, Eric P Winer, and Aron Goldhirsch. 2010.** Cardiac toxicity from systemic cancer therapy: a comprehensive review. *Progress in Cardiovascular Diseases* 53, no. 2 (October): 94-104.
- Davis, Craig B, and Stephen D Gillies. 2003.** Immunocytokines: amplification of anti-cancer immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 52, no. 5 (May): 297-308.
- Dexter, D L, and J T Leith. 1986.** Tumor heterogeneity and drug resistance. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 4, no. 2 (February): 244-257.
- Dudley, Mark E, James C Yang, Richard Sherry, Marybeth S Hughes, Richard Royal, Udai Kammula, Paul F Robbins, et al. 2008.** Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, no. 32 (November 10): 5233-5239.
- Eaton, D, D E Gilham, A O'Neill, and R E Hawkins. 2002.** Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with Bcl-X(L) promotes in vitro lymphocyte survival in pro-apoptotic conditions. *Gene Therapy* 9, no. 8 (April): 527-535.
- Emtage, Peter C R, Agnes S Y Lo, Erica M Gomes, David L Liu, Rosa M Gonzalo-Daganzo, and Richard P Junghans. 2008.** 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: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14, no. 24 (December 15): 8112-8122.
- Fidler, Isaiah J. 2002.** The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 70, no. 9 (December): 498-505.

- Fidler IJ. 2003.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer* 3, no. 6 (June): 453-458.
- Finney, H M, A D Lawson, C R Bebbington, and A N Weir. 1998.** Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161, no. 6 (September 15): 2791-2797.
- Foote, J, and H N Eisen. 2000.** Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, no. 20 (September 26): 10679-10681.
- Gattinoni, L., S. E Finkelstein, et al. 2005.** Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 202, no. 7: 907.
- Gattinoni, L., C. A Klebanoff, D. C Palmer, C. Wrzesinski, K. Kerstann, Z. Yu, S. E Finkelstein, M. R Theoret, S. A Rosenberg, and N. P Restifo. 2005.** Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8 T cells. *Journal of Clinical Investigation* 115, no. 6: 1616–1626.
- Gilham, David E, Allison O'Neil, Chris Hughes, Ryan D Guest, Natalia Kirillova, Margaret Lehane, and Robert E Hawkins. 2002.** Primary polyclonal human T lymphocytes targeted to carcino-embryonic antigens and neural cell adhesion molecule tumor antigens by CD3zeta-based chimeric immune receptors. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* 25, no. 2 (April): 139-151.
- Gorelik, Leonid, Stephanie Constant, and Richard A Flavell. 2002.** Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 11 (June 3): 1499-1505.
- Govers, Coen, Zsolt Sebestyén, Miriam Coccoris, Ralph A Willemsen, and Reno Debets. 2010.** T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends in Molecular Medicine* 16, no. 2 (February): 77-87.
- Grimm, E A, A Mazumder, H Z Zhang, and S A Rosenberg. 1982.** Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 155, no. 6 (June 1): 1823-1841.

- Gross, G, and Z Eshhar. 1992.** Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, no. 15 (December): 3370-3378.
- Gross, G, T Waks, and Z Eshhar. 1989.** Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, no. 24 (December): 10024-10028.
- Gutierrez, Martin E, Shivaani Kummar, and Giuseppe Giaccone. 2009.** Next generation oncology drug development: opportunities and challenges. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 6, no. 5 (May): 259-265.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, no. 4 (June 5): 557-580.
- Haynes, Nicole M, Joseph A Trapani, Michele W L Teng, Jacob T Jackson, Loretta Cerruti, Stephen M Jane, Michael H Kershaw, Mark J Smyth, and Phillip K Darcy. 2002.** Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, no. 10 (November 15): 5780-5786.
- Hehlgans, Thomas, and Klaus Pfeffer. 2005.** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, no. 1 (May): 1-20.
- Heuser, C, A Hombach, C Löscher, K Manista, and H Abken. 2003.** T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Therapy* 10, no. 17 (August): 1408-1419.
- Hombach, A, C Heuser, M Gerken, B Fischer, K Lewalter, V Diehl, C Pohl, and H Abken. 2000.** T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Therapy* 7, no. 12 (June): 1067-1075.
- Hombach, A, C Heuser, R Sircar, T Tillmann, V Diehl, W Kruis, C Pohl, and H Abken. 1997.** T cell targeting of TAG72+ tumor cells by a chimeric receptor with antibody-like specificity for a carbohydrate epitope. *Gastroenterology* 113, no. 4 (October): 1163-1170.

- Hombach, A, C Heuser, R Sircar, T Tillmann, V Diehl, C Pohl, and H Abken. 1998.** An anti-CD30 chimeric receptor that mediates CD3-zeta-independent T-cell activation against Hodgkin's lymphoma cells in the presence of soluble CD30. *Cancer Research* 58, no. 6 (March 15): 1116-1119.
- Hombach, A, C Schlimper, E Sievers, S Frank, H H Schild, T Sauerbruch, I G H Schmidt-Wolf, and H Abken. 2006.** A recombinant anti-carcinoembryonic antigen immunoreceptor with combined CD3zeta-CD28 signalling targets T cells from colorectal cancer patients against their tumour cells. *Gut* 55, no. 8 (August): 1156-1164.
- Hombach, A, A Wieczarkowicz, T Marquardt, C Heuser, L Usai, C Pohl, B Seliger, and H Abken. 2001.** Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167, no. 11 (December 1): 6123-6131.
- Hombach, Andreas A, Verena Schildgen, Claudia Heuser, Ricarda Finnern, David E Gilham, and Hinrich Abken. 2007.** 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, no. 7 (April 1): 4650-4657.
- Imai, Chihaya, Shotaro Iwamoto, and Dario Campana. 2005.** Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106, no. 1 (July 1): 376-383.
- Johnson, Laura A, Richard A Morgan, Mark E Dudley, Lydie Cassard, James C Yang, Marybeth S Hughes, Udai S Kammula, et al. 2009.** Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, no. 3 (July 16): 535-546.
- Jost, L M, J M Kirkwood, and T L Whiteside. 1992.** Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunological Methods* 147, no. 2 (March 4): 153-165.
- Kaulen, H, G Seemann, K Bosslet, W Schwaeble, and W Dippold. 1993.** Humanized anti-carcinoembryonic antigen antibody: strategies to enhance human tumor cell killing. *The Year in Immunology* 7: 106-109.

- Kershaw, Michael H, Michele W L Teng, Mark J Smyth, and Phillip K Darcy. 2005.** Supernatural T cells: genetic modification of T cells for cancer therapy. *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 12 (December): 928-940.
- Kershaw, Michael H, Jennifer A Westwood, Linda L Parker, Gang Wang, Zelig Eshhar, Sharon A Mavroukakis, Donald E White, et al. 2006.** A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, no. 20 (October 15): 6106-6115.
- Khong, Hung T, and Nicholas P Restifo. 2002.** Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunology* 3, no. 11 (November): 999-1005.
- Kieback, Elisa, Jehad Charo, Daniel Sommermeyer, Thomas Blankenstein, and Wolfgang Uckert. 2008.** A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 2 (January 15): 623-628.
- Klebanoff, Christopher A, Luca Gattinoni, Parizad Torabi-Parizi, Keith Kerstann, Adela R Cardones, Steven E Finkelstein, Douglas C Palmer, et al. 2005.** Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, no. 27 (July 5): 9571-9576.
- Koehler, Heike, David Kofler, Andreas Hombach, and Hinrich Abken. 2007.** CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Research* 67, no. 5 (March 1): 2265-2273.
- Koh, H K. 1991.** Cutaneous melanoma. *The New England Journal of Medicine* 325, no. 3 (July 18): 171-182.
- Koprowski, H, Z Steplewski, K Mitchell, M Herlyn, D Herlyn, and P Fuhrer. 1979.** Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5, no. 6 (November): 957-971.
- Lafreniere, R, and S A Rosenberg. 1986.** A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. *Journal of the National Cancer Institute* 76, no. 2 (February): 309-322.

- Lamers, C H J, P van Elzaker, S C L van Steenbergen, S Sleijfer, R Debets, and J W Gratama. 2008.** Retronectin-assisted retroviral transduction of primary human T lymphocytes under good manufacturing practice conditions: tissue culture bag critically determines cell yield. *Cytotherapy* 10, no. 4: 406-416.
- Lamers, C H J, S Sleijfer, R A Willemsen, R Debets, W H J Kruit, J W Gratama, and G Stoter. 2004.** Adoptive immuno-gene therapy of cancer with single chain antibody [scFv(Ig)] gene modified T lymphocytes. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 18, no. 2 (June): 134-140.
- LoBuglio, A F, R H Wheeler, J Trang, A Haynes, K Rogers, E B Harvey, L Sun, J Ghayeb, and M B Khazaeli. 1989.** Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, no. 11 (June): 4220-4224.
- Loskog, A, V Giandomenico, C Rossig, M Pule, G Dotti, and M K Brenner. 2006.** Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20, no. 10 (October): 1819-1828.
- Marin, Virna, Harumi Kakuda, Erica Dander, Chihaya Imai, Dario Campana, Andrea Biondi, and Giovanna D'Amico. 2007.** Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-zeta activating signal. *Experimental Hematology* 35, no. 9 (September): 1388-1397.
- Mitsuyasu, R T, P A Anton, S G Deeks, D T Scadden, E Connick, M T Downs, A Bakker, et al. 2000.** Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 96, no. 3 (August 1): 785-793.
- Mora, J Rodrigo, and Ulrich H von Andrian. 2006.** T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in Immunology* 27, no. 5 (May): 235-243.
- Morgan, Richard A, Mark E Dudley, John R Wunderlich, Marybeth S Hughes, James C Yang, Richard M Sherry, Richard E Royal, et al. 2006.** Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)* 314, no. 5796 (October 6): 126-129.

- Morgan, Richard A, James C Yang, Mio Kitano, Mark E Dudley, Carolyn M Laurencot, and Steven A Rosenberg. 2010.** Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, no. 4 (April): 843-851.
- Moritz, D, and B Groner. 1995.** A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Therapy* 2, no. 8 (October): 539-546.
- Mullis, K, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, and H Erlich. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1: 263-273.
- Nomura, T, and S Sakaguchi. 2005.** Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 293: 287-302.
- Pace, C N, F Vajdos, L Fee, G Grimsley, and T Gray. 1995.** How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 4, no. 11 (November): 2411-2423.
- Park, J G, H K Oie, P H Sugarbaker, J G Henslee, T R Chen, B E Johnson, and A Gazdar. 1987.** Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Research* 47, no. 24 (December 15): 6710-6718.
- Park, Julie R, David L Digiusto, Marilyn Slovak, Christine Wright, Araceli Naranjo, Jamie Wagner, Hunsar B Meechoovet, et al. 2007.** Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15, no. 4 (April): 825-833.
- Patel, S D, M Moskalenko, T Tian, D Smith, R McGuinness, L Chen, G A Winslow, et al. 2000.** T-cell killing of heterogenous tumor or viral targets with bispecific chimeric immune receptors. *Cancer Gene Therapy* 7, no. 8 (August): 1127-1134.
- Pear, W S, G P Nolan, M L Scott, and D Baltimore. 1993.** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 18 (September 15): 8392-8396.

- Petersson, M, J Charo, F Salazar-Onfray, G Noffz, M Mohaupt, Z Qin, G Klein, T Blankenstein, and R Kiessling. 1998.** Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161, no. 5 (September 1): 2099-2105.
- Pulè, Martin A, Karin C Straathof, Gianpietro Dotti, Helen E Heslop, Cliona M Rooney, and Malcolm K Brenner. 2005.** A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 12, no. 5 (November): 933-941.
- Redmond, William L, Carl E Ruby, and Andrew D Weinberg. 2009.** The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical Reviews in Immunology* 29, no. 3: 187-201.
- Reinhold, U, L Liu, H C Lüdtke-Handjery, C Heuser, A Hombach, X Wang, W Tilgen, S Ferrone, and H Abken. 1999.** Specific lysis of melanoma cells by receptor grafted T cells is enhanced by anti-idiotypic monoclonal antibodies directed to the scFv domain of the receptor. *The Journal of Investigative Dermatology* 112, no. 5 (May): 744-750.
- Robbins, P F, J A Kantor, M Salgaller, P H Hand, P D Fernsten, and J Schlom. 1991.** Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line. *Cancer Research* 51, no. 14 (July 15): 3657-3662.
- Rosenberg, S A, M T Lotze, J C Yang, S L Topalian, A E Chang, D J Schwartzentruber, P Aebersold, S Leitman, W M Linehan, and C A Seipp. 1993.** Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 85, no. 8 (April 21): 622-632.
- Rosenberg, S A, J C Yang, D E White, and S M Steinberg. 1998.** Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Annals of Surgery* 228, no. 3 (September): 307-319.



- Savoldo, Barbara, Cliona M Rooney, Antonio Di Stasi, Hinrich Abken, Andreas Hombach, Aaron E Foster, Lan Zhang, Helen E Heslop, Malcolm K Brenner, and Gianpietro Dotti. 2007.** Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 110, no. 7 (October 1): 2620-2630.
- Schor, Nina F. 2009.** New approaches to pharmacotherapy of tumors of the nervous system during childhood and adolescence. *Pharmacology & Therapeutics* 122, no. 1 (April): 44-55.
- Schroder, Kate, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, and David A Hume. 2004.** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75, no. 2 (February): 163-189.
- Schuell, B, T Gruenberger, G V Kornek, N Dworan, D Depisch, F Lang, B Schneeweiss, and W Scheithauer. 2005.** Side effects during chemotherapy predict tumour response in advanced colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 93, no. 7 (October 3): 744-748.
- Schumacher, Ton N M. 2002.** T-cell-receptor gene therapy. *Nature Reviews. Immunology* 2, no. 7 (July): 512-519.
- Smith, K A. 1988.** Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science (New York, N.Y.)* 240, no. 4856 (May 27): 1169-1176.
- Speiser, D E, R Miranda, A Zakarian, M F Bachmann, K McKall-Faienza, B Odermatt, D Hanahan, R M Zinkernagel, and P S Ohashi. 1997.** Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *The Journal of Experimental Medicine* 186, no. 5 (August 29): 645-653.
- Stancovski, I, D G Schindler, T Waks, Y Yarden, M Sela, and Z Eshhar. 1993.** Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151, no. 11 (December 1): 6577-6582.
- Stephan, Matthias T, Vladimir Ponomarev, Renier J Brentjens, Alex H Chang, Konstantin V Dobrenkov, Glenn Heller, and Michel Sadelain. 2007.** T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nature Medicine* 13, no. 12 (11): 1440-1449.
- Takada, Kensuke, and Stephen C Jameson. 2009.** Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature Reviews. Immunology* 9, no. 12 (December): 823-832.

- Van Lier, R A, M Brouwer, and L A Aarden. 1988.** 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, no. 1 (January): 167-172.
- Wang, Jinjuan, Michael Jensen, Yukang Lin, Xingwei Sui, Eric Chen, Catherine G Lindgren, Brian Till, et al. 2007.** Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human Gene Therapy* 18, no. 8 (August): 712-725.
- Weijtens, M E, R A Willemsen, E H Hart, and R L Bolhuis. 1998.** 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, no. 9 (September): 1195-1203.
- Weiss, Bernard. 2010.** Evaluation of multiple neurotoxic outcomes in cancer chemotherapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 678: 96-112.
- de Witte, Moniek A, Annelies Jorritsma, Erwin Swart, Karin C Straathof, Karin de Punder, John B A G Haanen, Cliona M Rooney, and Ton N M Schumacher. 2008.** An inducible caspase 9 safety switch can halt cell therapy-induced autoimmune disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180, no. 9 (May 1): 6365-6373.

**Internetressourcen:**

<http://www.who.int/cancer/en/>

<http://www.cancer.gov/cancertopics>

<http://www.attack-cancer.org>

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Hinrich Abken bedanken, der mich mit dem Projekt dieser Dissertation betraut hat und die Arbeit durch Anregungen und Diskussionen förderte. Er hatte immer ein offenes Ohr und stand mir mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite. Zudem möchte ich mich bei ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Herrn Professor Dr. Jürgen Dohmen gilt mein Dank für seine unkomplizierte Unterstützung meines Promotionsverfahrens in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Uni Köln. Auch ihm möchte ich für die Begutachtung der Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Peter Kloppenburg dafür bedanken, dass er bereitwillig den Vorsitz meiner Disputation übernommen hat. Bei den Mitgliedern der AG Tumorgenetik möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und das Vertrauen, das in mich gesetzt wurde, bedanken. Ich freue mich auf weiterhin gute Zusammenarbeit! Insbesondere erwähnen möchte ich Dr. Markus Chmielewski, Dr. Björn Friedrichs, Dr. Martin Zuther und Dr. Gunter Rappl für ihre hilfreichen Ratschläge und die kritischen Auseinandersetzungen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese akademische Ausbildung ermöglicht haben. Euch, meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für die unermüdliche Unterstützung während der Arbeit und in schwierigen Zeiten.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jürgen Dohmen und Prof. Dr. Hinrich Abken betreut worden.

Köln, 23. September 2010

---

Tobias Riët