

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Direktor: Universitätsprofessor Dr. M. Hallek

**Entwicklung eines neuartigen Kombinations-
Immuntherapie-Ansatzes unter Verwendung von
humanisierten und gentechnisch veränderten
präklinischen Mausmodellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Hanna Ludwig
aus Troisdorf

promoviert am 17.11.2023

Dekan Universitätsprofessor Dr. med. G.R. Fink
1. Gutachter Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. R.T. Roland Ullrich
2. Gutachter Universitätsprofessor Dr. med. R. Thomas

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Sven Borchmann von mir selbst ausgeführt worden. Vorarbeiten bezüglich der Auswahl des hier beschriebenen Therapie Verfahrens wurden von ihm ausgewählt.

Das in dieser Arbeit benutzte Primärmaterial wurde von PatientInnen von den Kollegen der Thoraxchirurgie bereitgestellt, wobei eine Aufklärung über BIOMASOTA erfolgte.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 22.12.2022

Unterschrift:



¹Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Roland Ullrich bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und während der ganzen Laborzeit und danach stets für Fragen und Treffen zur Verfügung stand. Durch die Arbeit in der Arbeitsgruppe wurde mein Interesse an der onkologischen Forschung geweckt und hat mich motiviert meinen weiteren Berufsweg in der Onkologie zu verfolgen.

Auch möchte ich mich bei Dr. Sven Borchmann bedanken, der mich als direkter Ansprechpartner in alle Methoden eingearbeitet hat, unermüdlich alle Fragen beantwortet hat und immer hilfsbereit an meiner Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Lydia Meder. Nicht nur unterstützte Sie mich während meiner Zeit im Labor mit ausführlichen Einarbeitungen, vielen Hilfestellungen und beruhigenden Gesprächen, sondern auch nach der Zeit im Labor, indem Sie mich immer weiter motivierte diese Arbeit zu Ende zu schreiben und eine große Hilfe bei der Korrektur dieser Dissertation war.

Bei Marieke Nill möchte ich mich auch herzlich bedanken, da sie mich bei vielen Arbeiten im Labor unterstützte und sich jederzeit für Hilfe mit den Mäusen zur Verfügung stellte.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten AG Ullrich und AG Klein für die besondere Zeit im Labor bedanken, in der ich stets mit viel Freude ins Labor gekommen bin und immer viel Spaß bei der Arbeit hatte. Hier möchte ich insbesondere Seda, Felix und Lutz erwähnen.

Bei Köln Fortune möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung der Dissertation bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die immer an meiner Seite standen und mich stets unterstützt haben.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Zusammenfassung	11
2. Einleitung.....	12
2.1 Krebs 12	
2.2 Immuntherapie	12
2.2.1. Relevanz des Immunsystems bei der Tumorgenese	12
2.2.2. Wirkungsweise der Checkpoint Inhibition und deren bisheriger Erfolg in der klinischen Anwendung	14
2.2.3. Die Entwicklung der Adoptive T-Zell-Therapie bis zu ersten präklinischen Studien	16
2.2.4. Limitierende Faktoren für die Anwendung einer CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren	18
2.2.5. MHC unabhängige Erkennung von Tumorantigenen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen	19
2.2.6. Gezielter Einsatz von TLR-Agonisten mit antitumoralem Potential	20
2.3 Prognostischer Effekt von Tumor infiltrierende Immunzellen in soliden Tumoren	22
2.4 Mausmodelle in der Krebsforschung	24
2.4.1. Humanisiertes Mausmodell	24
2.4.2. Patient-Derived-Xenograft Mausmodell	25
2.4.3. Syngene Mausmodelle	25
2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit.....	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Materialien	27
3.1.1. Geräte 27	
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	27
3.1.3. Chemikalien.....	28
3.1.4. Antikörper und Zytokine	28
3.1.5. Zelllinien 30	
3.1.6. Medien und Puffer	31
3.1.7. Primärgewebe	31
3.2 Methoden	32
3.2.1. Methoden der Zellkulturen	32
3.2.2. Isolation und Aufreinigung der humanen peripheren Blut-Monozyten.....	33
3.2.3. Induktion der humanen Effektorzellen für die adoptive Zelltherapie.....	34
3.2.4. Induktion der murinen Effektorzellen für die adoptive Zelltherapie	36
3.2.5. Viabilitätsmessungen	37

3.2.6.	Durchführung <i>der In-vivo</i> Experimente	38
3.2.7.	Humanisiertes <i>Patient-Derived-Xenograft</i> Mausmodell	41
3.2.8.	Durchflusszytometrie	42
3.2.9.	Immunhistologie	44
3.2.10.	Statistik	45
4.	Ergebnisse	46
3.3	<i>Phänotypisierung der Effektorzellen mittels Durchflusszytometrie zeigt erfolgreiche Proliferation in die unterschiedlichen Immunzelltypen in vitro</i>	46
3.4	<i>Viabilitätsmessung zeigt starken antitumoralen Effekt der kombinierten Effektorzellen in vitro</i>	49
3.5	<i>In-Vivo Experimente</i>	51
3.5.1.	Immunhistologie bestätigt erfolgreiche Humanisierung der NSG-Mäuse mit humanen Immunzellen	51
3.5.2.	Triple Immuntherapie führt in allen subkutanen Tumoren im humanisierten Mausmodell zu einer deutlichen Regression der TumorgroÙe	53
3.5.3.	Tumorwachstum im Patient-Derived-Xenograft Mausmodell unter der Triple Kombinationstherapie	60
3.5.4.	Triple Kombinationstherapie führt auch im murinen syngenem Mausmodell zu einer Regression der Tumorumlumina	63
3.6	<i>Immunzellinfiltrationen der in-vivo Tumore</i>	65
3.6.1.	Triple Kombinationstherapie führt zu einer erhöhten Immunzellinfiltration in den Tumoren	66
4.	Diskussion	77
4.1	<i>Humanisiertes Mausmodell und PDX Modell zur Imitation des humanen Immunsystems und deren präklinische Relevanz</i>	77
4.2	<i>Therapieerfolg Kombinationstherapie aus ACT, TLR-Agonisten und aPD-1 Antikörpern und deren Übertragbarkeit in die Klinik</i>	80
4.3	<i>Syngenes Mausmodell bestätigt Therapieerfolg der Triple-Kombinationstherapie</i>	82
4.4	<i>Erhöhte Infiltration der Tumore mit gd-T-Zellen korreliert mit Tumorregression</i>	83
4.5	<i>Immuntherapie Kombinationen erhöhen die Infiltration mit CD4+, CD8+, CD3+ T-Zellen und NKT-Zellen</i>	84
5.	Literaturverzeichnis	86
6.	Anhang	98
6.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	98
6.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	99
7.	Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen	99

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
$\gamma\delta$ -T-Zellen	Gamma-delta-T-Zellen
(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
aCD	<i>anti cluster of differentiation</i>
ACT	<i>adoptive cellular therapy</i>
APC	<i>antigen-presenting-cell</i>
aPD-1	<i>anti programmed-death-receptor-1</i>
BW	<i>body weight</i>
CAR-T-Zellen	Chimäre Antigenrezeptor-T-Zelle
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIK	<i>cytokine-induced-killer-cells</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	<i>cytotoxic-t-lymphocytes</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked-immune-so-essay</i>
Epi	<i>Eppendorf-Tube</i>
FSC-A	<i>forward scatter area</i>
FSC-H	<i>forward scatter height</i>
Gen luc2	Luciferase-Gen 2
GvHD	<i>graft-versus-host-disease</i>
h	Stunden
huEM	<i>Humanes Effektorzellmedium</i>
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma
kg	Kilogramm

LAK	<i>lymphocine-activated-killer-cells</i>
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
muEM	murines Effektorzell-Medium
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
NSG	<i>NOD scid gamma mouse</i>
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein-1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death protein-ligand-1</i>
PDX	<i>patient derived xenograft</i>
PFS	<i>progression free survival</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
s.c.	sukcutan
T-Tumorzellen	<i>target cells</i>
TAA	Tumor-assoziierte-Antigene (TAA)
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>toll-like-receptors</i>
TNF- α	<i>tumor-necrosis-factor alpha</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderen/m
v	viral
Who	<i>world health organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

κB	kappaB
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1. Zusammenfassung

Die Immuntherapie ist in den letzten Jahren zu einer wichtigen Säule in der Therapie onkologischer und hämatologischer Erkrankungen herangewachsen und steht heutzutage neben der Chirurgie, Chemotherapie, Bestrahlung und den zielgerichteten molekularen Therapien für die therapeutische Versorgung dieser Erkrankungen zur Verfügung. Bei den Immuntherapien ist es das Ziel das körpereigene Immunsystem zu aktivieren, damit dieses befähigt wird eine gezielte Immunantwort gegen den Tumor oder die hämatologische Erkrankung zu erzielen. Die klinische Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren, welche zuletzt in den klinischen Leitlinien diverser onkologischer Erkrankungen etabliert wurden, zeigt jedoch in der Monotherapie bisher nur begrenzten Erfolg bei dem Großteil der Patienten, sodass der Bedarf nach weiteren Kombinationstherapien groß ist. Bevor kombinierte Immuntherapien in klinischen Studien getestet werden, müssen sie in der präklinischen Forschung in Mausmodellen getestet werden und stoßen dort meist auf Einschränkungen in der Übertragbarkeit des murinen Immunsystems auf das humane. In dieser Arbeit wurden daher drei unterschiedliche Tumor-Mausmodelle mit einer kombinierten Immuntherapie aus einer adoptiven T-Zelltherapie mit einem Checkpoint-Inhibitor und lokalen TLR-Agonisten untersucht. Hierbei konnte eine Überlegenheit dieser 3-fach Kombinationstherapie im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien gezeigt werden. Neben einem autochthonen murinen Mausmodell wurde hierfür ein humanisiertes Mausmodell verwendet, in welchem ein humanes Immunsystem induziert wurde. Zudem konnte ein autologes Mausmodell mit patienteneigenem Tumorgewebe und Immunzellen etabliert werden und der Erfolg der Kombinationstherapie in Bezug auf eine Tumorregression in diesem Modell gezeigt werden. In den behandelten Tumoren konnte gezeigt werden, dass durch die 3-fache Kombinationstherapie eine erhöhte Infiltration mit bestimmten Immunzellgruppen zu verzeichnen war. Eine erhöhte Infiltration mit gd-T-Zellen in Tumoren korrelierte hier mit einem guten Therapieansprechen und einer Tumorregression.

2. Einleitung

2.1 Krebs

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen weltweit, und allein verantwortlich für 9,6 Millionen Todesfälle im Jahr 2018 mit einer steigenden Tendenz in Inzidenz und Mortalität in den letzten Jahren [1]. Durch eine älter werdende Gesellschaft und die globale Industrialisierung nimmt die Inzidenz stetig zu. Lungenkrebs ist bei Betrachtung beider Geschlechter mit 11,6 % und mit 18,4 % die häufigste Krebserkrankung weltweit, die im Jahr 2018 zum Tode geführt hat [1]. Laut der *world health organization* (WHO) sind ein Drittel der Todesfälle durch Krebs mit Risikofaktoren wie Adipositas, Tabakkonsum, Alkoholkonsum und Mangel an gesunder Ernährung und Bewegung assoziiert [1], [2]. Andere Risikofaktoren sind Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder Infektionen mit humanen Papillomaviren, die bis zu 25 % der Krebserkrankungen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommensniveau ausmachen [1], [3]. Es wird daher davon ausgegangen, dass ca. 30-50 % aller neuauftretender Krebserkrankungen durch eine Reduktion der genannten Risikofaktoren vermeidbar wären [2].

Leider werden viele neoplastische Erkrankungen erst in einem späten Stadium entdeckt und erschweren somit die Möglichkeit einer erfolgreichen Therapie, sodass der Prävention und der frühen Diagnostik eine wichtige Bedeutung neben einer effizienten Therapie zugeordnet wird. In der Therapie onkologischer und hämatologischer Erkrankungen haben sich neben der klassischen Chemotherapie, Bestrahlung und operativer Resektion neuere personalisierte molekulare Therapien und die Immuntherapie etabliert.

2.2 Immuntherapie

2.2.1. Relevanz des Immunsystems bei der Tumorgenese

In einem gesunden menschlichen Immunsystem patrouillieren die Immunzellen stetig durch den Körper und können auf neu auftretende maligne Zellen mit einer Elimination dieser reagieren, da sich diese häufig durch Antigene oder andere Proteine als körperfremd wahrnehmen lassen. In klinischen Studien konnten in den 1990er Jahren tumor-assoziierte Antigene (TAA) identifiziert werden, welche ein Erkennungssignal für Immunzellen darstellen, indem sie die exprimierende Zelle als „körperfremd“ markieren [4]. Zu den TAA's zählen überexprimierte Antigene, die auch auf normalen Zellen zu finden sind, jedoch auf Tumorzellen überexprimiert vorhanden sind und oft einen Wachstumsvorteil der Tumorzellen anzeigen [5].

Auch Neoantigene, die durch somatische Mutationen innerhalb der Tumorzellen entstehen, gehören zu den TAA's [6]. In einer menschlichen Körperzelle können täglich bis zu 20.000 DNA Mutationen auftreten, die durch gegebene Reparaturmechanismen unterbunden werden und damit keinen pathogenen Effekt auf die Zellen haben [7], [8]. Wird eine Mutation von diesen Reparaturmechanismen nicht erkannt, und es entwickelt sich eine potentiell maligne Zelle, wird diese vom Immunsystem im Regelfall durch die Expression der TAA's erkannt und eliminiert [9]. Die Antigene werden in der Regel durch *Major Histocompatibility Complex molecules* (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert und können mit den T-Zellrezeptoren interagieren [9]. Für eine zytotoxische Reaktion der T-Zellen ist die Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen nötig, damit eine Transformation von einer naiven T-Zelle zu einer zytotoxischen T-Zellen erfolgen kann. Einigen malignen Zellen gelingt es jedoch dieser Immunantwort zu entkommen und sich damit zu einem malignen metastasierenden Tumor zu entwickeln [10]. Es wird angenommen, dass diese Überwindung der Immunantwort durch Expression von inhibitorischen Liganden, der Expression von weniger TAA's oder durch einen Verlust von MHC-Molekülen gelingt [10], [11].

Dieses Entkommen der Immunantwort von Tumorzellen wurde 2011 zum 8. *hallmark of cancer* benannt [12]. Bei diesem Entkommen spielen jedoch nicht nur Prozesse in den Tumorzellen eine wichtige Rolle, sondern auch Umstrukturierungen im Mikromilieu des Stromas, welches als *Tumormicroenvironment* bezeichnet wird [13], [14]. Durch gezielte Produktion von bestimmten Zytokinen und Wachstumsfaktoren können sich Tumorzellen eine Umgebung aufbauen, die wachsenden Tumorzellen toleriert und eine weitere Proliferation begünstigen, beispielsweise durch spezifische Anlockung und inhibierende Beeinflussung von Immunzellen [14]. Therapiestrategien in der Immuntherapie setzen an diesen genannten Strukturen oder im *Tumormicroenvironment* an, indem sie entweder die unterdrückte Immunantwort durch Tumorzellstrukturen aufheben oder durch Modulationen Strukturen des Immunsystems auf die Tumorzellen und deren Antigene spezifisch induzieren können.

Mit der Entdeckung der Immuncheckpoints im Jahr 1996 wurde ein großer Meilenstein in der Immuntherapie gelegt, der 2018 mit dem Nobelpreis der Medizin, an das Forscherteam Honjo und Allison für die Entdeckung des *programmed-death-molecule-1* auf T-Zellen, honoriert wurde [15], [16]. Auch im Bereich der adoptiven T-Zelltherapie zeigten sich in den letzten Jahren vielversprechende Therapieansätze durch die Entwicklung von *chimären Antigenrezeptor-T-Zellen* (CAR T-Zellen), die neben den Checkpoint-Inhibitoren ebenfalls eine Zulassung zur Behandlung ausgewählter Neoplasien erhielten. Der komplexe Zusammenhang zwischen Tumor, *Tumormicroenvironment* und dem Immunsystem ist für jeden Patienten individuell und erschwert somit die Etablierung einer einheitlichen Therapie, die für alle

Tumoridentitäten anwendbar ist. Daher geht der Trend in der präklinischen Forschung in Richtung einer personalisierten Immuntherapie. Bei den personalisierten Therapien stehen die immunologischen, genetischen, zellulären und molekularen Faktoren der Erkrankung im Vordergrund und ermöglichen es eine individuelle Therapie zu generieren. Diese ist aufwendiger als herkömmliche Therapien, jedoch vielversprechender bezüglich des Therapieansprechens und der Minimierung von Nebenwirkungen.

2.2.2. Wirkungsweise der Checkpoint Inhibition und deren bisheriger Erfolg in der klinischen Anwendung

Interaktionen im menschlichen Immunsystem sind maßgeblich an der Differenzierung und Wechselwirkung zwischen den Immunzellen und deren adaptiven Entwicklung verantwortlich. Neben der Stimulation durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren der Immunzellen existieren auch inhibitorische Signale, die eine überschießende Immunreaktion verhindern können, welche von aktivierten T-Zellen induziert werden [17]. Für die Aktivierung von T-Zellen bedarf es einerseits einer Interaktion des T-Zellrezeptors mit einem MHC-Molekül, welches mit einem Antigenfragment beladen ist und einer antigenpräsentierenden Zelle, die über einen B7 Ligand mit dem CD38 Rezeptor interagiert [17], [18]. Diese Aktivierung der T-Zellen kann durch mehrere inhibitorische Achsen unterdrückt werden. Neben dem *cytotoxic T lymphocyte-associated-antigen-4* (CTLA-4) und dessen Interaktion mit dem B7 Ligand existiert der *programmed-death-protein 1 receptor* (PD-1), der mit dem *programmed-death-ligand 1;2* interagieren kann und so eine inhibitorische Synapse formieren kann [19], [20]. Diese Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 führt über intrazelluläre Phosphorylierungen in den T-Zellen zu deren Inaktivierung [19].

In Abbildung 1 ist die Expression des PD-L1 auf antigenpräsentierenden Zellen und Tumorzellen sowie die Interaktion mit der T-Zellen als zentrale Interaktionspartner zu sehen [21]. Durch monoklonale Antikörper können sowohl der PD-1- Rezeptor als auch der PD-Ligand-1 blockiert werden und damit die Inhibition der T-Zellen aufgehoben werden [22]. Folglich kann die T-Zelle die Aktivierungskaskade wieder durchlaufen und damit einen antitumoralen Angriff auf die Tumorzellen induzieren [18]. 2011 wurden die ersten monoklonalen Antikörper zur Immuncheckpoint-Inhibition zugelassen, seitdem setzte sich eine Präferenz zu der Inhibition des PD-1/PD-L1 Checkpoints durch, da diese Inhibitoren ein besseres Wirkungsprofil mit weniger Nebenwirkungen aufweisen [19], [23].

Immuncheckpoint-Inhibitoren wurden initial für Melanome und Bronchialkarzinome zugelassen und erzielten in den ersten klinischen Studien gute Ergebnisse, sodass sie in die Leitlinien

aufgenommen wurden. In einer Studie wurde beispielsweise das Ansprechen von Pembrolizumab (PD-L1-Antikörper) bei Lungenkarzinomen mit einer PD-L1 Expression $\leq 50\%$ im Vergleich zu einer Chemotherapie getestet. Die Ansprechrate in der PD-L1- Antikörper Kohorte lag bei 45 %, bei der Chemotherapie nur bei 28 %, und führte zu einem verbesserten Gesamtüberleben (30,5 Monate vs. 14,2 Monate) bei weniger auftretenden Nebenwirkungen im Vergleich zur Chemotherapie [24]. Dennoch sind die immunvermittelten Nebenwirkungen einer Checkpoint-Inhibition nicht zu unterschätzen, da sie zu schweren Infektionskrankheiten wie Kolitis, Hepatitis oder einer Pneumonitis führen können [25], [26].

Obwohl die Checkpoint Inhibitoren schon in einigen Leitlinien integriert wurden, können sie nicht bei jeder Tumoridentität erfolgreich angewendet werden. In neueren klinischen und präklinischen Studien werden diverse Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika oder anderen Immunstimulanzien erforscht, um das Potential dieser Therapie zu maximieren [27].

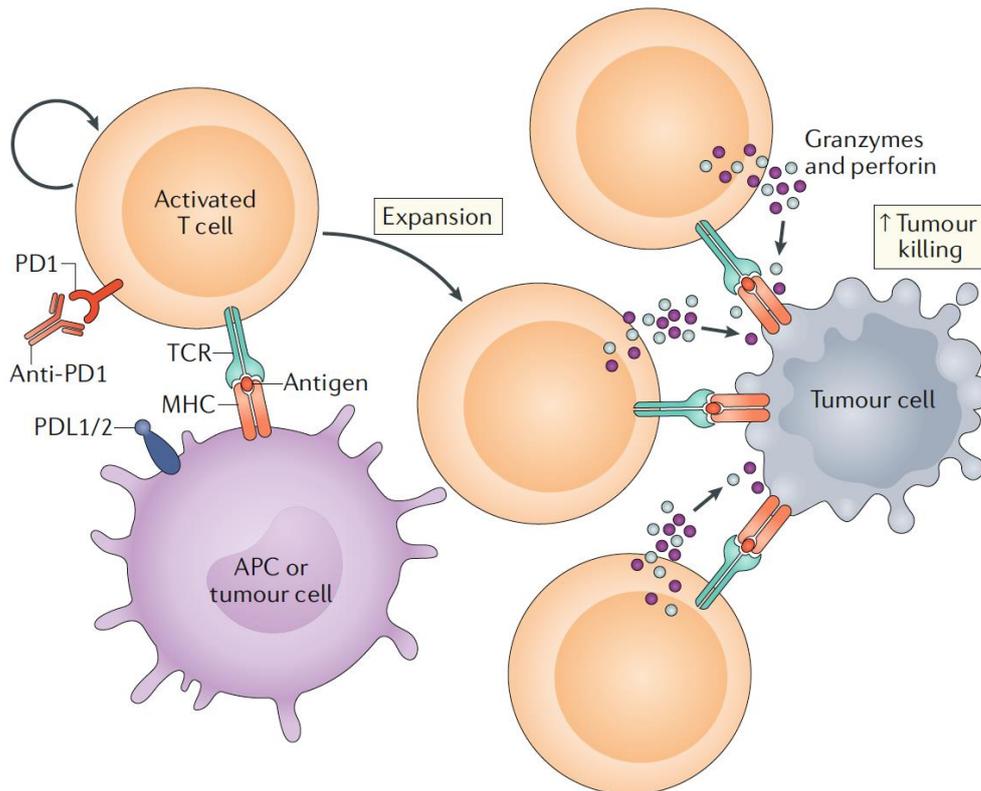


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen der Checkpoint-Inhibitoren

Monoklonale Antikörper in der PD-1/PD-L1 Achse können sowohl die Rezeptoren auf T-Zellen, NK-Zellen als auch die Liganden auf den antigenpräsentierenden Zellen und Tumorzellen inhibieren. Das Ziel dieser Immuntherapie ist eine Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen, die so eine zytotoxische Aktivität gegen die Tumorzellen aufweisen können und eine gleichzeitige Inhibition von regulatorischen T-Zellen erzielen (Treg). Durch eine Präsentation der Antigene durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) oder Tumorzellen können naive T-Zellen aktiviert werden und es erfolgt eine Expansion, die zu einer verstärkten Freisetzung von Granzymen und Perforinen führt und damit Tumorzellen eliminieren können. (verändert nach Waldmann et al. 2020 [28])

2.2.3. Die Entwicklung der Adoptiven T-Zell-Therapie bis zu ersten präklinischen Studien

Die adoptive T-Zell-Therapie (ACT) ist eine Form der Immuntherapie, bei der tumorspezifische Immunzellen *ex vivo* kultiviert, expandiert und spezifisch differenziert werden um dann dem Patienten als Therapeutikum zurück infundiert werden und in diesem einen antitumoralen Effekt auf den spezifischen Tumor zu erzielen. Heutzutage werden diverse Formen der ACT unterschieden. Im Fokus dieser Therapien stehen meistens die T-Zellen, jedoch entsteht durch neuere Studien auch ein größeres Interesse an natürlichen Killerzellen und deren Potential in der Immuntherapie [29]. Die T-Zellen werden für die adoptiven Therapien entweder aus Tumorbiospien entnommen und *in vitro* kultiviert, oder sie werden dem peripheren Blut entnommen und ebenfalls *in vitro* kultiviert und expandiert. Bei den neueren Formen der ACT

werden T-Zellen *ex vivo* gentransferiert und erhalten so eine bestimmte Erkennungssequenz für Antigene, die von den neoplastischen Zellen exprimiert werden.

Im Feld der adoptiven T-Zelltherapie wurden die ersten Therapieideen vor 40 Jahren dokumentiert. Angefangen mit methodischen Schwierigkeiten bei der Kultivierung von Immunzellen *ex vivo* und der damit verbundenen chemischen Synthese von Interleukin-2, begann die zielgesetzte *ex vivo* Kultivierung von spezifischen Immunzellsubtypen [30], [31]. Erste Studien wurden in den 1980er Jahren im National Cancer Institute durchgeführt, in denen Immunzellen aus Tumorbiopsien von Melanom Patienten isoliert wurden, mit IL-2 *in vitro* kultiviert und den Patienten intravenös reinfundiert wurden [32]. Die Ansprechrate betrug zwar 34 %, jedoch war dieses Ansprechen nicht von Dauer, da der therapeutische Effekt nur einige Monate anhielt [32]. Es wurden weitere Optimierungen der Therapie untersucht, in dem eine initiale Lymphodepletion bei den Patienten durchgeführt wurde, gefolgt von einer Infusion der kultivierten Immunzellen und erzielten damit deutlich bessere Therapieerfolge [33], [34]. Diese Therapie führte bei 20 der 93 Probanden zu einer Komplettremission, die auch noch 3 Jahre nach Behandlung anhielt [34]. Auch heutzutage wird dieses Therapieregime aus tumorinfiltrierenden Immunzellen (TIL), die *ex vivo* kultiviert werden und in Kombination mit einer Lymphodepletion verabreicht werden, in klinischen Studien getestet [34]–[36].

Erste Ergebnisse der Phase 1 und 2 zeigten eine Ansprechrate um 50 % bei Patienten, die unter einem metastasierten Melanom leiden [34]–[36]. Neben dem Melanom wird die Expansion von TIL's auch bei anderen Tumoridentitäten durchgeführt und das Therapieansprechen untersucht. Der Erfolg dieser Therapie ist jedoch maßgeblich von der Mutationslast in den Tumorzellen und der damit verbundenen, erhöhten Präsentation von Neoantigenen oder anderen TAA's auf den Zellen abhängig, da deren Anwesenheit auf Tumorzellen in bisherigen Studien zu einem signifikant besseren Therapieansprechen geführt haben [37]. Durch eine Verringerung oder den Verlust von MHC Molekülen in den Tumorzellen kann die Anwendung der Therapie mit TIL's ebenfalls eingeschränkt sein, da die T-Zellen diese Präsentation für eine effektive zytotoxische Reaktion benötigen [38]. Diese Einschränkung besteht bei der genetisch modifizierten T-Zellrezeptorthherapie. Hierbei werden T-Zellen aus dem Blut der Patienten isoliert und genetisch modifiziert, sodass mehr $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren exprimiert werden [39], [40]. Diese Therapie ist auch in besonderem Maße von der Expression der MHC Molekülen auf den Tumoren abhängig. Eine MHC Molekül unabhängige Erkennung von Tumorzellstrukturen ist hingegen durch eine CAR-T-Zelltherapie oder eine adoptive T-Zelltherapie mit $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich [41]–[43].

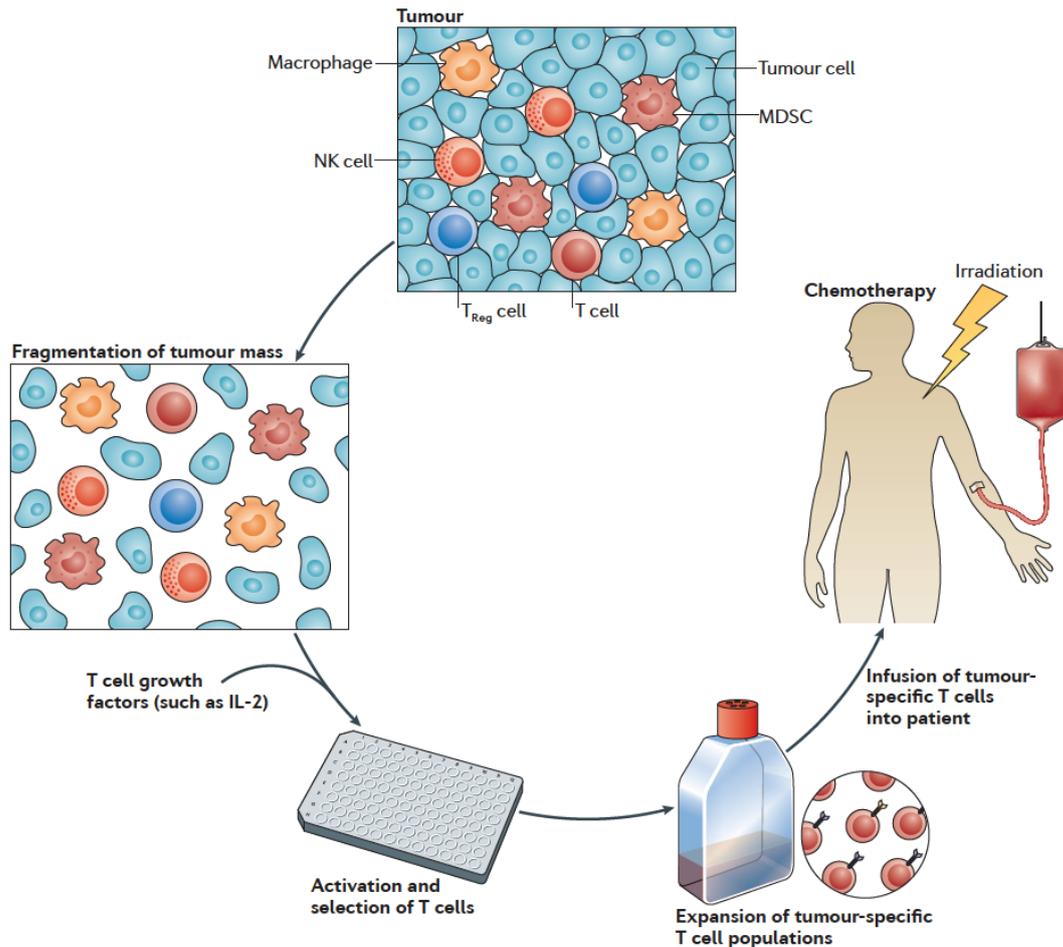


Abbildung 2: Schematische Übersicht der Durchführung einer adoptiven T-Zelltherapie
 Durch eine Tumorbioptie können Tumorzellen und ihre infiltrierenden Immunzellen gewonnen werden, wobei oft viele diverse Populationen an Immunzellen isolierbar sind. Mittels dem T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 können T-Zellen isoliert expandiert werden und durch Anwendung diverser Protokolle zu spezifischen T-Zellsubtypen proliferieren. Diese Zellen können den Patienten als Therapeutikum zurück infundiert werden, nachdem sie oft durch eine Lymphodeplektion vorbehandelt wurden. (verändert nach Restifo et al. 2012 [44])

2.2.4. Limitierende Faktoren für die Anwendung einer CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren

Bei der CAR-T-Zelltherapie werden patienteneigene T-Zellen *ex vivo* durch eine Gentransduktion mit einem chimären Antigenrezeptor ausgestattet, expandiert und nach erfolgreicher Expansion den lymphodepletierten Patienten reinfundiert. CAR-T-Zellen können Antigene der Tumorzellen, unabhängig von einer MHC-abhängigen Präsentation über eine Bindungsdomäne, erkennen [38], [45]. Diese besteht aus einem genetisch modifizierten Antikörperfragment, welches definierte Antigene erkennen und durch die Bindung an diese ein Aktivierungssignal an die intrazellulär gelegene Signalsequenz senden kann [46]. Die Aktivierung in den T-Zellen führt zu einer Expansion dieser und endet mit einer starken

zytotoxischen Reaktion gegen die Tumorzellen. Nach erfolgreicher Elimination der Tumorzellen können die CAR-T-Zellen nun weiter im System bestehen bleiben und können bei einem Wiederauftreten der Tumorzellen erneut mit einer zytotoxischen Antwort reagieren [47]. Zugelassen ist eine Behandlung mit CAR-T-Zellen in Deutschland aktuell für B-Zell-Lymphome und eine B-Linien-ALL.

Auch die Anwendung der CAR-T-Zelltherapie ist klinisch derzeit noch sehr begrenzt, da sie zu schweren toxischen Nebenwirkungen führen kann und bisher nur eine gezielte Wirksamkeit bei der Adressierung des Rezeptor an CD19 geführt hat [48], [49]. In klinischen Studien wird derzeit eine Anwendung von CAR-T-Zellen bei anderen hämatologischen Neoplasien und bei soliden Tumoren untersucht [50]–[52]. Da ein optimaler CAR eine nur auf den Tumorzellen vorkommende Zielstrukturen (Antigen) angreifen sollte, die auf normalen Zellen nicht vorhanden ist, ist die Modulation dieser Rezeptoren für solide Tumore sehr schwierig, da bei diesen oft keine einheitlichen Antigene vorhanden sind oder diese von intrazelluläre Proteinen abstammen, welche ebenfalls schwer anzuzielen sind [53], [54]. Weitere Einschränkungen können durch das immunsupprimierende Tumormicroenvironment und den erschwerten Transport der Zellen durch physikalischen Barrieren gegeben sein [13], [55]–[57].

2.2.5. MHC unabhängige Erkennung von Tumorantigenen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind ein Subtyp der CD3+ T-Zellfraktion, sie machen im peripheren Blut einen Anteil von 0,5-16 % dieser aus und im Interstitium bis zu 30 % [58]–[60]. $\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheiden sich von anderen T-Zellen durch ihren Rezeptor, der aus einer γ - und einer δ -Kette besteht im Gegensatz zu CD4 und CD8 positiven T-Zellen, deren Rezeptor aus einer α - und einer β -Kette bestehen [61]. Über diesen Rezeptor sind $\gamma\delta$ -Rezeptoren fähig unterschiedliche Antigene, Peptide, unprozessierte Proteine und Phospholipide zu erkennen ohne eine zusätzliche Präsentation dieser über ein MHC Molekül [62], [63]. Durch die MHC-unabhängige Erkennung von Antigenen und anderen TAAs rückten die $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihr Potential in der Immuntherapie in den Fokus der präklinischen und klinischen Forschung. $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen neben dem $\gamma\delta$ -Rezeptor einen NKG2D Rezeptor, der auch auf natürlichen Killerzellen vorhanden ist und der Zelle die Fähigkeit verleiht eine zytotoxische Reaktion, nach Bindung an Tumorzellen, durchzuführen und diese damit zu eliminieren [63]–[65]. Diese zytotoxische Reaktion gegenüber Tumorzellen kann bei soliden als auch bei hämatologischen Neoplasien beobachtet werden [63]–[65]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einer Freisetzung von TNF- α , INF- γ und IL-17 führt und damit zu einer Aktivierung anderer T-Zellen im *Tumormicroenvironment* führen kann, indem die $\gamma\delta$ -

T-Zellen als APC fungieren [66], [67]. Zusätzlich konnte in einer Studie belegt werden, dass die Infiltration von $\gamma\delta$ -T-Zellen in soliden Tumoren, der positivste prognostische Marker für die Patienten darstellt [68]. Eine Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen kann sowohl in vitro als auch in vivo ermöglicht werden.

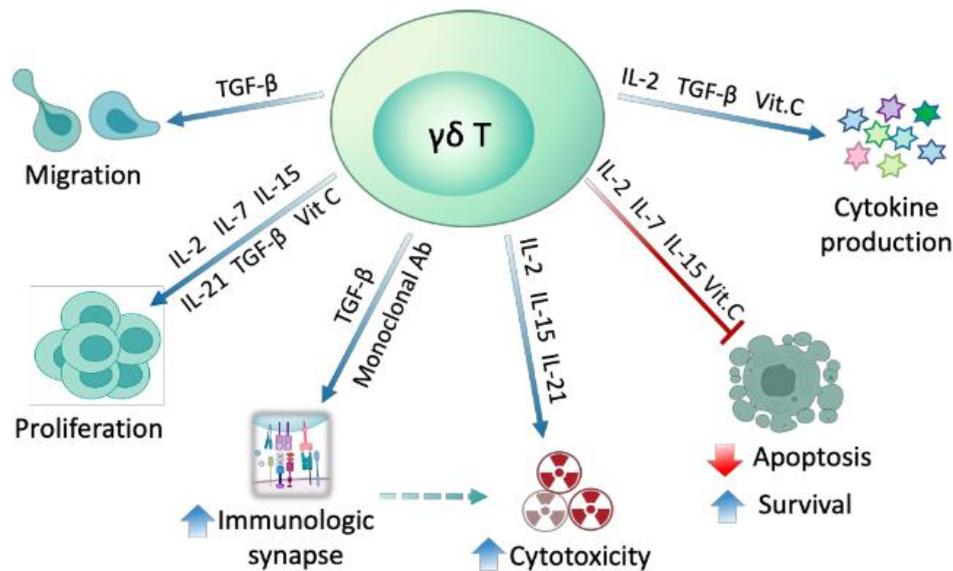


Abbildung 3: Schematische Darstellung zu Modulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen und deren Effekte auf Tumorzellen

Gezeigt sind hier die vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten von $\gamma\delta$ -T-Zellen in Anwesenheit von diversen Zytokinen. Durch die Anwesenheit von IL-2, IL-7 und IL-15 wird eine Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen vollzogen. Durch eine Stimulation mit TGF-beta und der Anwesenheit von monoklonalen Antikörpern kann eine immunologische Synapse geformt werden und dadurch eine direkte zytotoxische Reaktion ermöglicht werden. (verändert nach Yazdanifar et al. 2020 [43])

2.2.6. Gezielter Einsatz von TLR-Agonisten mit antitumoralem Potential

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zur Familie der *pattern-recognition-receptor* (PRR) und sind auf diversen Immunzellen aber auch auf Epithelien und Tumorzellen zu finden und gehören zum angeboren Immunsystem, da sie Pathogene über *danger-associated-molecular-patterns* (DAMPs) und *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs) erkennen können [69], [70]. Die TLRs befinden sich in der Zellmembran oder in endosomalen intrazellulären Membranen, wobei letztere Nukleinsäure erkennen und extrazelluläre TLRs Proteine erkennen [71]. DAMPs sind körpereigene Liganden, die bei Zelluntergang oder Zellzerstörung freigesetzt werden und deren verstärkte Freisetzung häufig mit Autoimmunkrankheiten oder Tumorzellen assoziiert werden kann [72]. Werden DAMPs oder PAMPs durch TLRs erkannt, wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zu einer Sekretion von Chemokinen und Zytokinen und damit zu einer Aktivierung

des angeborenen und des erworbenen Immunsystems führt [73]. Neben ihrer Aufgabe Immunzellen zu aktivieren und zu Reifung anzuregen, spielen TLR auch bei der Tumorgenese eine Rolle [74]–[79]. Durch eine Aktivierung im Zusammenhang mit Tumorzellen kann das Wachstum, die Metabolisierung und die Verstreuung beeinflusst werden [69], [80], [81]. In mehreren Studien wurden die Expressionen von TLRs auf Tumorzellen untersucht und in Korrelation mit deren Wirkung auf das Wachstum der Tumorzellen gesetzt [75], [76], [78], [79].

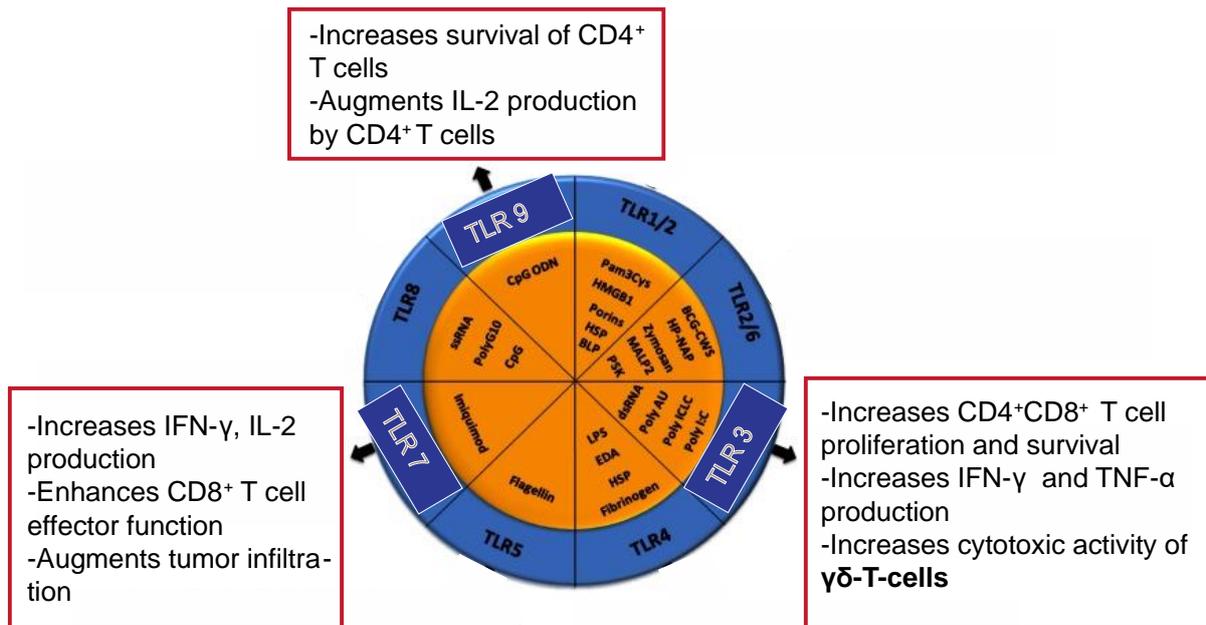


Abbildung 4 Übersicht zu den Immunmodulatorischen Effekten der TLR-Agonisten 3, 7, 9

In der Abbildung sind TLR und deren Agonisten gezeigt. Imiquimod ist beispielsweise ein Agonist von TLR 7 und führt zu einer vermehrten Freisetzung von IL-2 und verstärkt somit die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen. Über eine Aktivierung von TLR 3 durch Poly I:C ist auch eine verstärkte zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu verzeichnen. (verändert nach Kaskanoswka et al. 2013 [82])

So konnte gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung von TLR 2,4,7/8 mit deren Agonisten einem Progress der Tumorzellen zu verzeichnen ist, während eine Aktivierung von TLR-3,7/8,9 mit deren Agonisten zu einer Tumorzellwachstumshemmung führt durch Aktivierung diverser Mechanismen [69], [83]–[86]. Dazu zählen die Anregung einer T-Zell Immunantwort, Überwindung der PD-L1 Inhibition, Unterdrückung von Metastasierung und einer Induktion von Apoptosen [87]. Durch die Aktivierung kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , INF- γ und IL-2/10 aus den Immunzellen und damit zur verstärkten Proliferation und Infiltration von T-Zellen in das Tumorumfeld [88], [89]. Es wird daher davon ausgegangen, dass TLR-

Agonisten zukünftig einen Platz im Repertoire der Immuntherapie, um dort sowohl einen direkt Effekt auf die Tumorzellen erzielen können als auch einen Effekt auf die Aktivität der Immunzellen durch deren Stimulation [89], [90]. Um den genauen Wirkmechanismus aller TLR-Agonisten lückenlos aufklären zu können und damit das Ansprechen der unterschiedlichen Tumoridentitäten besser vorhersagen zu können, sind weiter präklinische Studien nötig. Ein TLR-Agonist wurde jedoch schon erfolgreich in der Klinik etabliert. Imiquimod ist ein TLR-7 Agonist, der in der Dermatologie bei Basalzellkarzinomen lokale Anwendung findet [91], [92].

2.3 Prognostischer Effekt von Tumor infiltrierende Immunzellen in soliden Tumoren

Um den Wirkungsmechanismus der verschiedenen Immuntherapien nachvollziehen zu können, ist die Untersuchung der Tumore und des Tumorenvironments auf verschiedene Immunzellen ein wichtiger Ansatzpunkt. Vor mehreren Jahrzehnten kam erstmals die Vermutung auf, dass eine Immuninfiltration ein guter prognostischer Parameter für das klinische Outcome von Tumorpatienten darstellen könnte [93]. In diversen, neueren Studien konnte diese Vermutung bestätigt werden. Diese Studien beziehen sich auf Melanome, Brustkrebs, Hals-und-Nackenkrebs, Blasenkrebs und Lungenkrebs. Für Kolonkarzinome existiert bereits ein Immunscore, der durch eine Quantifizierung von CD3+ und CD8+ T-Zellen definiert wird und dazu dient, das Risiko für ein Auftreten von Rezidiven zu bestimmen [94]. Auch hier ist eine hohe Infiltration dieser T-Zellen mit einem niedrigeren Auftreten von Rezidiven und Metastasen assoziiert [94]. Für Melanome konnte Identisches in den letzten Jahren erforscht werden [95]. Eine erhöhte Infiltration mit Immunzellen korreliert hier mit einem niedrigeren Risiko für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen und wirkt sich positiv auf das Überleben aus [96], [97]. In einer groß angelegten Studie (Abb. 5) wurden ca.18.000 Tumore aus 39 unterschiedlichen Tumoridentitäten auf infiltrierende Immunzellen untersucht und in Korrelation mit klinischem Outcome, orientiert am *progression free survival* PFS, gesetzt [68]. Es konnte gezeigt werden, dass bei den untersuchten soliden Tumoren die Anwesenheit von $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD8+ T-Zellen, natürlichen Killerzellen und CD4+ T-Zellen zu den stärksten, positiven prognostischen Faktoren für das klinische Outcome zählen (Abb. 5) [68]. Aber nicht nur Zellen des erworbenen Immunsystems spielen bei Betrachtung der Infiltrationen eine Rolle, sondern auch Zellen des angeborenen Immunsystems [98]. Die Infiltration von NK-Zellen in Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen zeigte auch eine Korrelation mit einem niedrigeren Auftreten von Metastasen und Progress der Erkrankungen [99]. Neben der generellen Anwesenheit von infiltrierenden Immunzellen spielt auch deren Organisation innerhalb des Tumorgewebes und der Lymphknoten eine Rolle. So konnte

gezeigt werden, dass NK-Zellen eher im Stroma der Tumore zu finden sind und dort ihre antitumorale Aktivität durchführen, während CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe zu finden sind [100]. Neben der Infiltration an Immunzellen können weitere Marker zur Differenzierung der von Tumorzellen in „hot“ oder „cold“ hinzugezogen werden [100], [101]. Dazu zählt die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und den Tumor-assoziierten Immunzellen im *Tumormicroenvironment* und das Vorliegen von einer bereits stattgefundenen Immunreaktion gegen die Tumorzellen [102]. Tumorzellen, die als „hot“ klassifiziert werden, zeigen bei der Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ein besseres Ansprechen als kalte [102]. Kalte Tumorzellen hingegen zeigen wenig Infiltrationen mit Immunzellen, kaum eine Expression von PD-L1, präsentieren wenig Neoantigene und zeigen einen Verlust an MHC-Molekülen [101], [102]. All diese Eigenschaften erschweren die Durchführung einer erfolgreichen Immuntherapie bei diesen Tumorzellen und es werden aktuell viele präklinische Studien durchgeführt, in denen durch geschickte Kombination von Immuncheckpoint mit anderen Immuntherapien, Chemotherapie oder Bestrahlung eine Transformation dieser kalten Tumorzellen in „hot“ erfolgen kann und damit ein besseres Ansprechen erzielt wird [103], [104].

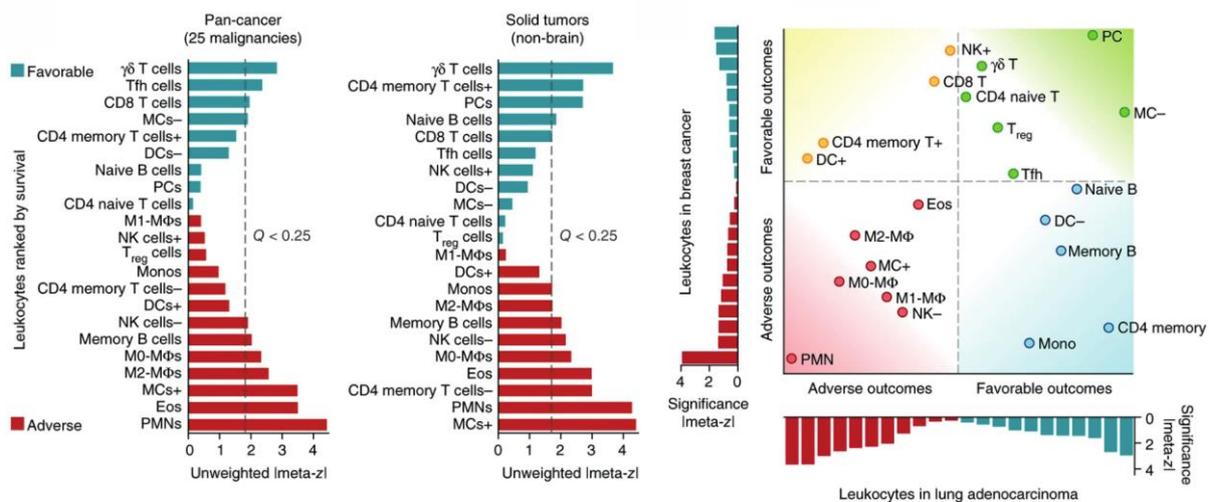


Abbildung 5 Prognostische Effekte von diversen Immunzellsubtypen in soliden Tumoren auf deren klinisches Outcome

Dargestellt sind die prognostischen Assoziationen von Immunzellinfiltrationen in diversen soliden Tumoren und deren Effekt auf ein besseres Outcome. In den untersuchten Tumoridentitäten zeigten $\gamma\delta$ -T-Zellen den größten Effekt auf ein positives Outcome der Patienten. Neben den $\gamma\delta$ -T-Zellen sind Infiltrationen von anderen T-Zellsubtypen für ein positives Outcome verantwortlich. (verändert nach Gentles et al. 2015 [68])

2.4 Mausmodelle in der Krebsforschung

2.4.1. Humanisiertes Mausmodell

Es sind diverse Mausmodelle vorhanden, die für die Krebsforschung unerlässlich sind und stetig weiterentwickelt werden. Mäuse als Versuchstiere sind durch ihren kurzen Lebenszyklus, niedrige Kosten, komplett identifizierbares Genom und die Möglichkeit der genetischen Modifikationen die wichtigsten präklinischen Testobjekte [105], [106]. Das menschliche und das murine Immunsystem weisen jedoch große Diskrepanzen in ihrem angeborenen und adaptiven Immunsystem auf und zeigen somit Unterschiede in ihren Phänotypen und in den Funktionalitäten der jeweiligen Immunzellen [107], [108]. In Studien konnten 60 Unterschiede zwischen dem menschlichen und murinen Immunsystem identifiziert werden [108]. Hierzu zählen beispielsweise die Expressionen unterschiedlicher Toll like Rezeptoren und die unterschiedliche Sensitivität gegenüber einem *cytokine storm* (tödliche Dosis Mäuse: 5-25 mg/kg; bei Menschen: 30 ng/kg) [108], [109]. Diese Eigenschaften erschweren daher eine Übertragung auf das humane Immunsystem bei der Anwendung von reinen syngenen murinen Modellen im Feld der Immuntherapien und führten zu enttäuschenden Ergebnissen bei der Übertragung von erfolgreich getesteten Therapien in murinen Mausmodell auf klinische Studien im Menschen [110].

Für das Verständnis der Interaktionen zwischen Tumorentstehung und Immunantwort im Bereich der Immuntherapie ist die Entwicklung von humanisierten Mausmodellen, in denen diese Interaktion untersucht werden kann, von großer Bedeutung [105], [106]. In präklinischen Studien sollen mit Hilfe dieser Modelle neue Therapiestrategien entwickelt werden und setzen dabei eine möglichst authentische Imitation des menschlichen Immunsystems voraus [105], [106]. Ein funktionierendes humanisiertes Mausmodell sollte nach der Humanisierung ein funktionierendes Immunsystem besitzen, welches sich durch adaptive Fähigkeiten konstant weiterentwickeln kann bei Kontakt mit entwickeln kann [111]. Der am häufigsten verwendete Stamm für das humanisierte Mausmodell sind die NSG Mäuse [106]. Die NOD scid gamma- (NSG) Mäuse besitzen eine *loss-of-function* Mutation im *Prkdc^{scid}* Gen und eine Null-Mutation im *I2rg^{tm1Wjl}*-Gen [106], [111]. In Folge ist sowohl die VDJ-Gen Rekombination und das IL-2-Signaling nicht mehr funktionsfähig, was zu einem kombinierten Verlust der adaptiven und innatens Immunantwort führt [105], [111]. Werden diesen Mäusen PBMC's injiziert, findet ein *Engraftment* statt und innerhalb weniger Tage können die humanen Immunzellen im Kreislauf der Mäuse nachgewiesen werden [112]. Die rasche Expansion der T-Zellen kann nach kurzer Zeit zu einem *graft-versus-host-disease* (GvHD) führen und damit den Versuchszeitraum einschränken [105]. Durch eine Humanisierung immundefizienter Mäuse mit CD34+ humanen

Stammzellen kann diese Einschränkung umgangen werden, jedoch ist hier das Engraftment der Immunzellen erst nach einem Monat zu erwarten [113].

2.4.2. Patient-Derived-Xenograft Mausmodell

Humane Xenograft Modelle bestehen aus Tumorfragmenten, die immundefizienten Mäusen transplantiert werden, wobei die Zellen und Tumorfragmente aus Patiententumoren gewonnen werden [113]. Mit diesen Tumorfragmenten ist es möglich die Komplexität humaner Tumore und deren Entstehung sowie die genetische Heterogenität, Tumorarchitektur und das *Tumormicroenvironment* in einem präklinischen Mausmodell zu untersuchen [114]. PDX-Modelle sind aktuell zentraler Bestandteil der präklinischen Erforschung von neuen Therapiekonzepten in der CAR-T-Zelltherapie und deren Evaluation bei hämatologischen und soliden Krebserkrankungen [115], [116]. Auch für dieses Modell eignen sich die NSG-Mäuse am besten, da in ihnen humane Tumorfragmente anwachsen, im Gegensatz zu anderen immundefizienten Stämmen [117]. Um nun das Immunsystem in diesem Modell zu rekapitulieren, um die Effektivität der Immuntherapie evaluieren zu können, kann eine Humanisierung mit PBMC's oder CD34+ Stammzellen erfolgen [105], [115]. Idealerweise entstammen diese Immunzellen dem Patienten, aus dem das primäre Tumorfragment entnommen wurde. Heutzutage ist das PDX Modell mit einem aus CD34+ Stammzellen induzierten Immunsystem das aussagekräftigste Modell zur Evaluierung von Checkpoint-Inhibitoren [118].

2.4.3. Syngene Mausmodelle

Syngene Mausmodelle sind die ältesten und meist benutzten Modelle zur Erforschung präklinischer onkologischer Therapieansätze [111]. Der hier am häufigsten verwendete Stamm ist der C57BL/6 Stamm [111]. Durch eine Adenovirus-Cre-Virus Inhalation, kann in diesen Mäusen eine Mutation im Onkogen K-ras und im Tumorsuppressorgen p53 zu einem autochthonen Tumorwachstum in der Lunge kommen. *Ex vivo* können aus diesen Tumoren nun Zelllinien kultiviert und benutzt werden, um Wildtyp Mäuse desselben Stamms mit den Tumorzellen zu inokulieren. Da die Mäuse in diesem Modell immunkompetent sind, eignet sich dieses Modell insbesondere für die Bewertung von Immuntherapien, bei denen die frühe Immunantwort auf einen neu entstandenen Tumor von Bedeutung ist.

2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

In der Immuntherapie stehen die T-Lymphozyten mit ihrer Fähigkeit Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren im Vordergrund. Die Aufhebung inhibitorischer Signale an den *immune-checkpoints* durch Antikörper zeigten in klinische Studien bereits Erfolge in der Therapie solider Tumore und wurden klinisch in den Leitlinien zur Behandlung des Melanoms und NSCLC etabliert. Jedoch zeigte sich auch, dass ein Großteil der Patienten noch nicht von diesen Therapien profitiert. Durch Resistenzen und das nicht ubiquitäre Vorkommen immunsuppressiver Liganden auf Tumorzellen, ist es von großer Bedeutung neue Therapiekombinationen in der Immuntherapie zu finden, die einen synergistischen antitumoralen Effekt der T-Lymphozyten und der natürlichen Killerzellen erzielen können, um die Ansprechraten auf Immuntherapien zu erhöhen.

In dieser Arbeit wurden mehrere Forschungsziele verfolgt. Durch gezielte Kombinationen einer adoptiven Immuntherapie bestehend aus LAKs, CIKs, gd-T-Zellen und CTLs mit einer aPD1 Checkpoint Inhibition sowie einer lokalen TLR-Agonisten Therapie soll das Ansprechen dieser kombinierten Therapien in unterschiedlichen Mausmodellen an soliden Tumoren getestet werden. Hierfür wurden 2 etablierte Mausmodelle verwendet. Zum einen ein syngenes murines Mausmodell und ein humanisiertes Mausmodell. Neben diesen beiden wurde im Zuge dieser Arbeit ein PDX Mausmodell etabliert und dieses auf dessen Übertragbarkeit für präklinische Testung der Immuntherapien diskutiert.

Das Ansprechen der soliden Tumore auf die Therapiekombinationen soll neben den Größenänderungen weiterführend durch die infiltrierenden Immunzellen in den Tumoren evaluiert werden, um hier gezielte Infiltrationsmuster zu identifizieren, die mit einem Therapieansprechen korrelieren.

In dieser Arbeit erfolgt eine kritische Diskussion über eine mögliche Translation der in dem humanisierten und dem PDX Modell erzielten Ergebnisse in die klinische Forschung.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1. Geräte

Tabelle 1 listet die verwendeten Geräte und deren Hersteller auf

Tabelle 1: Hersteller der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
LabVision Autostainer-480S	Thermo Scientific
Victor Nivo Multimode Microplate Reader	PerkinElmer
Schublehre	
Leica Bond Max system	Leica microsystems
Secondary-Histofine-Simple-Stain (SHSS) antibody detection kit	Medac
Panoramic-250 slide scanner	3D Histech
SCN400 slide scanner	Leica
Aperol ImageScope	Leica
Cytoflex LX Flow Cytometer	Beckman Coulter
VICTOR Nivo multimode plate reader	Perkin Elmer

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 listet die verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller auf

Tabelle 2: Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Microvette 500-Z mit Serum-Gel	Sarstedt AG & Co.
ACK lysis buffer	Life Technologies
40 µm Cell Strainer	BD Falcon
cryo vials	Sarstedt
Eppendorfreaktionsgefäße (Eppi [®] -Tube)	Eppendorf AG
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co.
Gewebekulturschalen (550 ml)	Greiner Bio-one GmbH
Petrishalen (10 cm)	Greiner Bio-one GmbH
SafeSeal Tips professional (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH
Sterilpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Life Science
Well-Platten (6er, 12er, 24er)	Greiner Bio-one GmbH

Zell-Zählkammer (0,00025 mm ³)	Neubauer
Zellschaber	Sarstedt AG & Co
Leucosept-Röhrchen 50 ml	Greiner
Cellstar® Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one GmbH

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3: listet die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller auf

Tabelle 3: Bezugsquellen der Chemikalien

Produkt	Hersteller
FBS (fetal bovine serum)	Gibco®
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PBS	Gibco by <i>life</i> technologies
DMEM medium	Gibco®
RPMI medium	Gibco®
penicillin and streptomycin (10.000 U/ml)	Lonza
0.25 % Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco®
Histopaque®	Sigma Aldrich Chemie GmbH
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
β-2-Mercapthoethanol	Roth
zoledronic acid	HEXAL
Mitomycin C	Medac
Luciferin	Regis Biotechnology
Trypanblau	Gibco®

3.1.4. Antikörper und Zytokine

Tabelle 4: listet die verwendeten humanen, murinen Antikörper und Zytokine und deren Hersteller auf

Tabelle 4: Bezugsquellen der Antikörper und Zytokine

Produkt	Hersteller
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD 45 [30-F11]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti FOX-P3 [150D]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti IFN-γ [XMG1.2]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD3ε [145-2C11]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti PD-1 [29.F.1A12]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti NK-1.1 [PK136]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti TCR γ/δ [GL3]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD8a [53-6.7]	BioLegend

Monoklonaler <i>mouse</i> anti Ki-67 [16A8]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD4 [GK1.5]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD 69 [H1.2F3]	BD
Zombi UV Fixable Viability Kit	BioLegend
Monoklonaler human anti CD56 [HCD56]	BioLegend
Monoklonaler human anti FOXP3 [150D]	BioLegend
Monoklonaler human anti IFN- γ [B27]	Miltenyi Biotech
Monoklonaler human anti TCR γ/δ [B1]	BioLegend
Monoklonaler human anti CD4 [RPA-T4]	BioLegend
Monoklonaler human anti CD 8 [SK1]	BioLegend
Monoklonaler human anti CD 69 [FN50]	BioLegend
Monoklonaler <i>human</i> anti CD 16 [3G8]	BioLegend
Monoklonaler human anti PD-1 [EH12.2H7]	BioLegend
Monoklonaler human anti CD45 [HI30]	BioLegend
Monoklonaler human anti CD3 [UCHT1]	BD
Monoklonaler human anti CD28 [CD28.2]	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> anti- $\gamma\delta$ TCR [clone UC7-13D5]	BioLegend
Nivolumab	Bristol-Myers-Squibb, New York, NY
Poly I:C	Millipore
Gardiquimod	Cayman Chemical, Ann Arbor
ODN-2395 (2395 (5'- tcgtcgtttcggcgcgccg-3' phosphorothioate bonds)	IDT with
Recombinant <i>human</i> Interleukin (IL)-2	Aldesleukin
Recombinant <i>Mouse</i> Interleukin-2	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> $\alpha\gamma\delta$ -TCR	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> α CD3	BioLegend
<i>Mouse</i> INF- γ	BioLegend
<i>Mouse</i> Interleukin 7	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> α CD28	BioLegend
Monoklonaler <i>mouse</i> α PD1, clone RMP1-14,	BioXCell, Lebanon
<i>Mouse</i> Interleukin 4	BioLegend
<i>Mouse</i> GM-CSF	BioLegend
<i>Mouse</i> TNF α	BioLegend
Isotype control rat IgG2a, κ	BioXCell

human IgG	Octagam
Recombinant <i>human</i> IL-7	Miltenyi Biotech
Recombinant <i>mouse</i> IFN γ	Miltenyi Biotech
Monoklonaler <i>mouse</i> anti CD28 [37.51]	BioLegend

3.1.5. Zelllinien

Murine Zelllinien

Tabelle 5 listet die verwendeten murinen Tumorzelllinien und deren Ursprungsgewebe auf

Tabelle 5: Murine Zelllinien und deren Ursprungsgewebe

Zelllinie	Ursprungsgewebe
KP938.3	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, etabliert von der AG Reinhardt (Uniklinik Köln) mit Kras und p53 Mutation

Humane Zelllinien

Tabelle 6 listet die verwendeten humanen Zelllinien und deren Ursprungsgewebe auf

Tabelle 6: Humane Zelllinien und deren Ursprungsgewebe

Zelllinie	Ursprungsgewebe
H1975	Nicht-kleinzelliges-Bronchialkarzinom mit T790- EGFR-Mutation (bezogen von ATCC Manassas, VA)
H441	Nicht-kleinzelliges-Bronchialkarzinom mit K-ras Mutation (bezogen von ATCC Manassas, VA)
JimT1	Karzinom der Mamma mit FGFR1-Amplifikation (bezogen von DSMZ Leipzig)

3.1.6. Medien und Puffer

Tabelle 7 listet die verwendeten Medien und Puffer und deren Zusammensetzung auf

Tabelle 7: Verwendete Medien und Puffer und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI-Nährmedium	RPMI 10 % (v/v) FBS 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin
DMEM/F12- Nährmedium	DMEM/F-12 10 % (v/v) FBS 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin
Mischmedium	RPMI+DMEM/F-12 1:1 10 % (v/v) FBS 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin
huEM (humanes Effektorzellmedium)	RPMI+DMEM/F-12 1:1 4 % (v/v) autologes Plasma 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin
MuEM (murines Effektormedium)	RPMI+DMEM/F-12 1:1 10 % (v/v) FBS 10.000 U/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-2-Mercapthoethanol
Freezing-Medium	90 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO
FACS-Fixierungs-Lösung	1 % (v/v) Formalin in PBS
Permeabilisierungs-Lösung	0,1 % (v/v) Triton in PBS
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS 5 mM EDTA in PBS

3.1.7. Primärgewebe

Patientengewebe

In Kooperation mit der Thoraxchirurgie wurden Gewebeproben von Patienten bereitgestellt, die bei Operationen entnommen wurden. Die Aufklärung der Patienten erfolgte über das BIOMASOTA Protokoll und die Patienten willigten im Rahmen dieser Aufklärung ein, dass ihr Primärmaterial für die Forschung benutzt werden darf.

3.2 Methoden

3.2.1. Methoden der Zellkulturen

Kultivieren der Zellkulturen

Arbeiten mit Zelllinien, PBMC's und Effektorzellen wurden stets unter sterilen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen bzw. Gewebekulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ sowie unter gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde für alle murinen Zelllinien das RPMI-Nährmedium verwendet. Für alle humanen und primären Zelllinien das Mischmedium. Für die Kultivierung der Effektorzellen wurde das jeweilige humane Effektorzellmedium oder das murine Effektorzellmedium verwendet.

Passagieren der Zelllinien

Ab einer Konfluenz des Zellrasens von 60 - 80% wurden die kultivierten Zelllinien passagiert. Das Nährmedium wurde mit sterilen Pipetten abgesaugt und die Zellen einmal mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Adhärenente Zellen wurden mit 2 ml Trypsin versetzt und unter Inkubation im Brutschrank vom Boden der Gewebekulturflaschen bzw. Gewebekulturschalen gelöst. Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit 8 ml Nährmedium in sterilen Pipetten aufgenommen und in 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde bei 400 *relative centrifugal force* (rcf) und 25°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Zum Erhalt der Zellkultur wurden die Zellen entsprechend eines Verhältnisses von 1:10 im jeweiligen Nährmedium in Gewebekulturschalen bzw. Gewebekulturflaschen ausgesät.

Suspensionszellen wurden aus den Gewebekulturflaschen in ein Falcon überführt und bei 400 rcf zentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen Pipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 ml entnommen und in eine neue Gewebekulturflasche überführt und mit Nährmedium aufgefüllt.

Für Versuchsdurchführungen wurden die Zellen nach dem Waschvorgang in der Zellsuspension gezählt. Dazu wurden 20 µl der Suspension entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für eine 1:4 Verdünnung wurden 60 µl Trypanblau zu den 20 µl Zellsuspension hinzugegeben und suspendiert.

Die Suspension wurde in eine Neubauer Zählkammer überführt und die Zellzahl pro Milliliter mittels Auszählung der 4 großen Quadranten und Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ ermittelt. Die benötigte Zellzahl für die Injektion von Tumorzellen in Mäuse, die Co-Stimulationsversuche und die Induktion der Effektorzellen wurde aus der Zellsuspension entnommen.

3.2.2. Isolation und Aufreinigung der humanen peripheren Blut-Monozyten

Für die in dieser Arbeit untersuchten Modelle wurde Spenderblut in Form von *buffy coats* aus der Transfusionsmedizin benutzt und EDTA-Blut von Patienten aus der Thoraxchirurgie. Die *buffy coats* wurden in der Transfusionsmedizin aus antikoaguliertem Spenderblut durch eine Inline-Filtration hergestellt. Diese Filtration dient der Abtrennung der Leukozyten und Thrombozyten von den Erythrozyten und dem flüssigen Blutplasma. Bei der hier angewandten Aufreinigung handelt es sich um eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der durch die Kraft der Zentrifugation das Zellmaterial durch eine Schicht aus Polysacchariden mit sehr hoher Dichte getrieben wird und es daher zu einer kompletten Auftrennung der Lymphozyten, Erythrozyten und Plasma kommt.

Alle Reagenzien wurden vor Beginn der Isolation auf Raumtemperatur eingestellt (22-24°C). Die von der Transfusionsmedizin bereitgestellten *buffy coats* wurden in 50 mL Falcons überführt und bei 400 *rcf* und 19°C für 10 min zentrifugiert (*acceleration=1*, *brake=1*). Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und in ein neues Falcon überführt und für eine weitere Verarbeitung vereinigt. Das entnommene Plasmavolumen aus Falcon I wird mit PBS ersetzt.

Für die Gradientenauftrennung wurden *Leucosep-Tubes* mit 15 ml *Histopaque* befüllt und bei 800 *rcf* bei 15°C 1 min zentrifugiert, sodass sich die Flüssigkeit nach der Zentrifugation unterhalb der Abtrennung im Leucosep-Tube befindet.

Jeweils 15 ml der Blutsuspension aus Falcon I wurde in ein *Leucosep-Tubes* überführt und bei 900 *rcf* bei 15°C 15 min zentrifugiert (*brake=1*, *acceleration=1*).

Das Layer mit den PBMC's wurde vorsichtig aus dem *Leucosep-Tube* mit einer sterilen Pipette entnommen und in ein mit 15 mL PBS vorgefülltes Falcon überführt und auf 45 mL mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und bei 400 *rcf* bei 4°C 10 min zentrifugiert. Nach dem ersten Waschgang wurden die Zellen vereinigt. Danach wurden die Zellen gezählt mit der Methode nach Neubauers Kammer. Für die direkte Weiterverarbeitung wurden die PBMC's in eine Gewebskulturflasche überführt und mit Mischmedium für humane Zelllinien aufgefüllt. Für eine spätere Verwendung wurden die PBMC's in ein *freezing medium* in *cryovials* überführt und in einem *stratacooler* bei -80°C aufbewahrt, bevor sie am nächsten Tag in den -150°C Stickstoff überführt wurden. Es wurden $4 \cdot 10^7$ Zellen pro Aliquot in maximal 1,5ml eingefroren.

3.2.3. Induktion der humanen Effektorzellen für die adoptive Zelltherapie

Allgemeines

Die humanen Effektorzellen wurden aus den PBMC's der Spender bzw. der Patienten hergestellt. Am Tag der Isolation der PBMC's aus den *buffy coats* bzw. dem EDTA Blut der Patienten wurden die PBMC's zur Produktion der vier verschiedenen Effektorzellen direkt weiterverwendet.

Das Medium für die Kultivierung der Effektorzellen wurde für jeden Spender bzw. Patienten neu hergestellt. Dazu wurde das autologe Plasma bei der Herstellung der PBMC's aufbewahrt. Es wurde eine sterile Mischung aus 1:1 RPMI und DMEM/F12 Medium hergestellt, welche mit 4% (v/v) autologem Plasma und 10.000U/ml Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Das fertige humane Effektormedium huEm wurde bei 4°C verschlossen gelagert.

Die Zellen wurden während Ihrer Proliferation und Expansion über die 15 Tage alle bei 37°C und 5% CO₂ sowie unter gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Je nach Konfluenz wurde huEM bei allen Effektorzellen stets hinzugegeben und kein Medium ausgetauscht, da es sich bei allen Subtypen (Ausnahme: dendritische Zellen, s.u) um Suspensionszellen handelte. Die Zytokine wurden entsprechend der Protokolle auf die neuen hinzugegebenen Angaben an huEM ergänzt.

Die Ernte der Zellen am 8. bzw 15. Tag erfolgte immer analog. Die Zellen wurden in ein großes Falcon überführt und bei 400 *rcf* für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und erneut bei gleichen Angaben zentrifugiert. Je nach vorheriger Expansion und damit verbundener Aufteilung auf mehrere Zellkulturflaschen, wurden die Zellpellets nach dem 1. Waschvorgang gepoolt. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Zellen gezählt mittels Neubauer Zählkammer und danach für die entsprechenden Versuche verwendet oder in *freezing medium* in *cryovials* eingefroren. Beim Einfrieren wurden die Zellen zuerst in einem *stratacooler* bei 80°C für 24 Stunden eingefroren und dann in -150°C Stickstoff überführt.

Lymphokine-activated-killer cells (LAK's)

Es wurden am ersten Tag $2,5 \cdot 10^7$ PBMC's abgezählt und von der Zellsuspension mittels einer sterilen Pipette in eine große Zellkulturflasche überführt. 10 ml humanes Effektorzellmedium wurde hinzugegeben und 1000 IE/ml Interleukin-2 (IL-2) und die Zellen inkubiert. Das Medium und IL-2 wurde je nach Konfluenz in den folgenden Tagen aufgefüllt. Ab Tag 8 konnten die LAKs für weitere Versuche geerntet werden.

$\gamma\delta$ -T-Zellen

Es wurden am ersten Tag $2,5 \cdot 10^7$ PBMC's abgezählt und von der Zellsuspension in eine große Zellkulturflasche, in welcher 10 ml huEM vorliegt war, überführt. Es wurde 1000 IE/ml IL-2 und

1 µmol/ml Zoledronsäure hinzugegeben und die Zellen wurden inkubiert. Die Zellen proliferierten über 14 Tage. Es wurde je nach Verbrauch mit huEM und IL-2 aufgefüllt. Ab dem 15. Versuchstag wurden die Zellen geerntet und für die Versuche verwendet.

Cytocine induced killer cells (CIK's) und dendritische Zellen

Es wurden am ersten Tag $2,5 \cdot 10^7$ PBMC's abgezählt und in eine kleine Zellkulturflasche überfüllt, in der 5 ml huEM vorgelegt war, und für 2 Stunden inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Suspensionzellen entnommen und in eine große Zellkulturflasche überführt, mit huEM aufgefüllt und mit 1000 IE/ml hu-IFN- γ versetzt. Zu den adhärennten Zellen wurde huEM hinzugegeben und 800 IE/ml GM-CSF und 500 IE/ml IL-4. Am darauffolgenden Tag wurden zu den Suspensionzellen 300 IE/ml IL-2 und 50 ng/ml Anti-CD-3-Antikörper hinzugegeben. Am 3. Tag wurden die Suspensionzellen mit huEM versorgt und 300 IE/ml IL-2. Zu den adhärennten Zellen wurde huEM hinzugegeben sowie 800 IE/ml GM-CSF und 500 IE/ml IL-4. Es wurden Zelllysate aus den humanen Zelllinien (H1975, H441, JimT1 und primären Tumorzelllinien der Patienten) gewonnen und $1 \cdot 10^7$ Lysat Zellen zu den adhärennten hinzugefügt. Die Zellen wurden zur Proliferation weiter inkubiert und mit huEM und jeweiligen Zytokinen versorgt. Am 5. Tag wurde den adhärennten Zellen zusätzlich 100 IE/ml TNF- α beigefügt. Am 7. Tag konnten die adhärennten Zellen geerntet werden und in freezing Medium eingefroren werden. Sie wurden als dendritische Zellen bezeichnet und jeweils spezifisch für alle humanen Zelllinien separat angesetzt. Die Suspensionzellen wurden weiterhin mit huEM und 300 IE/ml IL-2 versorgt und am 15. Tag geerntet.

Cytotoxic-t-lymphocytes (CTL's)

Am Tag vor dem Ansatz der Effektorzellen wurden je $1,25 \cdot 10^6$ Tumorzellen der humanen Zelllinien abgezählt und in eine separate Zellkulturflasche mit FCS freiem Medium überführt. Es wurde 50 µg/ml Mitomycin und 1000 IE/ml hu-IFN- γ den Tumorzellen hinzugegeben und dann für 24 Stunden inkubiert. Außerdem wurden, entsprechend der Anzahl an unterschiedlichen Tumorzellansätzen, große Zellkulturflaschen (T75) mit 5 µg/ml aCD28 in 3 ml PBS gecoatet. Am nächsten Tag wurden die Tumorzellen aus den Zellkulturflaschen entnommen und in ein 50 ml Falcon überführt und mit 25 ml PBS suspendiert und bei 400 rcf für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt, um das Mitomycin zu entfernen. Die gecoateten Zellkulturflaschen wurden 4-mal mit 10 ml PBS gespült und nach dem finalen Waschvorgang wurden jeweils $2,5 \cdot 10^7$ PBMC's in die Flaschen gegeben und mit huEM aufgefüllt. Die gewaschenen Tumorzellen wurden ebenfalls zu in die Flaschen hinzugegeben. Jede Tumorzelllinie befand sich in einer separaten Flasche. Zu den Zellen wurde nun 150 IE/ml IL-2 Proleukin, 10 ng/ml hu-IL-7 und 20 µg/ml aPD1 hinzugegeben und danach inkubiert.

Die Zellen wurden an den folgenden Tagen zur Proliferation mit huEM und 150 IE/ml IL-2 aufgefüllt.

Am 15. Tag wurden die Zellen geerntet.

3.2.4. Induktion der murinen Effektorzellen für die adoptive Zelltherapie

Die murinen Effektorzellen wurden für die Versuche im autochthonen Mausmodell verwendet mit der KP938.3 Tumorzelllinie verwendet. Um ein autologes Setting in diesen Versuchen zu ermöglichen wurden die Immunzellen dieses Mausstammes isoliert und zur Proliferation und Differenzierung angesetzt.

Vorbereitungen

Für die murinen Effektorzellen wird eine 1:1 Mischung aus RPMI und DMEM/F12 verwendet und mit 10 % (v/v) FCS, 10.000 U/ml Streptomycin/Penicillin und 50 µM β-2-Mercaptoethanol versetzt. Dieses Medium wird im Folgenden als murines Effektorzell-Medium (muEM) bezeichnet. Auch bei der Kultivierung der murinen Effektorzellen erfolgt immer eine Expansion der Zellen. Im 2-3 Tage Rhythmus werden die Zellen mit frischem Medium versorgt und die Zytokine auf die neue Mediummenge angepasst. Zur Isolation von murinen Immunzellen wurde die Milz und das Knochenmark einer C57/Bl6 Maus verwendet. Die Milz wurde durch einen *cell strainer* gegeben und die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, bevor sie mit 1 ml ACK-Lysepuffer versetzt werden und 20 min inkubiert. Das Knochenmark wurde aus den Femurknochen der Mäuse isoliert, in dem die entnommenen Knochenfragmente bei 15.000 rcf 20 sec in einem Epi zentrifugiert wurden. Das Knochenmark wurde ebenfalls durch einen *cell strainer* gegeben mit 1 ml ACK-Lysepuffer inkubiert und danach mehrfach mit PBS gewaschen. Die Splenozyten und die Knochenmarkzellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und jeweils $1 \cdot 10^7$ Splenozyten in 6 T 50 Flaschen gegeben und mit muEM aufgefüllt. Die Knochenmarkzellen werden auf 3-4 T 25 Flaschen verteilt und mit muEM aufgefüllt. Aus den angelegten Flaschen wurden folgende Effektorzellen heraus differenziert.

Lymphokine-activated-killercells (LAK's)

Eine der angelegten Splenozyten-Flaschen wurde mit 6000 IE/ml murinem Interleukin-2 versetzt. An den folgenden Tagen wurde neues Medium addiert und die IL-2 Konzentration angepasst. Ab dem 8. Tag konnten die Zellen geerntet werden und für Versuche verwendet werden.

γδ-T-Zellen

Eine mittlere Zellkultur-Platte (75mm Durchmesser) wurde am ersten Tag mit 10 µg/ml αγδ-TCR Antikörper in 5 ml PBS versetzt und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Platte 5-mal mit PBS gewaschen und eine der angesetzten Splenozyten-Flaschen auf die Platte

gegeben und mit 100 IE/ml IL-2 versetzt. Am 3.Tag wurde der Inhalt der Platte in eine Zellkulturflasche überführt und mit Medium und IL-2 aufgefüllt. Ab dem 8.Tag konnten die Zellen geerntet werden.

Cytokine-aktivated t-lymphocytes (CIK's)

Es wurde eine mittlere Zellkultur-Platte mit 10 µg/ml murinem αCD-3 Antikörper für 24 Stunden in 5 ml PBS inkubiert. Eine der oben angesetzten Splenozyten-Flaschen wurden mit 1000IE/ml mIFN-γ versetzt und inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platte mit PBS nach 24 Stunden, wurden die Splenozyten auf die transferiert und mit 300 IE/ml IL-2 versetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen von der Platte in eine Flasche überführt und mit muEm und IL-2 versorgt, bevor sie ab dem 8.Tag geerntet wurden.

Cytotoxic t-lymphocytes (CTL's)

Es wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml muEM von den KP938.3 Tumorzellen abgezählt in einer kleinen Zellkulturflasche für 1 Stunde bei 47° C in einen Inkubator gestellt. Nach Abkühlung und mehrmaligem Schütteln der Flasche wurden die toten Tumorzellen entnommen und in eine der oben angesetzten Splenozyten-Flaschen gegeben und mit muEm aufgefüllt. Es wurde 10 IE/ml murines IL-2, 10 ng/ml murines IL-7, 2 µg/ml αCD28 und 20 µg/ml muriner αPD-1 Antikörper hinzugegeben. Die folgenden Tage wurden die Zellen nur mit muEm und 10 IE/ml mL-2 versorgt und wurden am 8.Tag geernet.

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark

Die oben angesetzte kleine Falsche mit Knochenmark Zellen wurde mit 20 ng/ml murinem IL-4 und 20 ng/ml GM-CSF versetzt und die folgenden Tage mit muEm und den beiden Zytokinen versorgt. Am 5 Tage wurden $1 \cdot 10^6$ heat-shocked-tumorzellen zu den dendritischen Zellen hinzugefügt (Verfahren gleich wie bei den CTL's). Am 6. Tage wurden 1000 IE/ml TNF-α hinzugegeben und erneut für 48 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

3.2.5. Viabilitätsmessungen

Es wurden jeweils 2500 Tumorzellen der humanen Zelllinien abgezählt und auf einer 96 well-plate ausgesät. Die verwendeten Tumorzellen besaßen eine Gentransduktion mit dem luc-2 Gen und konnten daher das Enzym Luciferase exprimieren. Zu den Tumorzellen wurden unterschiedliche Kombinationen von den Effektorzellen hinzugegeben. Es handelte sich hier um Effektorzellen von Tag 14. Die wells am Rand der Platten wurden frei gelassen und auf jeder Platte wurden zwei Spalten nur mit Tumorzellen belassen als Referenzwert. Zu den anderen Tumorzellen wurden die Effektorzellen hinzugegeben. Alle wells wurden auf 2 ml mit Mischmedium aufgefüllt und es wurde 200 µg/ml Luciferin in die wells mit Tumorzellen pipettiert. Die Platten wurden anschließend abgedeckt für 72 Stunden in den Inkubator gestellt,

täglich gesichtet und mit Medium aufgefüllt. Nach 72 Stunden wurden die Platten im *Victor Nivo Multimode Microplate Reader* gemessen und die Daten als Excel-Tabelle exportiert. Die Werte der jeweiligen Platte wurde auf den Referenzwert der Platte bezogen.

3.2.6. Durchführung der *In-vivo* Experimente

Versuchstiere

Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Mäusestämme benutzt. Die Mäuse des Stammes NOD-*scid*IL2Rg^{null} und C57/Bl6 wurden bei Jackson Laboratory bestellt und in eigener Zucht vermehrt. Alle Untersuchungen wurden an 6 Wochen alten männlichen und weiblichen Mäusen durchgeführt. Die Mäuse waren einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden und einer Temperatur von 20-22° ausgesetzt. Futter und Wasser erhielten die Mäuse alle ad libidum. Alle Tierversuche wurden nach den FELASA Richtlinien durchgeführt und wurden von der lokalen Ethik Kommission durch Tierversuchsanträge bewilligt. Während die Tiere sich in einem Versuch befanden, wurden sie täglich gesichtet und ihr Zustand anhand von Scores bewertet. Sobald ersichtlich war, dass die Tiere gefährdet, krank oder sonstige in den Scores festgelegten Merkmale aufwiesen, wurden die Versuche beendet. In den durchgeführten Versuchen wurden den Mäusen subkutan in den Flanken Tumorzellen injiziert, die sich nach definierter Zeit zu soliden Tumoren entwickelten. Die Größe der Tumore überschritt nie die Grenze von 2x2cm.

Humanisierung der Mäuse

Für das humane Mausmodell wurden Mäuse des Stammes NOD-*scid*IL2Rg^{null} verwendet. Um bei den Mäusen ein humanes Immunsystem zu simulieren, wurden diese mit aufgereinigten PBMC's von Spendern oder den Patienten humanisiert. Hierfür wurden $1 \cdot 10^7$ PBMC Zellen abgezählt und jeweils einer *NSG-Maus* intraperitoneal (i.p) injiziert. Um die Anreicherung der humanen Immunzellen in den Mäusen nachzuweisen, wurden die Milzen der Mäuse mittels FACS-Analyse und Immunohistochemie auf humane Immunzellen untersucht. Für das *patient derived xenograft* (PDX) Modell wurde aus dem EDTA-Blut der Patienten PBMC's aufgereinigt und ebenfalls den NSG Mäusen i.p injiziert. Hierzu wurden $2,5 \cdot 10^6$ PBMC's verwendet. Die Humanisierung der Mäuse erfolgt stets an Tag 1 der Versuche. Um eine ausgeprägte *graft-versus-host-disease* (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) zu verhindern, wurden die Tiere auf Anzeichen dieser gescort und der Versuch dementsprechend abgebrochen.

Versuchsablauf im humanisierten Mausmodell

Für das humanisierte Mausmodell und für die PDX Modelle wurden die Mäuse des Stammes NOD-*scid*IL2Rg^{null} (NSG) verwendet. Die mindestens 6 Wochen alten Mäuse wurden am

ersten Versuchstag humanisiert durch eine i.p. Injektion mit $1 \cdot 10^7$ PBMC. Hierfür wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin [100 mg/kg *body weight* (BW) i.p./ 0.5 mg/kg BW i.p] narkotisiert und analgisiert. Die Tumorzellen [$5 \cdot 10^6$ Zellen pro Injektionsseite] wurden den Mäusen subkutan in die Flanken injiziert. Ab diesen Zeitpunkt wurden die Mäuse täglich gesichtet und gescort. Ab einer TumorgroÙe von 40-60 mm³ [meistens Tag 10] wurden die Tumore im 3-Tages-Rhythmus mit einer Schublehre gemessen und entsprechend der Therapieschemata der Gruppen therapiert. Am 24 oder 27.Tag (je nach TumorgroÙe) wurde der Versuch beendet und es wurden die Tumore, Milzen und das Serum entnommen. Für das humanisierte Mausmodell wurden die Zelllinien H1975, H441 und JimT1 verwendet. Um aus den GröÙen auf die Volumina der Tumore zu schließen, wurde mit folgender Formel gerechnet.

$$V [mm^3] = \frac{ld [mm]^2 * kd [mm]}{2} \quad \text{ld= Längerer Diameter; kd=kürzerer Diameter}$$

Die Volumina der Tumore wurden in Faltenänderung bei Exel verglichen und mit *Prism* graphisch dargestellt. In Abbildung 6 ist der Versuchsablauf dargestellt.

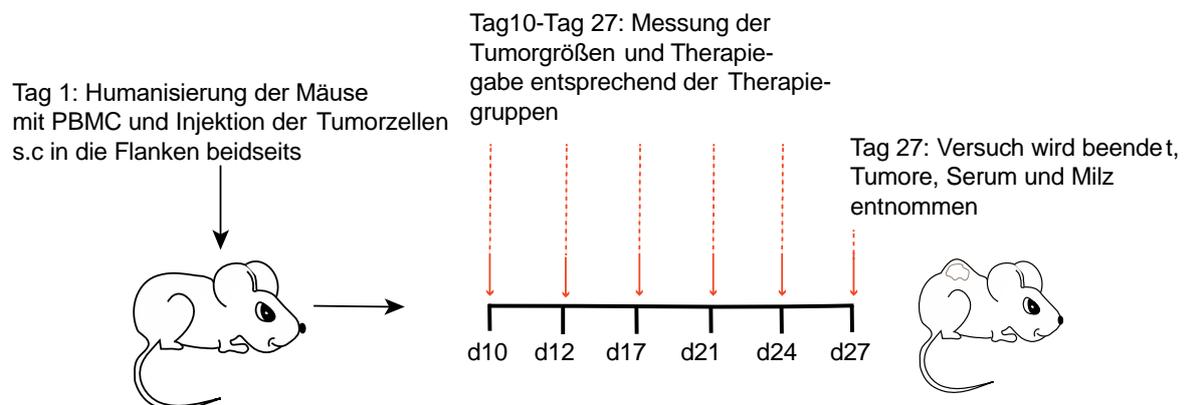


Abbildung 6 Arbeitsablauf und Versuchsdurchführung der *in vivo* Versuche zum Tumorwachstum im humanisierten Mausmodell

Den NSG Mäusen wurden an Tag 0 $1 \cdot 10^7$ PBMC's und $2,5 \cdot 10^6$ der Tumorzellen bilateral, subkutan in die Flanken appliziert. An Tag 10. wurden mit den Therapien begonnen und die Tumore wurden zweimal wöchentlich gemessen. Bis zum 24. Tag erfolgte die Messung der Tumore zweimal pro Wochen. Die Therapien mit aPD1 und den TLR-Agonisten wurden zweimal wöchentlich appliziert, die ACT wurde nur einmalig an Tag 10 gegeben. Am 24. Tag wurden die Versuche beendet und es erfolgte die Entnahme der Tumore, der Milz und des Serums aus den Versuchstieren,

Verwendete Therapien in den humanen in-vivo Versuchen

Tabelle 8 listet die in den humanen Modellen verwendete *in vivo* Therapeutika und die angewandte Menge auf

Tabelle 8: Verwendete Therapeutika im humanisiertem Mausmodell und deren Mengenangabe

Therapeutikum	Menge
PBS	5 mg/kg BW
aPD-1	10 mg/kg BW
TLR-Agonisten	100 µg pro Tumor
- -ODN	- -33,3 µg
- -Gardiquimod	- -33,3 µg
- -IDN	- -33,3 µg
ACT	5*10 ⁶ Zellen pro Maus
- -CIK	- 1,25*10 ⁶ Zellen
- -LAK	- 1,25*10 ⁶ Zellen
- -γδ-T-Zellen	- 1,25*10 ⁶ Zellen
- -CTL	- 1,25*10 ⁶ Zellen

Es wurden folgende Therapiekombinationen im humanisierten Mausmodell gegen die jeweils 3 unterschiedliche Zelllinien H1975, H441 und JimT1 getestet: Kontrollgruppe (PBS), aPD-1 Monotherapie, TLR-Monotherapie, ACT-Monotherapie, aPD-1 und TLR-Kombitherapie und die Triple-Kombinationstherapie (bestehend aus aPD1, TLR-Agonisten und ACT). Die TLR-Agonisten wurden peritumoral bzw. intratumoral appliziert. ACT, aPD-1 und die PBS-Kontrollen wurden i.p appliziert.

Murines Mausmodell

Für das murine Mausmodell wurden Mäuse aus dem Stamm C57/Bl6 verwendet und die Tumorzellen der Zelllinie KP938.3. Am Tag 1 wurden 5*10⁶ Tumorzellen pro Seite subkutan in die Flanken injiziert. Ab einer Größe der Tumore von 40-60mm³ wurde mit der Therapie begonnen und mit der Größenmessung im 3-Tages-Rhythmus begonnen. Auch hier wurden die oben genannten Therapiekombinationen verwendet und im 3 Tages-Rhythmus verabreicht. Die Mengenangaben im humanen Mausmodell für die TLR-Agonisten (hier wurden auch die gleichen TLR-Agonisten benutzt) und die ACT entsprechen denen des humanen Modells.

Tabelle 9 listet die verwendeten Therapeutika der murinen *in vivo* Versuche und deren Menge auf

Tabelle 9: Verwendete Therapeutika im murinen Mausmodell und deren Mengenangaben

Therapeutikum	Menge
Ig-G Kontrolle	5 mg/kg/BW
aPD-1	10 mg/kg/BW

3.2.7. Humanisiertes *Patient-Derived-Xenograft* Mausmodell

Die Tumorgewebsproben wurden vom Institut der Pathologie der Uniklinik Köln aus dem Lungengewebe entnommen und in 2x2 cm großen Stücken in PBS gelagert und an uns übergeben. Die Weiterverarbeitung der Fragmente erfolgte immer am gleichen Tag der Entnahme. Die Tumorfragmente wurden durch einen 40 µm *Cell-Strainer* gegeben oder in kleinere Stücke (1-2mm³) zerschnitten, mehrfach mit PBS gewaschen und in eine Gewebeskulturflasche überführt und mit Mischmedium kultiviert. Die Zelllinien wurden über mehrere Passagen kultiviert, um Tumorzellen von Fibroblasten zu differenzieren. Für spätere Versuche wurden die sauberen Zelllinien in *freezing medium* im -150° Stickstofftank aufbewahrt.

Die PDX Modelle unterscheiden sich in der Methodik im Versuchsablauf leicht von dem des humanisierten Modells. Die 5*5 mm großen Tumorfragmente der Patienten wurden den Mäusen unter Narkose subkutan in die Flanken implantiert und in den danach folgenden Wochen beobachtet und gemessen. Bei einer gemessenen Größe von 2x2cm wurden die Tumore den Mäusen entnommen, erneut in kleine Fragmente zerlegt und in eine neue Generation transplantiert. So wurde bis zur 4. Generation verfahren. Die Mäuse, die Tumore der 4. Generation trugen, wurden ab einer gemessenen Größe der Tumore von 1x1cm humanisiert mit PBMC des Patienten, dessen Tumor in der Maus initial implantiert wurde. 10 Tage nach der Humanisierung wurde mit der Messung der Tumoren und Gabe der Therapie im 3-Tages-Rhythmus begonnen. In diesem Modell wurde eine Triple-Therapie mit der mit einer Kontrollgruppe, die nur humanisiert wurde, verglichen.

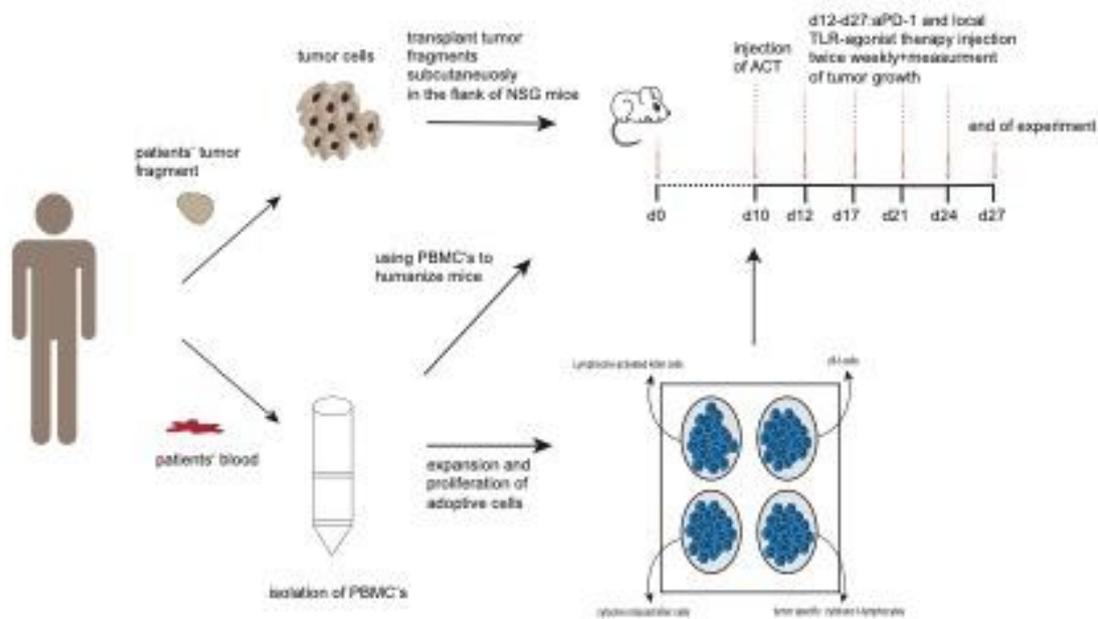


Abbildung 7 Versuchsablauf im *Patient-Derived-Xenograft* Model

Für das PDX-Model wurde Primärmaterial durch die Thoraxchirurgie bereitgestellt. Die Tumorfürfragmente wurden in kleinere Stücke zerlegt und den Mäusen subkutan in die Flanken implantiert. Aus dem Blut der Patienten wurden PBMC's isoliert. Diese wurden zu Effektorzellen differenziert und zur Humanisierung der Tumor-tragenden Mäusen verwendet. Die Mäusen wurden im 3 Tages-Rhythmus therapiert und die Tumore mit der Schublehre gemessen. Am 27. Tag wurde der Versuch beendet und die Tumore, Milzen und das Serum der Mäusen entnommen und für weitere Analysen verwendet.

3.2.8. Durchflusszytometrie

Vorbereitung

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die jeweiligen Vorbereitungen getroffen. Die entnommenen Tumore und Milzen aus den *in-vivo* Versuchen der Mäusen wurden in geeignete Fragmente geteilt und durch einen 40µm *cell-strainer* gegeben. Die Filtrate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml FACS-Puffer bzw. mit ACK-Lyse-Puffer aufgefüllt. Der ACK-Lyse-Puffer wurde nur bei den Milzen verwendet und störende Erythrozyten zu zersetzen. Es verfolgte eine Inkubation bei 4°C über 30 min in einer Dunkelkammer. Danach wurden die Proben bei 400 *rcf* 4°C für 4 min zentrifugiert (Verfahren für jeden weiteren Waschvorgang) . Der Überstand wurde verworfen und erneut mit FACS-Puffer gewaschen.

Oberflächenfärbung

Die Färbung wurde weiterhin in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die für die Oberflächenfärbung verwendeten Antikörper können aus der untenstehenden Tabelle entnommen werden. Da sowohl humane als auch murine Zellen gefärbt wurden, wurden zwei Panels optimiert. Zu den Proben wurde jeweils 0,5 µl der Antikörper gegeben und mit der Pipette suspendiert. Das *Zombie Aqua Fixable Viability Kit* wurde zu Differenzierung lebende/tote Zelle verwendet. Dafür wurde 0,1 µl der Stammlösung zu jeder Probe hinzugefügt. Nachdem alle extrazellulären Marker den Proben beigefügt wurden, wurden sie auf einem Vortex geschüttelt, abgedeckt und bei 4°C in der Dunkelkammer für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und mit 1ml der Fixierungslösung fixiert und erneut für 15 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nach der Fixierung folgte ein weiterer Waschvorgang.

Intrazelluläre Färbung

Die Proben wurden mit 1ml der Permeabilisierungslösung für 15 bei 4°C inkubiert und danach erneut gewaschen. Danach erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 0,5 µl der Marker (IFN-g und FOXP3) und eine anschließende Inkubation für 30 min bei 4°C in der Dunkelkammer. Die Proben wurden erneut gewaschen und mit 100 µl facs puffer gelöst in FACS-Röhrchen überführt.

Auswertung und Gating Strategie

Die Auswertungen der gemessenen Daten erfolgten mit der Software Kaluza und es wurden die dazugehörigen Abbildungen erstellt. Diagramme wurden mit GraphPad 8 erstellt.

Im ersten Schritt wurden die Singlets identifiziert, in dem man *forward scatter* Fläche (FSC-A) gegen Höhe (FSC-H) aufgetragen hat und die Population mit einem linearen Zusammenhang ausgewählt hat. Die Auftragung FSC-A gegen SSC-A diente der Identifikation der von Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität. Damit nur vitale Zellen für die Auswertung eingeschossen wurden, wurde CD3 gegen unseren Vitalität-Marker (Zombie-UV) aufgetragen. Nach dem Basis-Gating konnten dann einzelne Lymphozyten Fraktionen und ihre Proliferation genauer untersucht werden.

Antikörper-Panel

Tabelle 10 listet die verwendeten humane und murinen Antikörper für die jeweiligen Kanäle des Durchflusszytometers auf

Tabelle 10: Verwendeten humane und murinen Antikörper für die jeweiligen Kanäle des Durchflusszytometers

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
	FITC	PerCP-Cy5.5	PE	PE-Dazzle	PE-Cy7
Mouse	CFSE	CD45	FOXP3	IFN-g	CD3
Human	CFSE / Ki67	CD56	FOXP3	IFN-g	gdTCR

	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
	APC	AF700	APC-Fire750	BV421	BV 510
Mouse	PD1	NK1.1	gdTCR	CD8	frei
Human	CD4	CD8	CD16	CD69	IL-2

	FL11	FL12	FL13	FL14
	BV605	BV785	BUV395	BUV737
Mouse	Ki67	CD4	Live/Dead	CD69
Human	PD1	CD45	Live/Dead	CD3

3.2.9. Immunhistologie

Aus den *in-vivo* Versuchen entnommenen Tumore und Milzen (bzw. die Primärtumore der Patienten) wurden in 4 % (v/v) Formalinlösung fixiert für 24 Stunden und danach mit PBS gewaschen. Alle fixierten Proben wurden in Paraffin fixiert und mit den unten beschriebenen primären Antikörpern gefärbt (durch Alexandra Florin vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln). 3 mm dicke Gewebeschnitte wurden angefertigt, entparaffinisiert und mit dem LabVison Autostainer-480S gefärbt. Es wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Färbungen mit den primären Antikörpern (CD3, CD4, CD8, CD56, PD-L1, Ki-67, FOX-P3) erstellt.

3.2.10. Statistik

Statistische Analysen wurden mit Prism 8 durchgeführt. Die in den Abbildungen ... dargestellten Daten illustrieren die Mittelwerte der Messungen und deren Standardfehler . Die Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden durch einen zweiseitigen Student's T-test bestimmt. Ab einem p-Wert $<0,05$ wurden die Ergebnisse der verwendeten statistischen Tests als signifikant gewertet und in den Abbildungen mit den entsprechenden * versehen.

4. Ergebnisse

Das Protokoll zur Induktion der Effektorzellen aus den PBMC's wurde stetig optimiert und die Phänotypen der Effektorzellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nachdem die Phänotypen der Effektorzellen definiert waren, wurde die Effektivität der Effektorzellen bezüglich ihrer Toxizität auf die Tumorzellen der Zelllinien H441, H1975 und JimT1 in in-vitro Essays getestet. In diesen Experimenten imponierte der synergistische Effekt aller 4 Effektorzellsubtypen in Kombination auf die Toxizität gegenüber allen 3 Zelllinien. Daher wurden für die folgenden *in-vivo* Versuche die 4 Effektorzellen zusammen als adoptive T-Zelltherapie (ACT) verwendet. Die Immuntherapien wurden zuerst im humanisierten Mausmodell mit den oben beschriebenen Tumorzelllinien getestet. Bei alle drei Zelllinien bewirkte die Triple-Kombinationstherapie eine Verringerung in den Tumorzellvolumina im Verlaufe der Versuche. Daher wurde im PDX Modell und im autochthonen KP-Modell die Auswirkung von dieser Therapie auf die Tumore gegenüber der Kontrollgruppe untersucht. Die Tumore aller Therapiegruppen wurden nach den *in-vivo* Versuchen auf Infiltrationen mit Immunzellen untersucht und das Serum der Mäuse wurde auf Zytokine untersucht.

3.3 Phänotypisierung der Effektorzellen mittels Durchflusszytometrie zeigt erfolgreiche Proliferation in die unterschiedlichen Immunzelltypen *in vitro*

Die Phänotypisierung der humanen Effektorzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Effektorzellen wurden entsprechend dem Protokoll 7-14 Tage in der Zellkultur differenziert, proliferiert und expandiert. An Tag 7 und 14 wurden die Effektorzellen mit entsprechenden Antikörpern (Tabelle 8) gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. In Abbildung 8 wird exemplarisch eine Einzelmessung der Effektorzellen dargestellt zur Illustration der sich entwickelten Phänotypen. Die PBMCs, bei denen keine Differenzierung erfolgte und damit einen Vergleichswert darstellten, zeigten einen Anteil von 3,5 % natürlichen Killerzellen (CD56+/CD3-) und einen Anteil von 26,07 % T-Zellen (CD56-/CD3+) unter allen CD45+/lebenden Zellen am 7.Tag (Abb. 8). In der Population der naiven PBMCs waren nur 0,39 % $\gamma\delta$ T-Zellen unter den CD45+/alive Zellen nachweisbar. Die Induktion der LAKs erfolgte ausschließlich mit IL-2 Gabe in der Zellkultur und führte zur sichtbaren Differenzierung des Phänotyps der Natürlichen Killerzellen (CD56+/CD3-) am 7. Tag. Im Vergleich zu den naiven PBMC veränderte sich der Anteil an T-Zellen (CD56-/CD3+) und der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen unter den CD45+/alive der LAK Population nicht. Unter den CD45+/alive Zellen konnte am Tag 14 mit 11,46 % CD56+/CD3+ ein erhöhter Anteil an NKT-Zellen in Vergleich zu den PBMCs

nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch ein höherer Anteil an CD56-/CD3+ Zellen (84,48 %) unter den CIKs, die sich in 65,61 % CD4+ und 29,26 % CD8+ T-Zellen unterteilen ließen. Die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit Zoledronsäure führte zu einem Anteil von 10,94 % $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb dieser Population im Vergleich zu einem Anteil von 0,39 % unter den PBMCs. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die LAK's am Tag 8 einen NK Phänotyp, die CIK's einen NK-T-Zell Phänotyp und die $\gamma\delta$ T-Zellen einen T-Zell Phänotyp aufwiesen (Abb. 8).

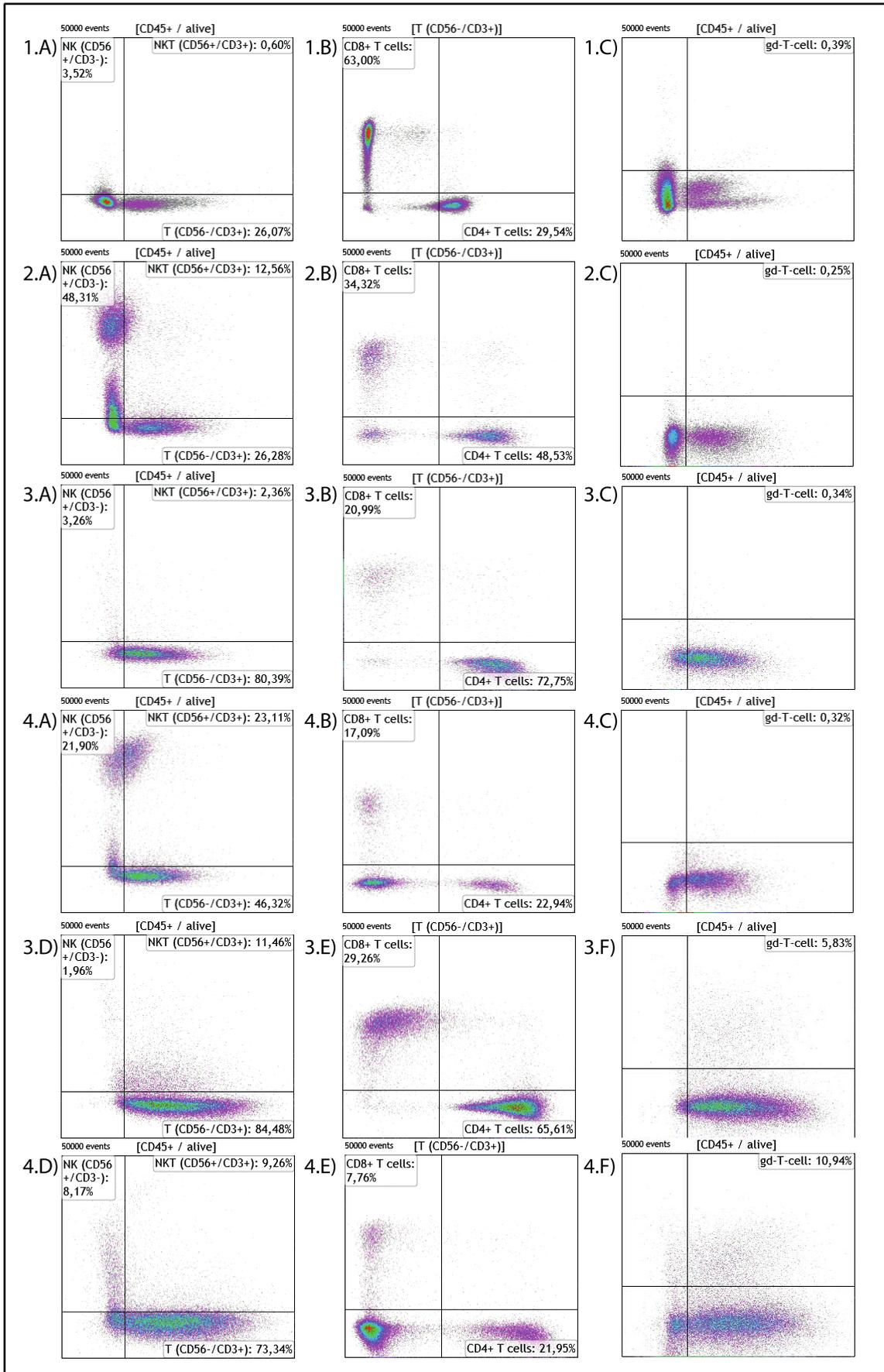


Abbildung 8 Effektorzellen zeigen durch die *in-vitro* Proliferation eine Differenzierung zu unterschiedlichen immunologischen Phänotypen

1.A-C) PBMC's mit IL-2 Stimulation an Tag 7 nach Isolation aus *buffy coats* **2.A-C)** LAK's an Tag 7 nach Stimulation, **3.A-C)** CIK's an Tag 7 nach Stimulation, **3.D-F)** CIK's an Tag 14 nach Stimulation, **4.A-C)** $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 7 nach Stimulation und **4.D-F.)** $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 14 nach Stimulation. Die Effektorzellen wurden nach Protokoll über 7-14 Tage in der Zellkultur mit Zytokinen zur Proliferation und Differenzierung angeregt und am 7 bzw. 14. Tag mittels Antikörper für die Phänotypisierung mit der Durchflusszytometrie gefärbt. Für die Typisierung wurde zuerst ein *Basis Gating* durchgeführt, bei dem im ersten Schritt *Singlet* Zellen ausgewählt wurden und im zweiten Schritt diese dann auf Grund Ihrer Granulität den Lymphozyten zugeordnet werden konnten. Im nächsten Schritt wurden CD45+ Zellen lebende unter den in den ersten beiden Schritten selektierten Zellen herausgefiltert. Diese CD45+/lebenden Zellen wurden dann weiter auf Identifizierungsmarker gefiltert. LAK's zeigen im Vergleich zu PMBCs einen Natürlichen-Killerzellen-Phänotyp (CD3-/CD56+). Unter allen CD45+alive Zellen lassen sich 48,31 % der LAK's dem NK-Phänotyp zuweisen, bei den PMBCs beträgt der Anteil nur 3,52 %. CIK's zeigen einen höheren Anteil des NK(T)-Phänotyps (CD56+/CD3+) mit 11,46 % im Gegensatz zu den PMBCs mit 0,6 % an Tag 14. Mit einem Anteil von 10,94 % zeigen die $\gamma\delta$ T-Zellen den höchsten in diesem Phänotyp unter den Effektorzellen.

3.4 Viabilitätsmessung zeigt starken antitumoralen Effekt der kombinierten Effektorzellen *in vitro*

Die durchgeführten Viabilitätsmessungen dienten zum Nachweis der toxischen Wirkung der Effektorzellen *in-vitro* und wurden wie oben beschrieben mit den humanen Zelllinien (H1975, H441 und JimT1) durchgeführt. Die Viabilitätsmessungen wurden durchgeführt, in dem 2500 *target cells* (T-Tumorzellen) abgezählt auf einer *96-well-plate* ausgesät wurden. Die hier benutzten Tumorzellen besaßen eine Gentransduktion mit dem Gen *luc2* (Luciferase-Gen). Dieses kann bei Anwesenheit von Luciferin eine Biolumineszenz erzeugen durch die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dieses Licht kann durch den Detektor gewertet werden und korreliert mit der Viabilität der Tumorzellen in den jeweiligen *wells*. Zu den Tumorzellen der Linien H441, H1975 und JimT1 wurden die unterschiedlichen Effektorzelltypen im Einzelnen und die Kombination aller vier Effektorzellen in einem bestimmten Effektor-/Tumorzell Verhältnis hinzugegeben (Abb. 9). Bei allen Tumorzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination aller vier Effektorzellen (CIK's, LAK's, $\gamma\delta$ -T-Zellen und CTL's) die niedrigste Viabilität der Tumorzellen im 1:1 und 3:1 Verhältnis messen ließ (Abb. 9). Auch im Verhältnis von 10:1 und 30:1 dominierte ein wirksamer Effekt der Kombination aller vier Typen, jedoch zeigte in diesen Verhältnissen auch die alleinige Anwendung von $\gamma\delta$ T-Zellen einen tödlichen Effekt auf die Tumorzellen.

Es konnte auch gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen isoliert einen negativen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen zeigen im Vergleich zu den anderen Effektorzellen in isolierter Betrachtung (Abb. 9). Die Daten dieses Versuches mit der Zelllinie H1975 belegten, dass bei diesen Tumorzellen ein starker Effekt auf die Viabilität der Zellen durch die alle Effektorzellen

besteht, da hier beim Verhältnis 30:1 keine lebenden Tumorzellen mehr detektiert werden konnten (Abb. 9). Dieser Effekt konnte hier auch für die $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden (Abb. 9). Bei den H441 und JimT1 Zelllinien zeigte sich ein eher konstanter Effekt auf die Viabilität auch bei höherem Verhältnis zugunsten der Effektorzellen. Das relative Überleben bei der JimT1 Linie lag bei allen Verhältnissen zwischen 25 %-35 % (Abb. 9). Hier zeigte sich kein stärkerer Einfluss bei Erhöhung der Effektorzellzahl. Der gleiche Effekt konnte bei der H441 gezeigt werden (Abb. 9).

Folglich kann zusammengefasst werden, dass die Kombination der vier Effektorzellen bei allen drei Zelllinien einen starken antitumoralen Effekt zeigte und sich daher negativ auf das Überleben der Tumorzellen nach 72 Stunden auswirkte (Abb. 9). Als Monotherapie zeigten die $\gamma\delta$ T-Zellen den größten toxischen Effekt. Schlussfolgernd aus dem Versuch ergab sich für die weiteren *in vivo* Versuche der Entschluss, dass die Kombination von allen vier Effektorzellen den stärksten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen hatte. Daher wurde in den *in vivo* Versuchen stets die vierfach Kombination der Effektorzellen angewendet.

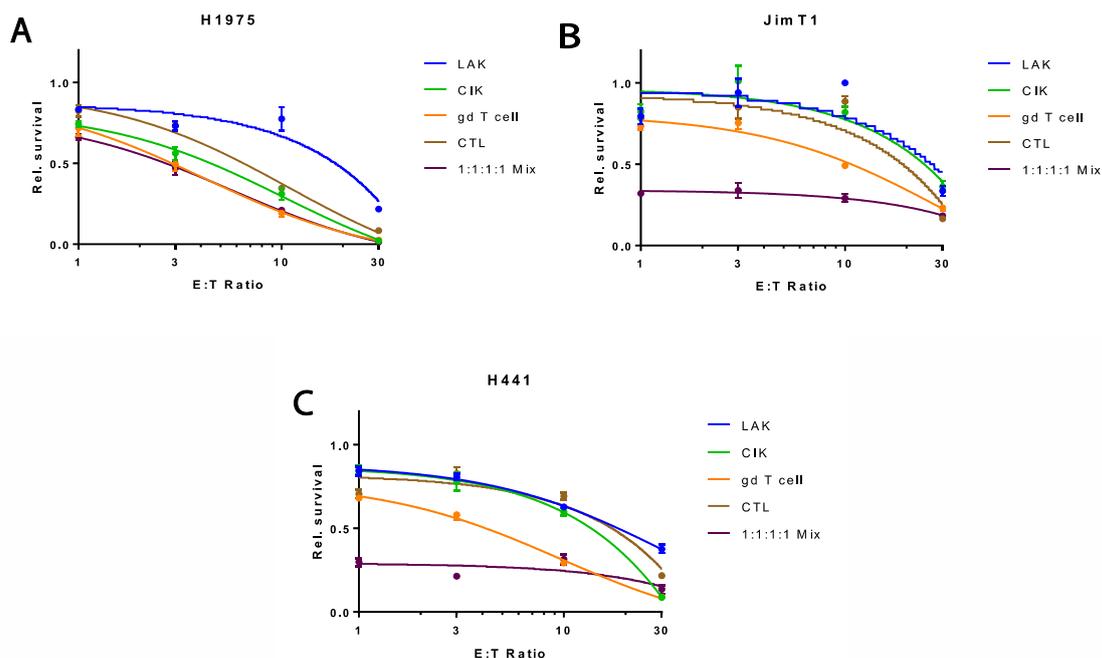


Abbildung 9 Kombination aller Effektorzellen im *in-vitro* Viabilitäts-Essay

Es wurden Viabilität-Messungen durchgeführt, bei denen Lumineszenzlicht detektiert wurde und mit der Menge an absorbiertem Licht eine Korrelation auf lebendige Tumorzellen zeigt. Die Daten der Messungen wurden an Excel übermittelt und auf Vergleichswerte bezogen, die aus den Tumorzellen ohne hinzugefügte Effektorzellen ermittelt wurden. In den Graphen dargestellt ist das relative Überleben der Tumorzellen in Abhängigkeit von dem Effektorzell/Tumorzell Verhältnis. Die Messungen wurden 3 mal wiederholt und hier wurde der Mittelwert angegeben. In **A** wurde diese Messung mit den Tumorzellen der Zelllinie H1975, in **B** mit der Zelllinie JimT1 und in **C** mit der Zelllinie H441 durchgeführt.

3.5 *In-Vivo* Experimente

3.5.1. Immunhistologie bestätigt erfolgreiche Humanisierung der NSG-Mäuse mit humanen Immunzellen

Für die *in-vivo* Experimente wurden Mäuse des Stammes NOD-*scid*IL2Rg^{null} verwendet und mit humanen PBMC's von Spendern der Transfusionmedizin humanisiert. Die PBMC's wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll aus den *buffy coats* isoliert und es wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen abgezählt und den Mäusen i.p. appliziert. Es wurden 3 NSG-Mäuse verwendet um das Vorhandensein von humanen Zellen in den Milzen dieser Mäuse nachzuweisen. In Abbildung 10 ist exemplarisch die Milz einer humanisierten und einer nicht humanisierten NSG Maus dargestellt und es wurde die Infiltration mit CD3, CD4 und CD8 positiven Immunzellen verglichen. Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, inwiefern sich die humanen Immunzellen in den Milzen der Mäuse anreichern können. Es konnte eine starke Infiltration mit humanen CD3+, CD4+ und CD8+ Immunzellen in den humanisierten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 10). Die alleinige Betrachtung der CD3+ Zellen belegte eine sehr starke Infiltration der Immunzellen in das Immunsystem der Maus und bestätigte die Zirkulation der Immunzellen im Kreislauf. Um in dem humanisierte Mausmodell ein humanes Immunsystem zu konstruieren und damit ein humanes Zusammenspiel zwischen den Tumorzellen und den Immunzellen zu ermöglichen, war es von grundlegender Bedeutung humane Immunzellen in den Milzen der Mäuse zu identifizieren. Folglich konnte nun mit den *in-vivo* Versuchen mit den Tumorzellen im humanisierten Mausmodell begonnen werden.

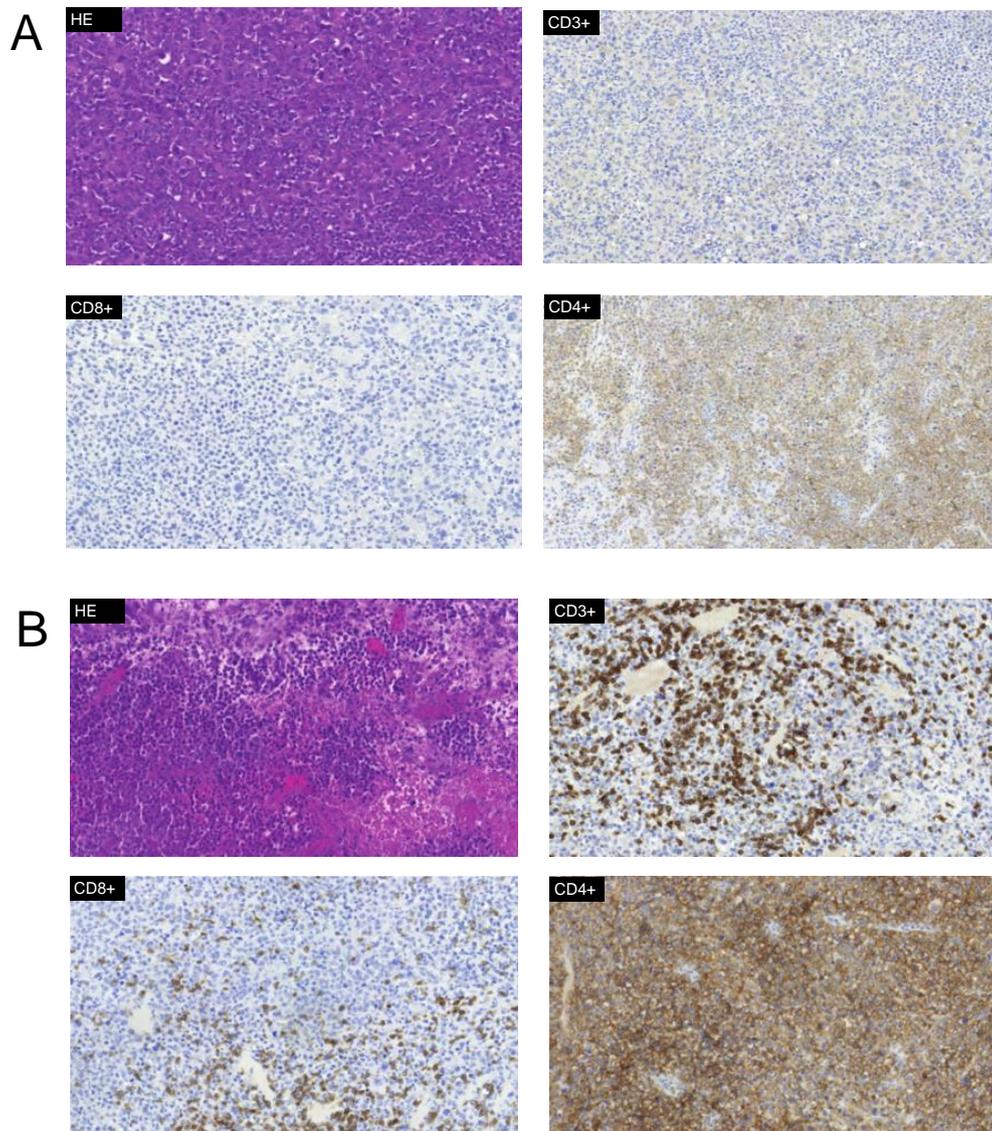


Abbildung 10 Erfolgreiche Humanisierung der Versuchstiere mit aus PBMC's gewonnenen humanen Immunzellen

Die Milz der Maus wurde 10 Tage nach Applikation der PBMC's entnommen und für eine immunohistologische Untersuchung mit humanen Antikörpern gefärbt. Hier dargestellt sind die Färbungen mit CD3, CD4, CD8 und die HE-Färbung. **A** zeigt die Milz einer NSG Maus, die keine humanen Zellen appliziert bekommen hat **B** zeigt die Milz einer Maus bei der an Tag 1 $1 \cdot 10^7$ PBMC's i.p appliziert wurden. Im Vergleich zur nicht humanisierten Maus konnte in den humanisierten Mäuse eine erhöhte Infiltration des Milzgewebes mit humanen CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen gezeigt werden.

3.5.2. Triple Immuntherapie führt in allen subkutanen Tumoren im humanisierten Mausmodell zu einer deutlichen Regression der TumorgroÙe

Nachdem durch die Immunhistologie die Infiltration mit humanen Immunzellen belegt werden konnte, wurden Tumorzellen subkutan in die Flanken injiziert und das Tumorstadium innerhalb einer Zelllinie unter unterschiedlichen Therapiegruppen verglichen. Die Tumore wurden am Therapiestart (Tag 10) das erste Mal gemessen und danach wurden die Mäuse im 3-Tages-Rhythmus gemessen und therapiert. Es wurden die Volumina der Tumore bestimmt und als *fold change*, also Veränderung zum Ausgangsvolumen, angegeben und in den nachfolgenden Graphen dargestellt.

Tumorstadium der Zelllinie H1975 (Adenokarzinom der Lunge)

In diesem Modell wurde das Tumorstadium der H1975 Zelllinie im humanisierten Modell unter den unten beschriebenen Therapiekombinationen untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die *only humanized* darstellt, zeigt sich bei allen Therapiegruppen auÙer der aPD1-Antikörper-Therapie an Tag 24 ein signifikant geringeres Tumorstadium (Abb. 11 und 12). Eine Verkleinerung der Tumorstadiumen erzielten die Therapien mit den TLR-Agonisten in Monotherapie, die Kombination aus TLR-Agonisten und aPD1-Antikörpern sowie die Triple-Kombinationstherapie (Abb. 11 und 12). Die Monotherapie mit aPD1-Antikörpern führte zu einem geringeren Tumorstadium an Tag 24 im Vergleich zur Kontrollgruppe, konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied der Tumorstadiumen bewirken. Die Wirksamkeit der Triple-Kombinationstherapie auf die Tumorstadiumen konnte bereits an Tag 13 mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Tumorstadiumen dieser Therapie mit der Kontrollgruppe bewiesen werden (Abb. 12). Dieser Unterschied konnte an allen folgenden Messtagen bestätigt werden. Allein die Triple-Kombinationstherapie zeigte an allen Messtagen eine Verkleinerung und damit eine Remission (*fold change* < 1) der Tumore im Vergleich zur GröÙe vor der Therapiegabe.

H1975

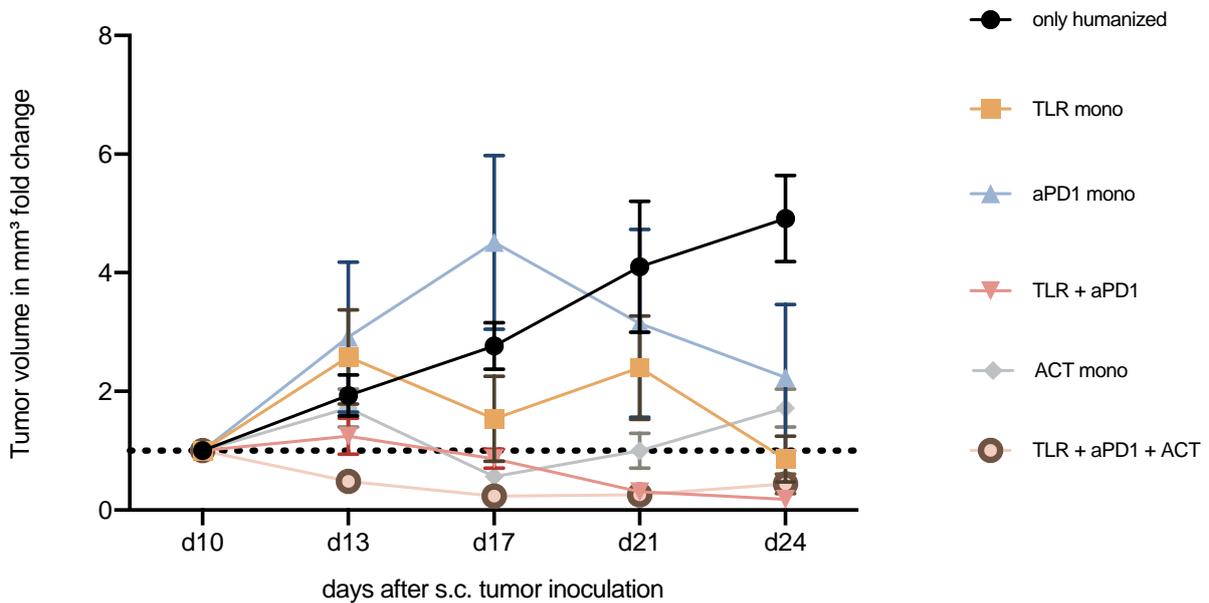


Abbildung 11: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen H1975 Tumore im humanisierten Mausmodell

Die gemessenen Volumina der Tumore wurden den Messungstagen entsprechend gegen *fold change* (Faltenänderung) aufgetragen. Wobei im Graph 1 (gestrichelte Linie) *einem fold change* von 1 entspricht und damit für keine Änderung im Wachstum steht. Eine Faltenänderung unter 1 entspricht einer Verkleinerung und über 1 einer Vergrößerung der Volumina der Tumore. Es wurden 6 unterschiedliche Therapien verglichen: Kontrollgruppe - nur humanisiert (n=10), TLR-Agonisten Monotherapie (n=8), aPD1-Antikörper (n=8), TLR-Agonisten und aPD1-Antikörper Kombinationstherapie (n=8), ACT Monotherapie (n=9) und TLR-Agonisten, aPD1-Antikörper und ACT Kombinationstherapie (n=10). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Volumina der Tumore mit Standardfehler.

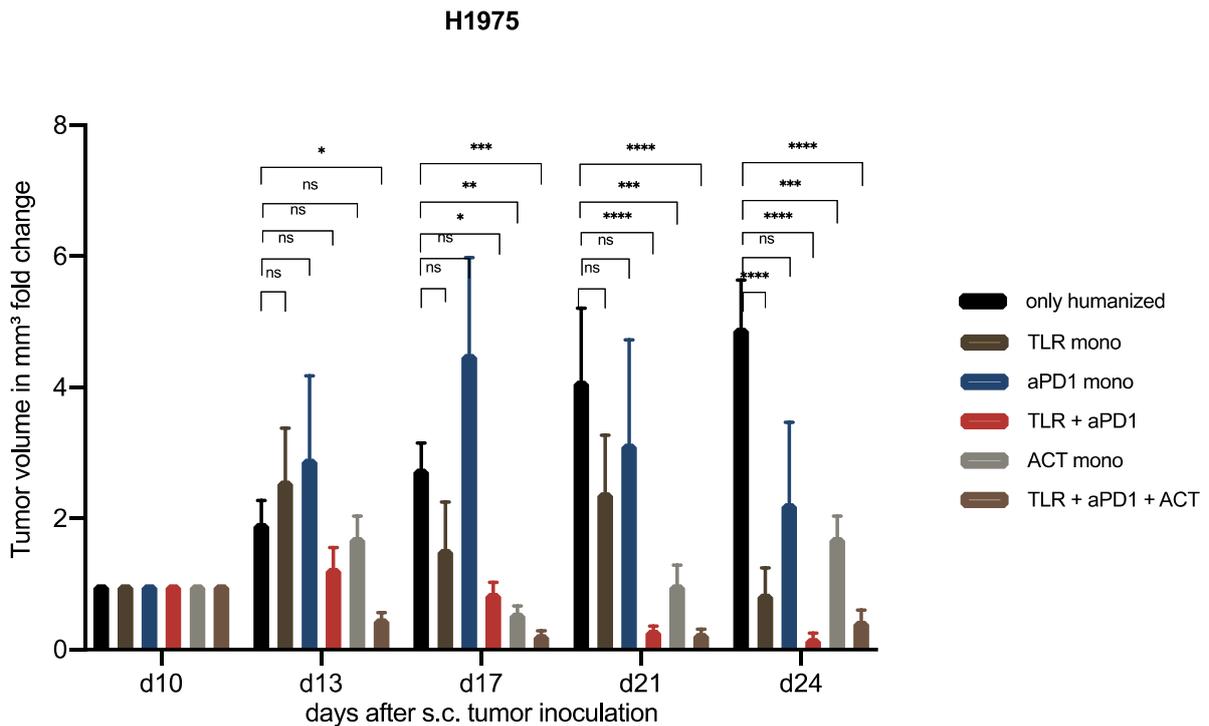


Abbildung 12: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der H1975 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen

Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardfehler der Tumorumfängen in *fold-change* an den gegebenen Messtagen. An Tag 24 konnte man bei allen Therapiegruppen außer der aPD1-Antikörper Monotherapie eine signifikante Verkleinerung der Volumina im *fold change* messen. Die Triple Kombinationstherapie zeigte bereits an Tag 13 eine signifikante Verkleinerung. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Tumorwachstum der Zelllinie H441 (Adenokarzinom der Lunge)

In diesem Modell mit der Zelllinie H441 wurde das Tumorwachstum der Therapiegruppe untersucht und mit der Kontrollgruppe (*only humanized*) verglichen. Wie auch im H1975-Modell zeigte sich in diesem Modell eine signifikante Verkleinerung der Tumorumfängen an Tag 24 bei den Therapiegruppen, die die Triple-Kombinationstherapie oder die Kombination aus TLR-Agonisten und aPD1-Antikörpern erhielten (Abb. 13 und 14). Die Monotherapie mit der ACT führte zu einem signifikant geringeren Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch nicht zu einer Verkleinerung der Tumore zum Anfangsvolumen (Abb. 14). Die Monotherapien mit aPD1-Antikörpern oder TLR-Agonisten konnten bei dieser Zelllinie keinen signifikanten Effekt auf eine Verringerung der Volumina im Verlauf erzielen. Die Triple-Kombinationstherapie zeigte hier als einzige Therapie an Tag 17 und 21 eine Verkleinerung der Tumore zum Ausgangswert von Tag 10 (Abb. 14).

H441

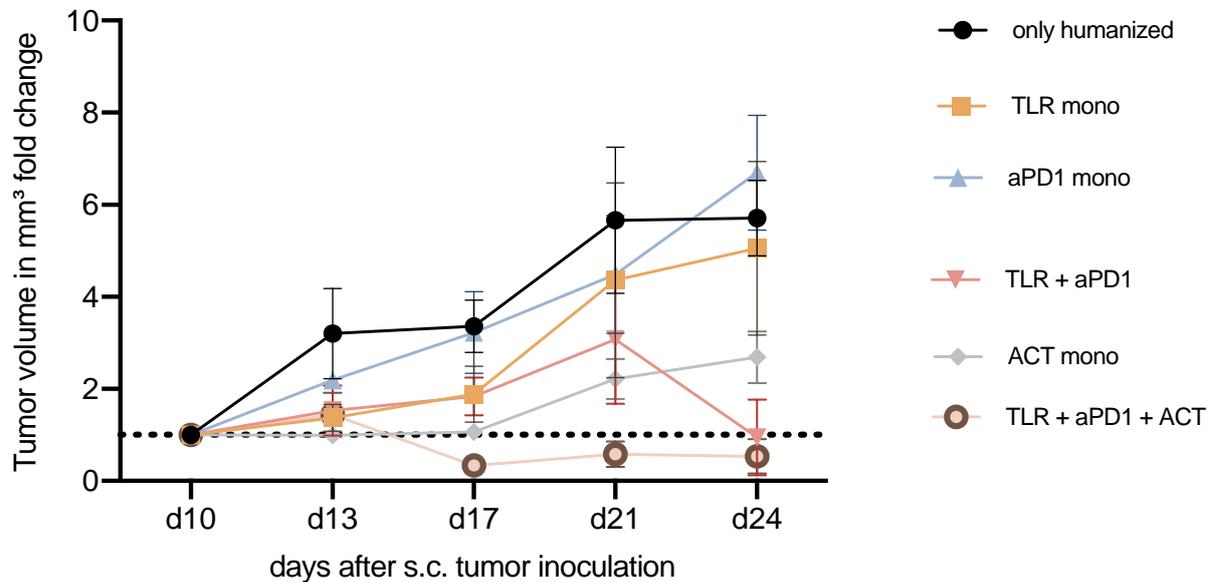


Abbildung 13: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen H441 Tumore im humanisierten Mausmodell

Die gemessenen Volumina der Tumore wurden den Messungstagen entsprechend gegen *fold change* (Faltenänderung) aufgetragen. Wobei im Graph 1 (gestrichelte Linie) einem *fold change* von 1 entspricht und damit für keine Änderung im Wachstum zum Anfangswert steht. Eine Faltenänderung unter 1 entspricht einer Verkleinerung und über 1 einer Vergrößerung der Volumina der Tumore zum Anfangswert (Tag 10). Es wurden 6 unterschiedliche Therapien verglichen: Kontrollgruppe - nur humanisiert (n=8), TLR-Agonisten Monotherapie (n=9), aPD1-Antikörper (n=10), TLR-Agonisten und aPD1-Antikörper Kombinationstherapie (n=6), ACT Monotherapie (n=12) und TLR-Agonisten, aPD1-Antikörper und ACT Kombinationstherapie (n=10). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Volumina der Tumore mit Standardfehler.

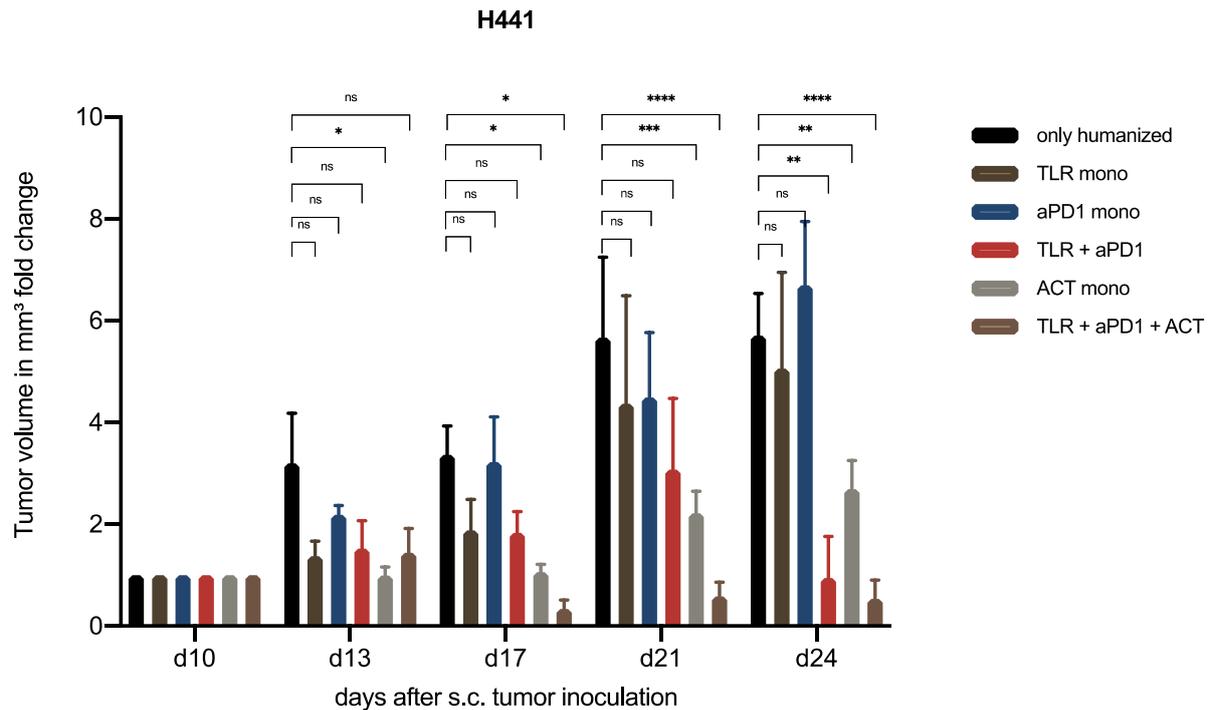


Abbildung 14: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der H441 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen

Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardfehler der Tumorumfängen in *fold-change* an den gegebenen Messtagen. An Tag 24 konnte man bei allen Therapiegruppen außer der aPD1-Antikörper Monotherapie eine signifikante Verkleinerung der Volumina im *fold change* messen. Die Triple Kombinationstherapie zeigte bereits an Tag 17 eine signifikante Verkleinerung. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Tumorstadium der Zelllinie JimT1 (Mammakarzinom)

In den Abbildungen 15 und 16 ist das Tumorstadium der Zelllinie JimT1 im humanisierten Model unter den verschiedenen Therapien dargestellt. Die Triple-Kombinationstherapie zeigte auch hier einen signifikanten Unterschied im Tumorstadium an Tag 24 und führt zu einer Verkleinerung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe (*only humanized*). Identisch zu den Versuchen mit den Linien H441 und H1975 führte hier als einzige Therapie die Triple-Kombinationstherapie zu einer Verringerung der Tumore im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 13, 17, 21 und 24. Die anderen Therapien erzielten in diesem Model keine signifikante Änderung in den Tumorstadien im Vergleich zur Kontrolle. Die ACT-Monotherapie scheint in diesem Model einen eher negativen Einfluss auf die Änderung der Tumorstadien zu haben (Abb. 15 und 16).

JimT1

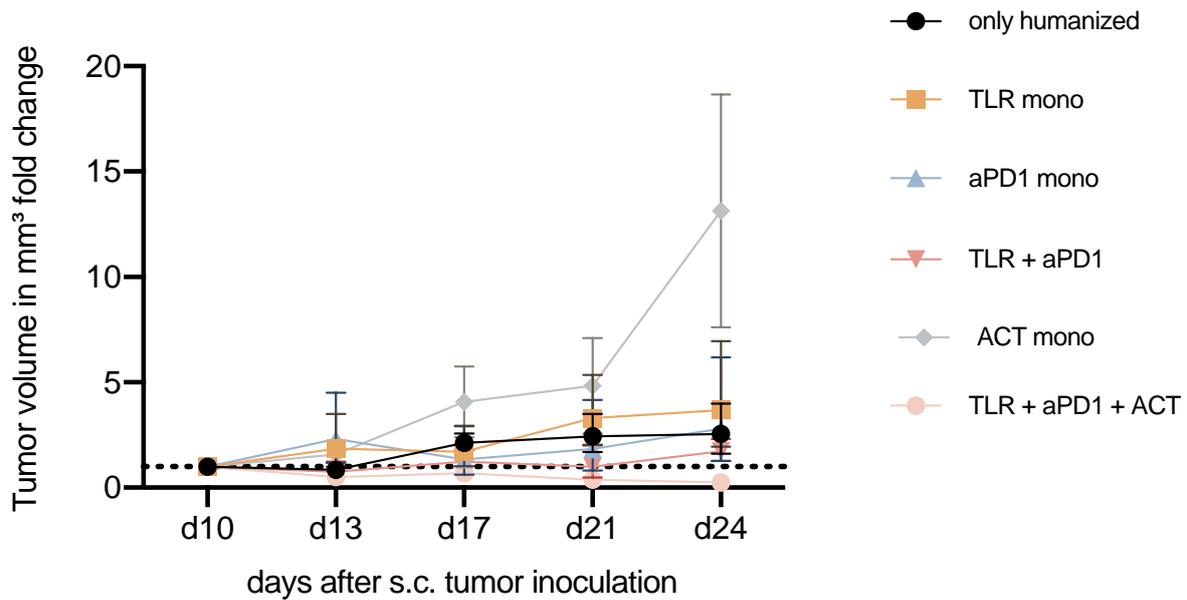


Abbildung 15: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen JimT1 Tumore im humanisierten Mausmodell

Die gemessenen Volumina der Tumore wurden den Messungstagen entsprechend gegen *fold-change* (Faltenänderung) aufgetragen. Wobei im Graph 1 (gestrichelte Linie) einem *fold change* von 1 entspricht und damit für keine Änderung im Wachstum zum Anfangswert steht. Eine Faltenänderung unter 1 entspricht einer Verkleinerung und über 1 einer Vergrößerung der Volumina der Tumore zum Anfangswert (Tag 10). Es wurden 6 unterschiedliche Therapien verglichen: Kontrollgruppe - nur humanisiert (n=10), TLR-Agonisten Monotherapie (n=8), aPD1-Antikörper (n=7), TLR-Agonisten und aPD1-Antikörper Kombinationstherapie (n=8), ACT Monotherapie (n=6) und TLR-Agonisten, aPD1-Antikörper und ACT Kombinationstherapie (n=8). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Volumina der Tumore mit Standardfehler.

JimT1

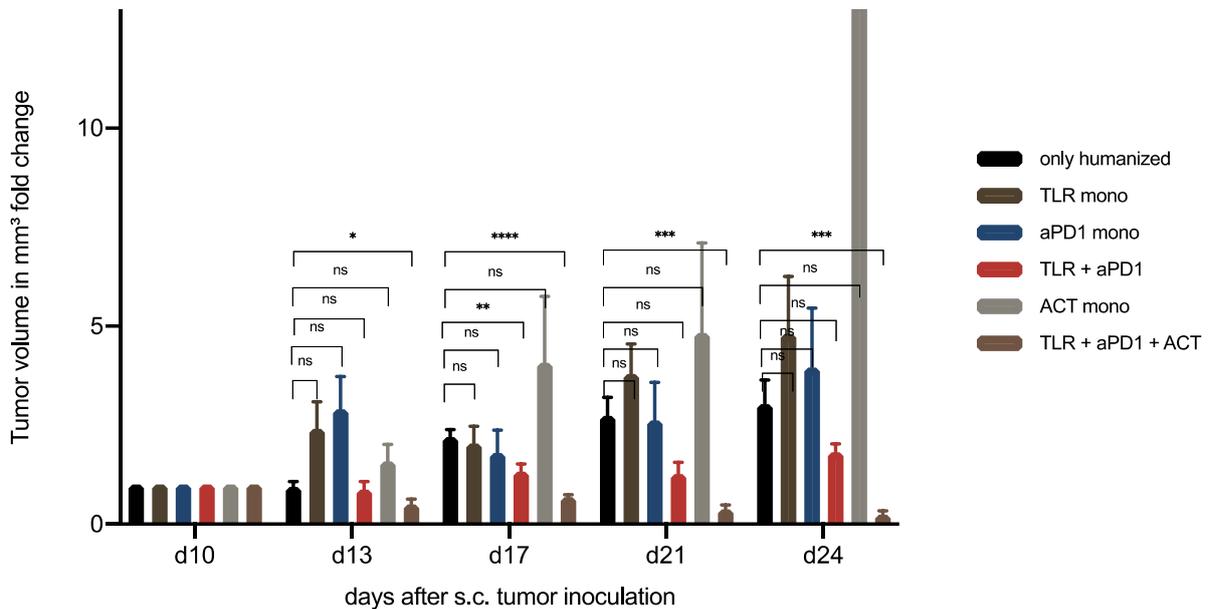


Abbildung 16: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der JimT1 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen

Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardfehler der Tumorumfängen in *fold-change* an den gegebenen Messtagen. An Tag 24 konnte man bei allen Therapiegruppen außer der aPD1-Antikörper Monotherapie eine signifikante Verkleinerung der Volumina im *fold change* messen. Die Triple Kombinationstherapie zeigte bereits an Tag 17 eine signifikante Verkleinerung. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Zusammenfassung Tumorwachstum aller drei Zelllinien im humanisiertem Mausmodell

In allen Tumoren, die im humanisierten Modell mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden, konnte eine signifikante Verkleinerung der Tumorumfängen an Tag 24 gezeigt werden im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 12, 14 und 16). Keine andere Therapiekombination war in allen Gruppen gleichermaßen so effektiv wie diese. In der Übersicht in Abbildung 17 ist der Therapieerfolg aller Zelllinien gezeigt. Hier wird zusammenfassend die Remission gezeigt, die durch die Gabe der Triple-Kombinationstherapie erzielt werden konnten. Es konnte somit durch die Triple-Kombinationstherapie eine Verkleinerung der Tumore von Tag 10 zu Tag 24 gezeigt werden (Abb. 17).

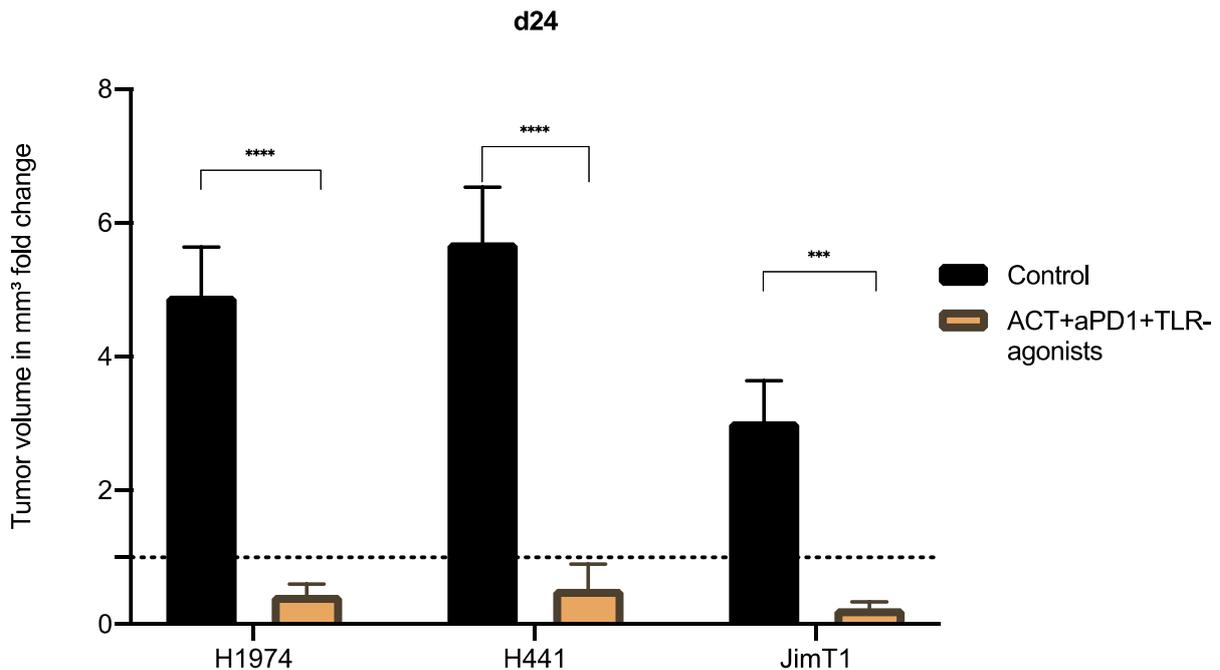


Abbildung 17: Übersicht der signifikanten Verkleinerung der Tumore, die im humanisierten Model mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden

In der Abbildung sind die Mittelwerte der Tumorumfänge an Tag 24 nach Tumordinjektion der Kontrollgruppe und der Triple-Kombinationstherapie Gruppe mit Standardfehler dargestellt. Die Tumorumfänge sind in *fold change* abgebildet. Ein *fold change* unter 1 (gestrichelte Linie) zeigt eine Verkleinerung der Tumorumfänge. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

3.5.3. Tumorwachstum im Patient-Derived-Xenograft Mausmodell unter der Triple Kombinationstherapie

In diesem Modell sollte die Triple-Kombinationstherapie nun in einem autologen Setting getestet werden. Hier stammte sowohl das Tumorgewebe als auch die Immunzellen von dem gleichen Patienten. Das Tumorgewebe wurde von der Pathologie der Uniklinik Köln untersucht und wurde folgendermaßen eingestuft: Plattenepithelkarzinom mit einer Mutation im PTEN und TP53 Gen (Tabelle 9). Auch die PDX-Tumore wurden von der Pathologie erneut untersucht und es zeigte sich eine Persistenz der Mutationen nach den Transplantationen.

Im PDX Modell konnte wie in den oben beschriebenen humanisierten Mausmodellen ein verringertes Tumorumfang in den Tumoren, die mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden, beschrieben werden. Im Gegensatz zu den anderen Modellen konnte jedoch keine Verkleinerung der Tumore unter der Triple-Kombinationstherapie detektiert werden. Es ist jedoch ein Trend erkennbar, der auf ein verlangsamtes Wachstum hindeutet, da die Tumorumfänge im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer waren und langsamer zunahm. In diesem Modell wurde auf eine Testung von Monotherapien mit PD1-Antikörpern

und TLR-Agonisten verzichtet, da das Primärmaterial limitiert vorhanden war und im humanisierten Model eine klare Überlegenheit der Triple-Kombinationstherapie gezeigt wurde (Abb. 17).

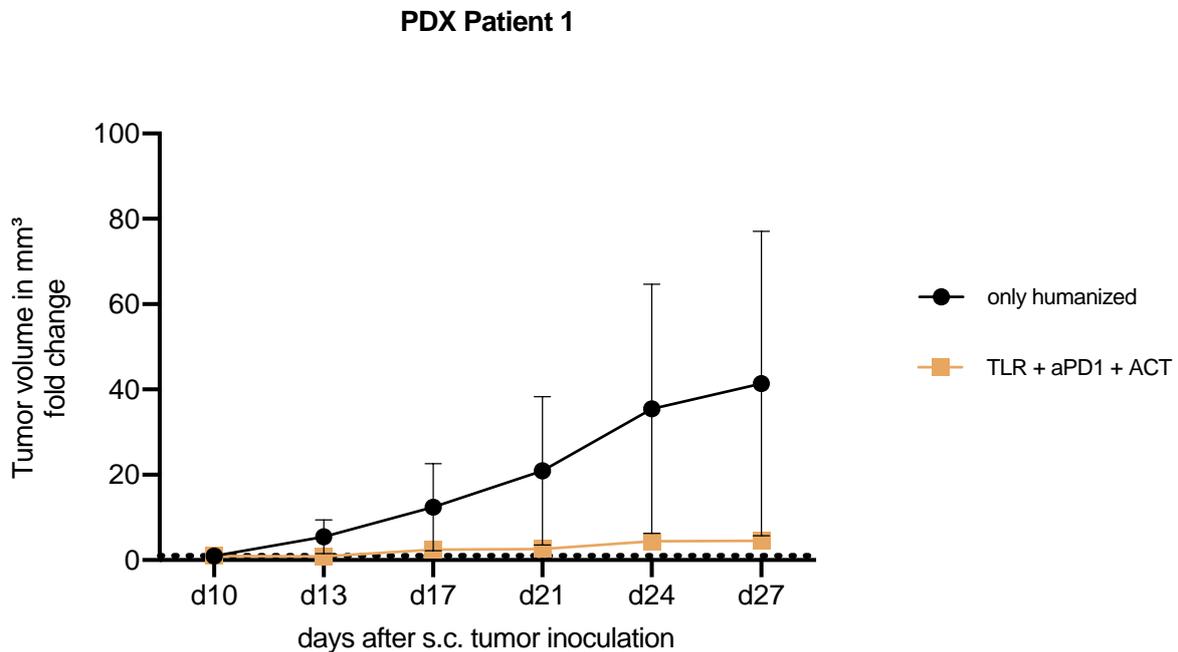


Abbildung 18: Tumorumfängen und deren Veränderung des PDX-Modells

In der Abbildung ist das Wachstum der subkutanen Tumore durch das Tumorumfang in fold change an den Messstagen der Triple-Kombinationstherapie Gruppe (n=8) und der Kontrollgruppe (n=5) aufgetragen. Im Graph dargestellte gestrichelte Linie entspricht einer Faltenänderung von 1 und steht damit für keine Änderung im Wachstum zum Anfangswert. Eine Faltenänderung unter 1 entspricht einer Verkleinerung und über 1 einer Vergrößerung der Volumina der Tumore zum Anfangswert (Tag 10). Im t-Test konnten keine signifikanten Änderungen des Tumorumfangs benannt werden.

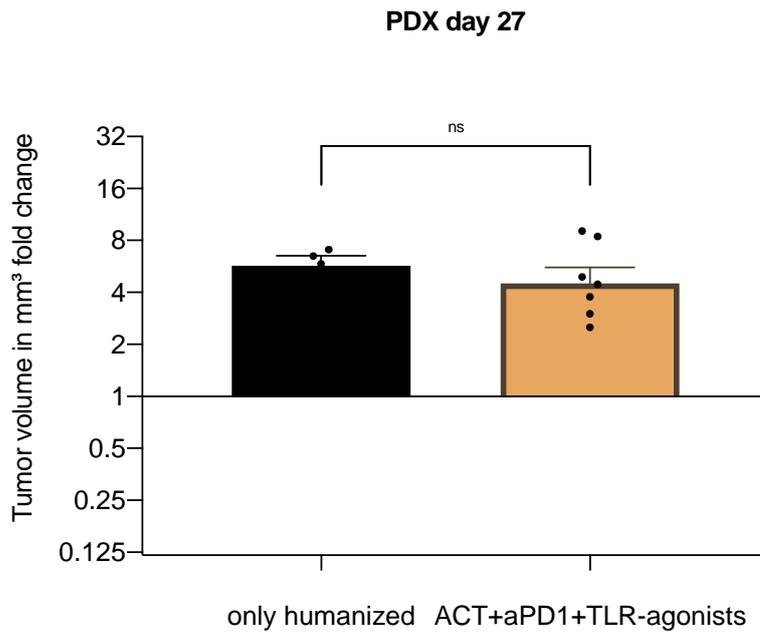


Abbildung 19: Tumorvolumina des PDX-Modells an Tag 24 im Vergleich zur Kontrollgruppe

In der Abbildung ist das Tumorvolumen in *fold change* der Triple-Kombinationstherapie Gruppe und der Kontrollgruppe an Tag 27 nach PDX Implantation dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Tumorvolumina im t-Test.

Genanalyse des Primärtumors und der PDX Tumore

Der Primärtumor und die Tumore der ersten beiden PDX Generationen wurden von der Pathologie mit einer Genanalyse untersucht. Im Tumor des Patienten konnte eine Mutation im PTEN und im TP 53 Gen nachgewiesen werden. Die Allelfrequenzen waren hier im Vergleich zu denen der PDX Tumore etwas niedriger, jedoch konnten die gleichen Mutationen wie im Primärtumor bestätigt werden. Bei allen anderen untersuchten Genen wurde ein Wildtyp festgestellt mit keinen pathologischen Wert.

Tabelle 11 listet die Genanalyse des Primärtumors von Patient 1 und den ersten beiden Generationen im PDX auf

Tabelle 11: Genanalyse des Primärtumors und der PDX Tumore des untersuchten PDX Models

	Gen	Exon Sequenced	Mutational Status	Allel frequency %
Patient 1	PTEN	1-8	EX5: c.389delG p.R130Qfs*4	57,11
	TP53	4 (Codon 97- 125), 5,6,7,8	EX5: c.490A>T p.K164*	45,59
PDX 1.1	PTEN	1-8	EX5: c.389delG p.R130Qfs*4	99,11
	TP53	4 (Codon 97- 125), 5,6,7,8	EX5: c.490A>T p.K164*	83,92
PDX 1.2	PTEN	1-8	EX5: c.389delG p.R130Qfs*4	97,07
	TP53	4 (Codon 97- 125), 5,6,7,8	EX5: c.490A>T p.K164*	72,79

3.5.4. Triple Kombinationstherapie führt auch im murinen syngenem Mausmodell zu einer Regression der Tumorumfänge

Nachdem sich die Triple-Kombinationstherapie bereits im humanisierten und im autologen PDX-Modell als die effektivste Therapie erwiesen hatte, wurde diese Therapie nun in einem syngenem murinen Mausmodell getestet. In diesem Modell ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen komplett autolog (Kap. 1.4.).

Im syngenem Mausmodell zeigte sich auch ein signifikant verringertes Tumorumfang bei den Tumoren, die mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tumore wurden hier ebenfalls an Tag 0 injiziert durch s.c. Applikation der Tumorzellen (Abb. 6). Bereits an Tag 13, 3 Tage nach Beginn der Therapie konnte eine signifikante Änderung im Tumorumfang zugunsten der Triple-Kombinationstherapie beschrieben werden (Abb. 20). Dieser Trend setzte sich bis zu Tag 24 fort (Abb. 24). Die Tiere der Kontrollgruppe und der Monotherapiegruppen mussten an Tag 24 aus dem Versuch genommen werden, da sie bereits an diesem Tag ein ethisch nicht mehr vertretbares Tumorumfang aufwiesen. Die Tiere der Triple-Kombinationstherapie Gruppe konnten 7 Tage

länger im Versuch belassen werden und wurden an Tag 31 aus dem Versuch genommen. An Tag 24 zeigte sich eine signifikante Verkleinerung der Tumore der Triple-Kombinationstherapie Gruppe im Vergleich zu Tag 10 und spricht somit für eine Remission dieser Tumore in der Triple-Kombinationsgruppe.

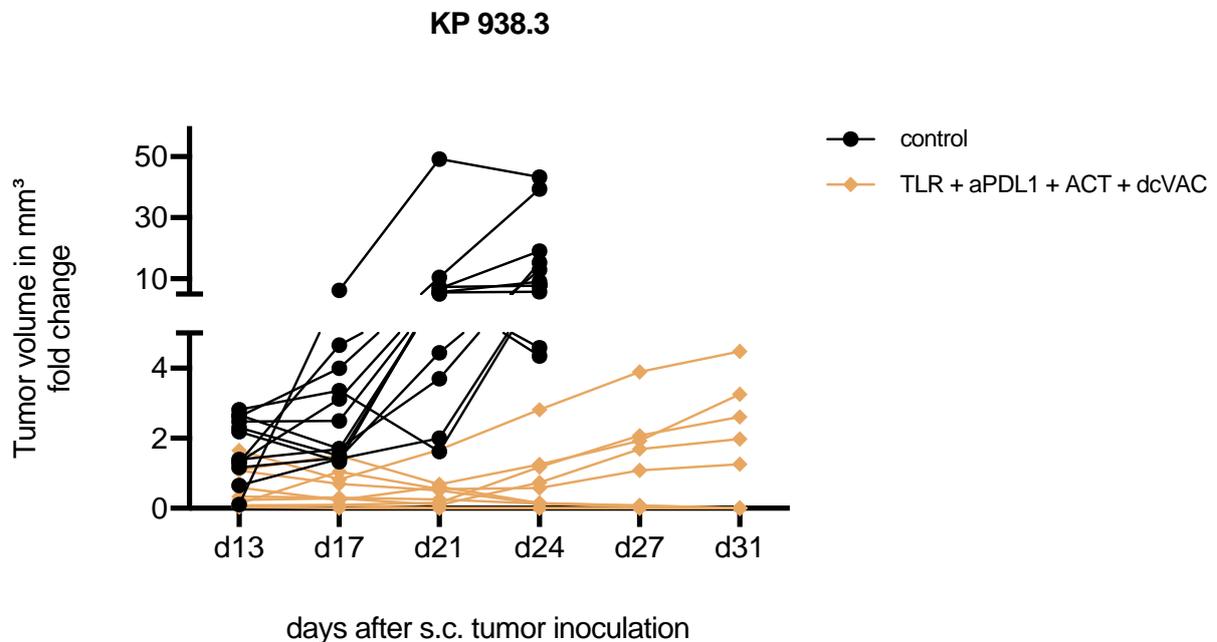


Abbildung 20: Darstellung der signifikanten Verkleinerung der Tumorumina im syngenem Mausmodell unter der Triple Kombinationstherapie

In der Abbildung ist der Tumorumin Verlauf der Einzeltumore im Verlauf des Versuchs der Kontrollgruppe (n=12) und der Triple-Kombinationstherapie Gruppe (n=19) dargestellt. Das Tumorumin ist in *fold change* dargestellt.

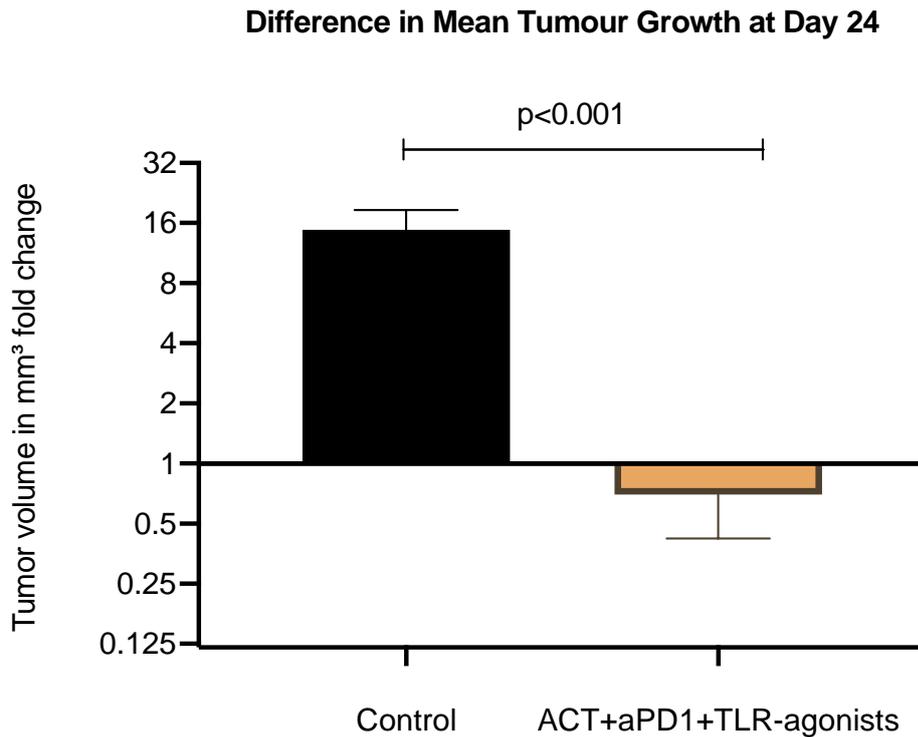


Abbildung 21: Darstellung der signifikant verringerten Tumorumfängen des syngenesischen Mausmodells am Tag 24 unter Triple-Kombinationstherapie

Dargestellt ist das Tumorumfang der Tumore aus der Kontrollgruppe und der Triple-Kombinationstherapie Gruppe am Tag 24 nach Tumoreinjektion. Es wird der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Verringerung der Tumorumfänge der Triple-Kombinationstherapie Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (***) $p < 0,001$.

3.6 Immuneinfiltrationen der *in-vivo* Tumore

In mehreren Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, dass die Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Tumoreimmuntherapie an stetiger Bedeutung gewinnt, da ihre Infiltration in soliden Tumoren mit einem besseren Outcome assoziiert wird (Abb. 5) [68]. Die Anwesenheit von $\gamma\delta$ -T-Zellen in soliden Tumoren wird als der positivste prognostische Marker in einigen Arbeiten betitelt und korreliert mit ihrer Fähigkeit Tumorzellen zu eliminieren [68]. Die Tumore, die in dieser Arbeit untersuchten Therapiegruppen wurden daher gezielt auf eine Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht. Auch eine Infiltration mit CD8+, CD4+, und NK-Zellen zeigte in von Patienten untersuchten Tumoren ebenfalls ein günstigeres Outcome verglichen mit anderen Immunezellpopulationen [13], [68] und wurden daher in der Untersuchung der infiltrierenden Immunezellen dieser Arbeit fokussiert.

Die Infiltration der Immunezellen wurden mit der Durchflusszytometrie und der Immunhistologie untersucht. In den nachfolgenden Ergebnissen werden die prominentesten Ergebnisse dargestellt und gegenübergestellt. Da es von großer Bedeutung ist, die Infiltrationen mit dem

Tumorwachstum in Verbindung zu bringen, werden im Folgenden die Infiltrationen der Kontrollgruppen mit den Infiltrationen der Therapien verglichen, die einen signifikanten negativen Einfluss auf das Tumorwachstum hatten. Bei allen oben beschriebenen Modellen war diese Therapie die Triple-Kombinationstherapie (Abb. 12,14,16,19 und 21). Im humanisierten Model und PDX-Model wurden humanen Antikörper und im syngenen KP-Model murine Antikörper verwendet zur Detektion der Immunzellen (Tabelle 8). In allen Modellen imponierte eine erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen in den Tumoren, die mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden und korrelierte mit einem verringerten Tumorwachstum in den oben beschriebenen Mausmodellen.

3.6.1. Triple Kombinationstherapie führt zu einer erhöhten Immunzellinfiltration in den Tumoren

Infiltrationen in den humanisierten Mausmodellen

Zelllinie H1975

Die Tumore der Mäuse wurden am 24. Tag nach Injektion aus den Mäusen entnommen und für die Durchflusszytometrie vorbereitet, indem sie durch einen *Cell-strainer* gegeben wurden und mit humanen Antikörpern gefärbt wurden. In der Untersuchung der Durchflusszytometrie zeigte sich eine signifikant erhöhte Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen in der Triple-Kombinationstherapie Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Therapie erhalten hat (Abb.22). Auch die Monotherapie mit ACT zeigte eine signifikante Erhöhung in der Tumordinfiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es konnte auch eine erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen in den Tumoren der Triple-Kombinationstherapie beschrieben werden (Abb. 22). Hier war diese Infiltration in den Tumoren der Triple-Kombinationsgruppe ausgeprägter im Vergleich zu allen anderen Therapiegruppen.

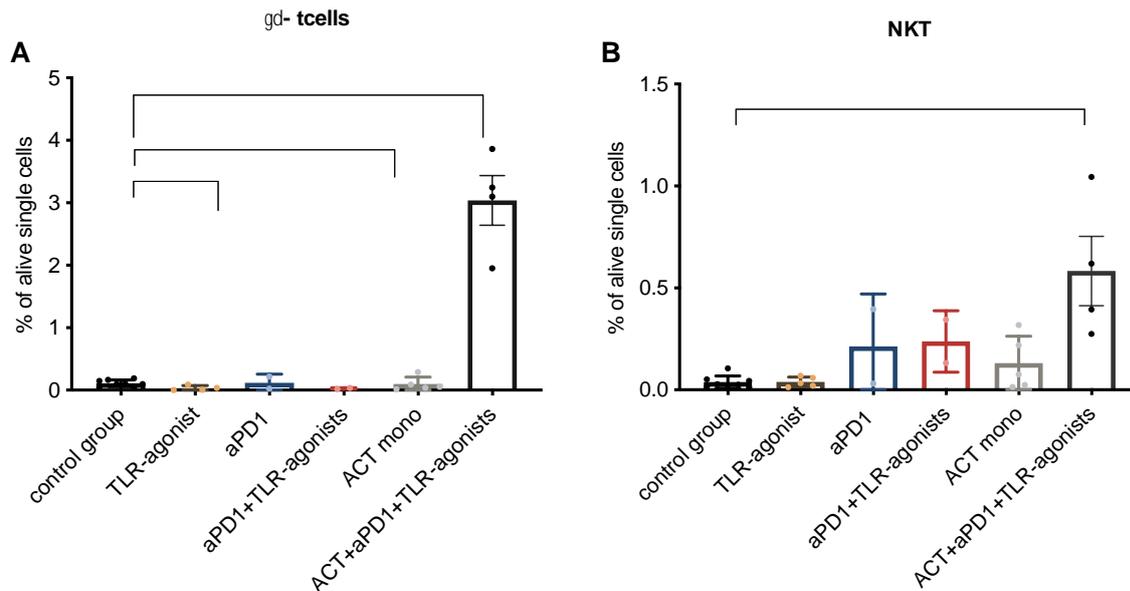


Abbildung 22: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im H1975 Model unter den Immuntherapiekombinationen

In der Abbildung sind die Infiltrationen der H1975 Tumore mit **A** $\gamma\delta$ -T-Zellen und **B** NKT-Zellen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. Es wurde die Kontrollgruppe (n=8) gegen die folgenden Therapiegruppen verglichen: TLR-Agonisten (n=5), aPD1-Antikörper (n=2), aPD1-Antikörper und TLR-Agonisten Kombinationstherapie (n=2), ACT Monotherapie (n=5) und die Triple-Kombinationstherapie (n=4). Die Tumore wurden durch einen *Cell-Strainer* gedrückt und mehrfach gewaschen bevor sie für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie Daten erfolgte mit Kaluza, Exel und Prism. Es ist der prozentuale Anteil der NKT-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellen an allen lebenden single Zellen in den Tumoren dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; ;*** p < 0,001, **** p < 0,0001). Bei allen nicht markierten Gruppen konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden.

Zelllinie H441

In den H441 Tumoren imponierte wie auch bei den H1975 Tumoren eine erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen, die mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden und damit, wie oben beschrieben, ein signifikant geringeres Tumorumfugen an Tag 24 aufwiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14 und 23). Ein signifikanter Unterschied in der Infiltration zur Kontrollgruppe konnte auch bei der $\gamma\delta$ -T-Zellepopulation der ACT Monotherapie Tumore gezeigt werden (Abb. 23). Die CD3+ T-Zellpopulationen zeigten sich auch in der Triple-Kombinationstherapie und ACT-Monotherapie Tumore signifikant erhöht, sowie die CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen (Abb. 23).

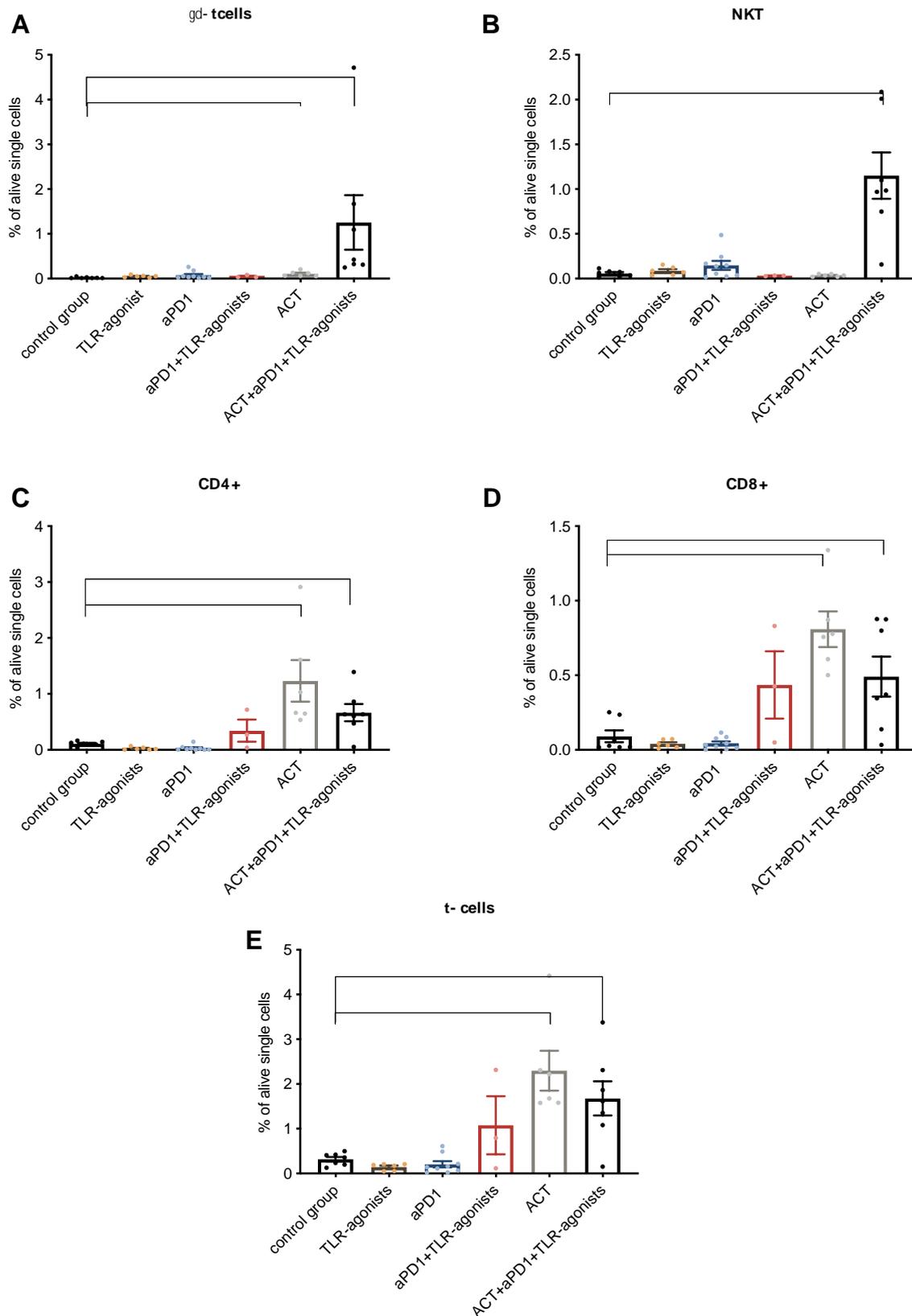


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellinfiltrationen der H441 Tumore

In der Abbildung sind die Infiltrationen der H1975 Tumore mit **A** $\gamma\delta$ -T-Zellen, **B** NKT-Zellen, **C** CD4+ T-Zellen, **D** CD8+ T-Zellen und **E** CD3+ T-Zellen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. Es wird die Kontrollgruppe (n=8) gegen die folgenden

Therapiegruppen verglichen: TLR-Agonisten (n=5), aPD1-Antikörper (n=2), aPD1-Antikörper und TLR-Agonisten Kombinationstherapie (n=2) und die Triple-Kombinationstherapie (n=4). Die Tumore wurden durch einen *Cell-Strainer* gedrückt und mehrfach gewaschen bevor sie für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie Daten erfolgte mit Kaluza, Exel und Prism. Es ist der prozentuale Anteil der Immunzellpopulationen an allen lebenden single Zellen in den Tumoren dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; ;*** p < 0,001, **** p < 0,0001). Bei allen nicht markierten Gruppen konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden.

Die Immuninfiltrationen der H441 Tumore wurde neben der Durchflusszytologie auch mit der immunhistologischen Methode untersucht. In Abbildung 24 ist exemplarisch ein Tumor der Kontrollgruppe und ein Tumor der Triple-Kombinationstherapie Gruppe dargestellt. Auch hier zeigt sich eine erhöhte Infiltration an Immunzellen, die CD3,CD4 und CD8 positiv waren. Eine niedrigerer Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in der Triple-Kombinationstherapie Gruppe deutet auf ein langsames Wachstum hin, welches in den oben beschriebenen Kurven zum Tumorwachstum bestätigt wurde (Abb. 14). Es konnten zusammenfassend bei den H441 Tumoren durch die Durchflusszytometrie und die Immunhistologie eine signifikant erhöhte Infiltration von $\gamma\delta$ -T-Zellen, NKT-Zellen und CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen in den Tumoren der Triple-Kombinationstherapie nachgewiesen werden (Abb. 23 und 24).

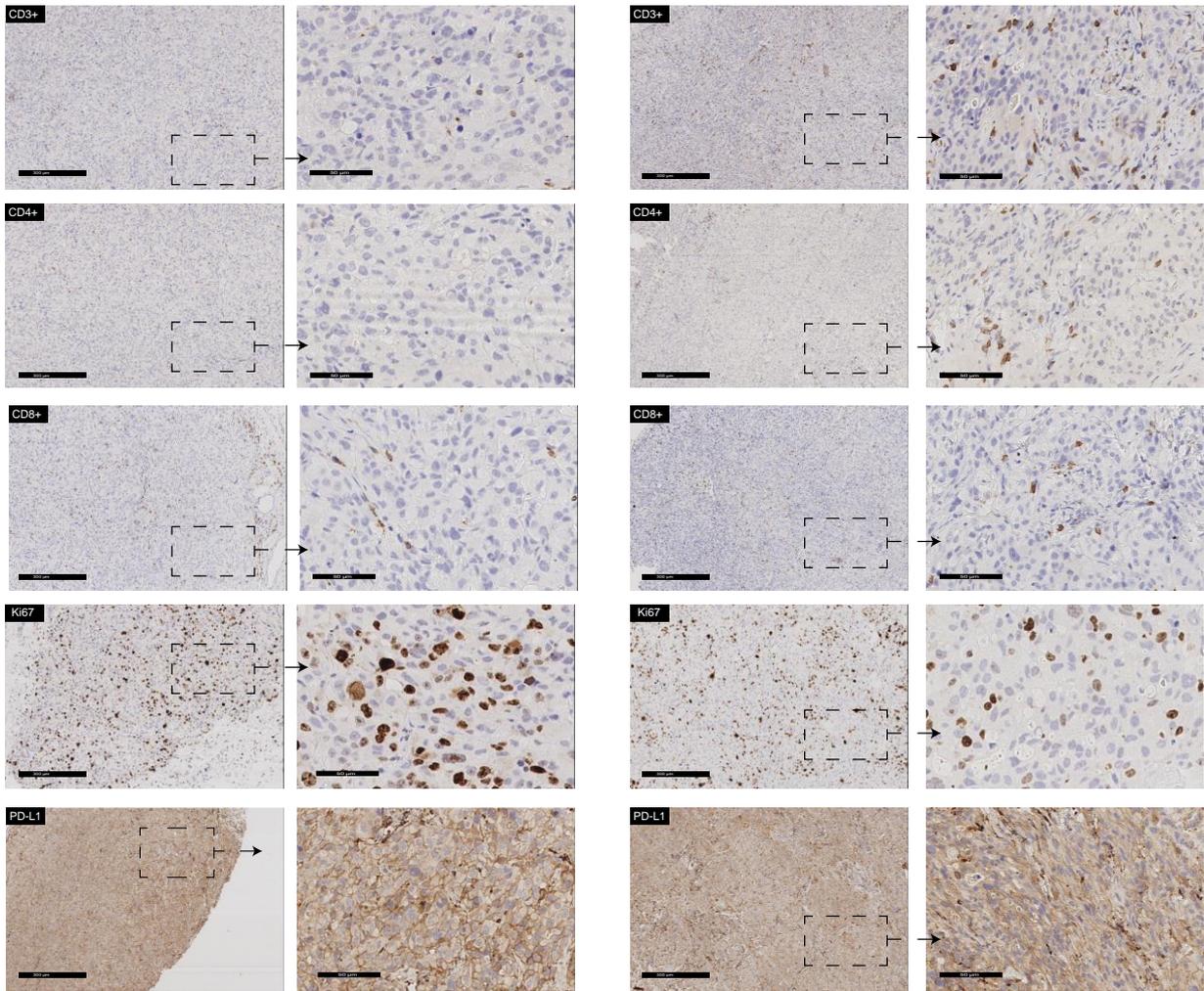


Abbildung 24: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der H441 Tumore unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe

In der Abbildung ist die immunhistologische Untersuchung der H441 Tumore aus **A** der Kontrollgruppe (nur humanisiert) und **B** der Triple Kombinationsgruppe exemplarisch dargestellt. Es werden jeweils die Vergrößerungen 8x (Maßstab 300 µm) und daraus vergrößert mit dem Vergrößerungskasten 40-fach (Maßstab) 50 µm dargestellt. Es wurde mit humanen Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, Ki-67 und PDL-1 gefärbt. Es zeigte sich eine deutliche Infiltration mit humanen CD3+, CD4+ und CD8+ Immunzellen in dem Tumor der mit der Triple Kombinationstherapie behandelt wurde. Die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 Expression ist im Tumor der Kontrollgruppe höher.

Zelllinie JimT1

Die JimT1 Tumore wurden ebenfalls bezüglich der Immuninfiltration untersucht und es bestätigte sich, wie in den oben beschriebenen Infiltrationen, eine erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Triple-Kombinationstherapie Gruppe (Abb. 25). Die Erhöhung ist bei beiden Populationen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 25). Es zeigte sich in der TLR-Monotherapie Gruppe ein Trend, der auf eine höherer Infiltration mit NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen hindeutete. In der aPD1-Antikörper und TLR-Agonisten Kombinationstherapie Gruppe zeigte sich dann eine signifikante Erhöhung der Infiltration jener Populationen in den Tumoren (Abb. 25). In der ACT Monotherapiegruppe zeigte sich in den Wachstumskurven ein stark progressiven Wachstum (Abb. 13). Die in Abbildung 25 gezeigten Infiltrationen beschreiben eine niedrigere Infiltration der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der NKT-Zellen in das Tumorgewebe in der ACT Monotherapiegruppe als in der Kontrollgruppe.

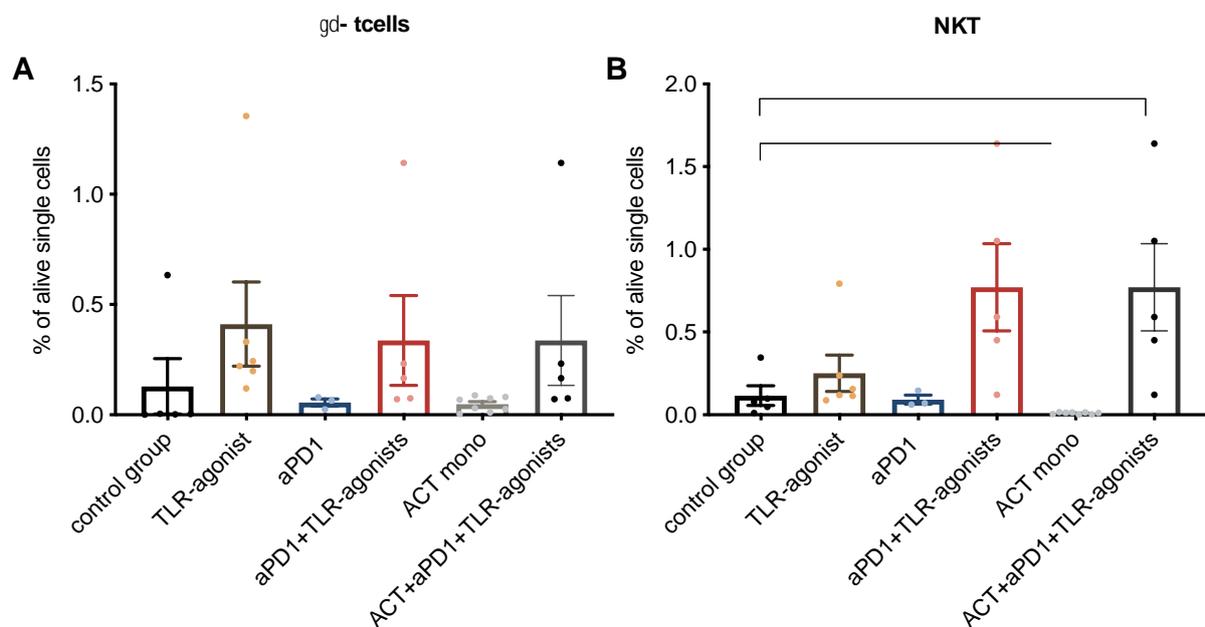


Abbildung 25: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im JimT1 Model unter den Immuntherapiekombinationen

In der Abbildung sind die Infiltrationen der JimT1 Tumore mit **A** $\gamma\delta$ -T-Zellen und **B** NKT-Zellen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. Es wurde die Kontrollgruppe (n=5) gegen die folgenden Therapiegruppen verglichen: TLR-Agonisten (n=6), aPD1-Antikörper (n=3), aPD1-Antikörper und TLR-Agonisten Kombinationstherapie (n=5), ACT Monotherapie (n=8) und die Triple-Kombinationstherapie (n=5). Die Tumore wurden durch einen *Cell-Strainer* gedrückt und mehrfach gewaschen bevor sie für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie Daten erfolgte mit Kaluza, Excel und Prism. Es ist der prozentuale Anteil der NKT-Zellen und der $\gamma\delta$ -T-Zellen an allen lebenden single Zellen in den Tumoren dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, **** p < 0,0001). Bei allen nicht markierten Gruppen konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden.

Infiltrationen der Tumore im syngenem murinen Mausmodell

Die Tumore des syngenem murinen Mausmodells wurden mittels Durchflusszytometrie und der Immunhistochemie auf infiltrierende Immunzellen untersucht. In Abbildung 26 sind die Infiltration der Immunzellen der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Monotherapien und der Triple Kombinationstherapie dargestellt, die mittels der Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass die Infiltration mit T-Zellen (CD3+) in den Tumoren der Triple Kombinationstherapie signifikant erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch die Infiltrationen der NKT-Zellen. In Abbildung 27 sind zusätzlich sind die Infiltrationen mit CD3, CD4 und CD8 positiven Immunzellen der Kontrollgruppe im Vergleich zur Triple Kombinationsgruppe dargestellt. Hier ist erkennbar, dass in den Tumoren der Triple Kombinationstherapie eine deutlich höhere Infiltration mit diesen Immunzellen vorhanden ist als in der Kontrollgruppe. In der Durchflusszytometrie konnte ebenfalls eine erhöhte Infiltration mit CD3, CD4 und CD8 positiven Immunzellen gezeigt werden, jedoch nur mit einer Signifikanz in der CD3+ Subgruppe.

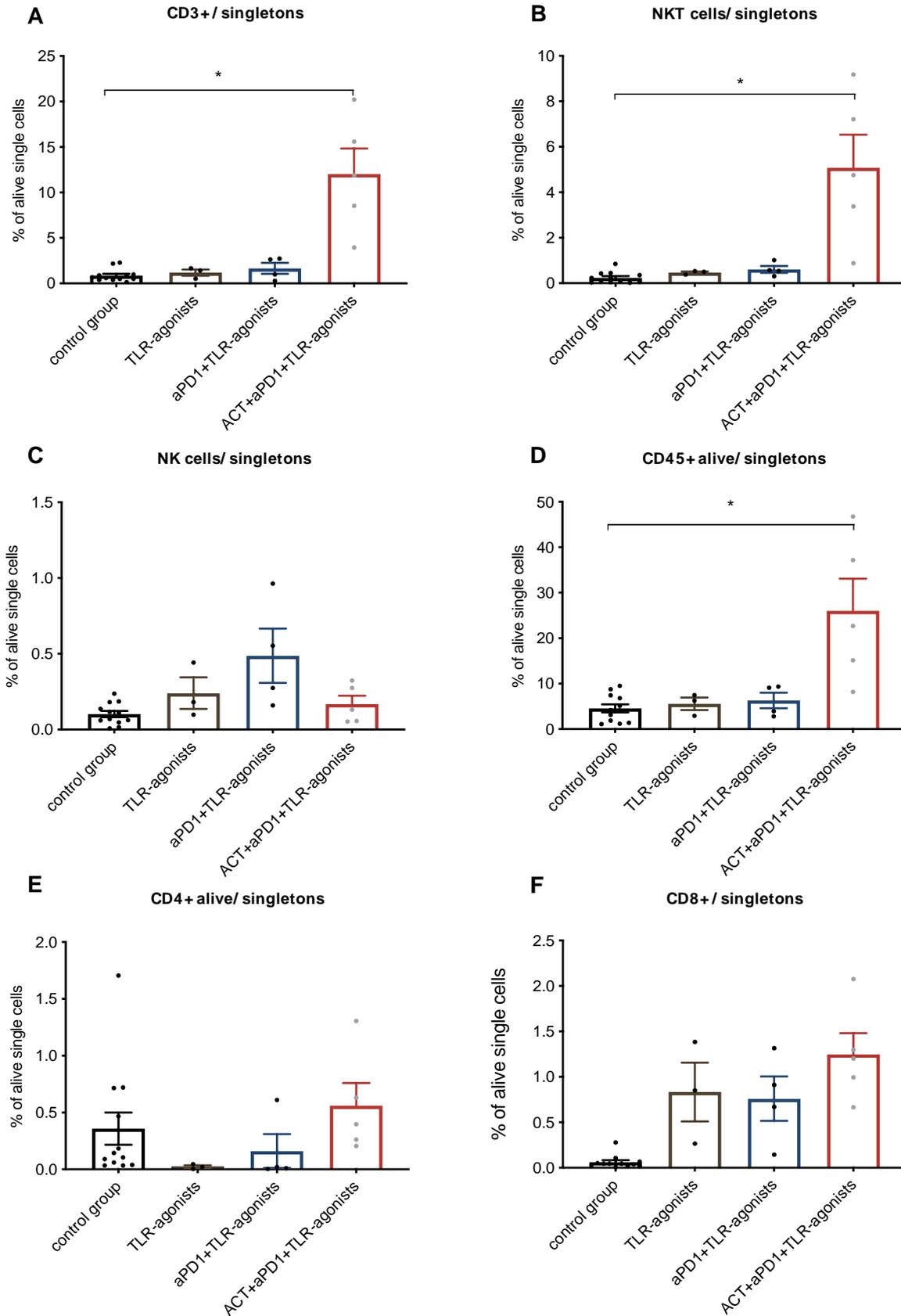


Abbildung 26: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im syngenem Mausmodell unter den Immuntherapiekombinationen

In der Abbildung sind die Infiltrationen der KP938.3 Tumore im syngenem murinen Mausmodell mit **A** T-Zellen (CD3+), **B** NKT-Zellen, **C** NK-Zellen, **D** CD 45+ Zellen, **E** CD 4+ T-Zellen und **F** CD8+ T-Zellen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. Es wurde die Kontrollgruppe (n=12) gegen die folgenden Therapiegruppen verglichen: TLR-Agonisten (n=5, aPD1-Antikörper und TLR-Agonisten Kombinationstherapie (n=4) und die Triple-Kombinationstherapie (n=5). Die Tumore wurden durch einen *Cell-Strainer* gedrückt und mehrfach gewaschen bevor sie für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie Daten erfolgte mit Kaluza, Exel und Prism. Es ist der prozentuale Anteil der NKT-Zellen, NK-Zellen, CD3+, CD4+, CD8+ und der CD45+ Zellen an allen lebenden single Zellen in den Tumoren dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; ;*** p < 0,001, **** p < 0,0001). Bei allen nicht markierten Gruppen konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden.

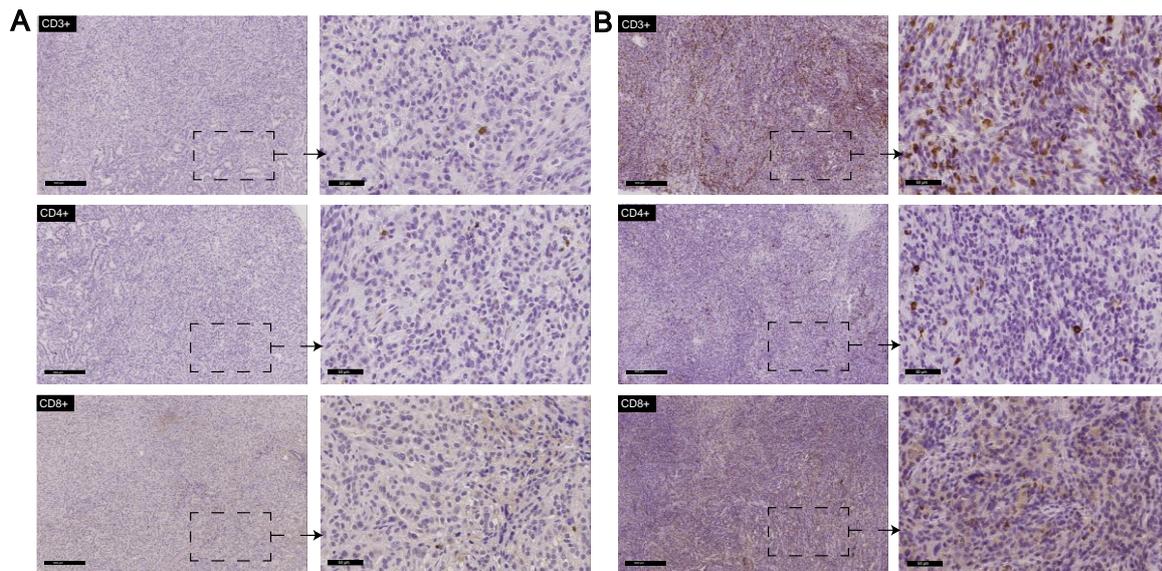


Abbildung 27: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der Tumore des syngen Mausmodells unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe

In der Abbildung ist exemplarisch eine immunhistologische Untersuchung von einem A Tumor der Kontroll Gruppe und B einem Tumor der Triple Kombinationstherapie Gruppe mit CD3, CD4 und CD8 Antikörper Färbung dargestellt. Die linke Abbildung hat einen Maßstab von 200 µm. Aus der linken Abbildung wurde eine Vergrößerung mit einem Maßstab von 50 µm angefertigt und ist rechts neben dem 200 µm Maßstab dargestellt.

Infiltrationen der Tumore im PDX-Model

Auch in diesem Model wurden die Infiltrationen mit Immunzellen in den Tumore mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 28). Es zeigte sich eine erhöhte Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Triple Kombinationstherapie Gruppe. Die Mittelwerte der NK-Zellen und NKT-Zellen lagen auch über den Mittelwerten der Kontrollgruppe. Der Mittelwert für die $\gamma\delta$ -T-Zellen lag bei der Kontrollgruppe bei 0.014 % und bei der Triple-Kombinationsgruppe bei 0,095 % und deutet damit auf eine höhere Dichte dieser Zellen in den Tumoren hin. Diese Erhöhung der Mittelwerte erwies sich in keiner Subpopulation als signifikant, es ist jedoch ein Trend zu erkennen zugunsten der Triple-Kombinationstherapie (Abb. 28).

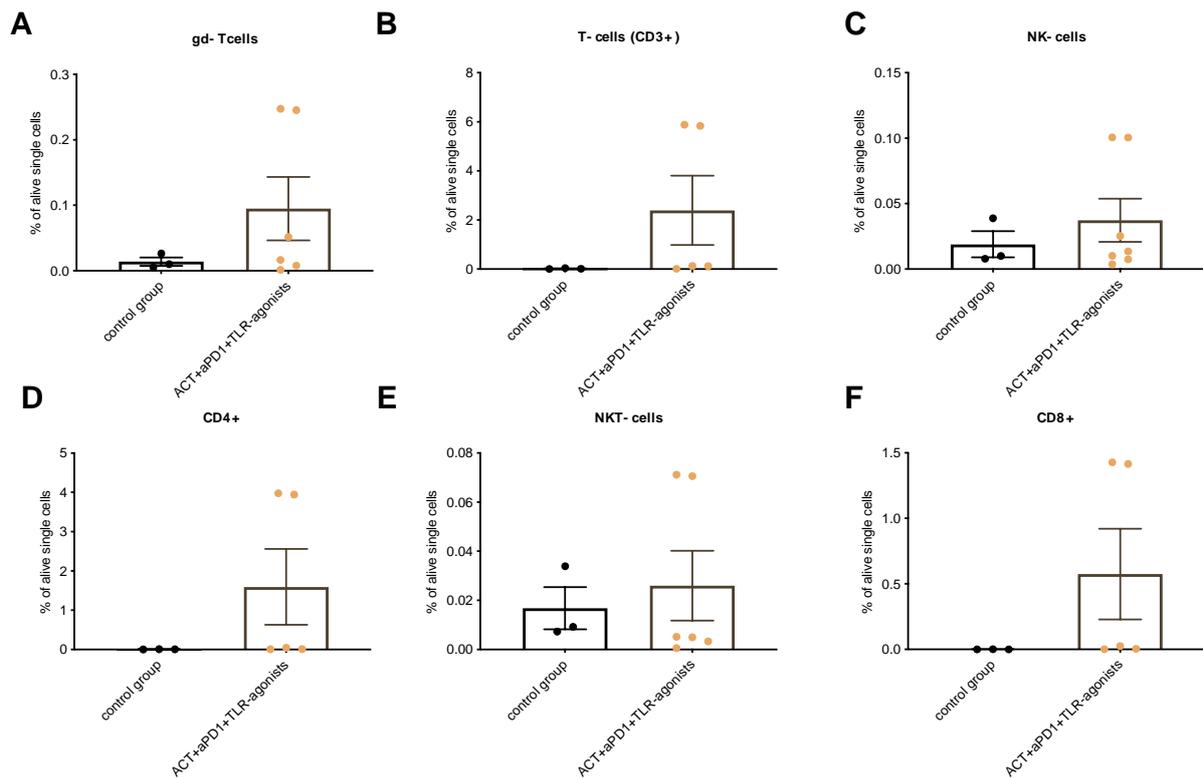


Abbildung 28: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der Tumore des syngenesischen Mausmodells unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe

In der Abbildung sind die Infiltrationen der PDX Tumore mit **A** $\gamma\delta$ -T-Zellen, **B** T-Zellen, **C** NK-Zellen, **D** CD4+ T-Zellen, **E** NKT-Zellen und **F** CD8+ T-Zellen in der Kontrollgruppe und der Triple-Kombinationstherapie dargestellt. Es wurde die Kontrollgruppe (n=4) gegen die Triple-Kombinationstherapie (n=7) verglichen. Die Tumore wurden durch einen *Cell-Strainer* gedrückt und mehrfach gewaschen bevor sie für die Durchflusszytometrie gefärbt wurden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie Daten erfolgte mit Kaluza, Exel und Prism. Es ist der prozentuale Anteil der Zellpopulationen an allen lebenden single Zellen in den Tumoren dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem T-Test, es konnte jedoch keine signifikante Änderung gezeigt werden.

4. Diskussion

4.1 Humanisiertes Mausmodell und PDX Modell zur Imitation des humanen Immunsystems und deren präklinische Relevanz

Damit Immuntherapien in einem auf den Menschen übertragbaren *Setting* getestet und moduliert werden können, ist die Etablierung eines funktionierenden humanisierten Mausmodells von großer Bedeutung. In den oben beschriebenen Versuchen wurde ein humanisiertes Mausmodell verwendet und in Abbildung 10 exemplarisch die Infiltration der Milz einer humanisierten Maus mit CD3+, CD4+ und CD8+ Immunzellen dargestellt, um eine erfolgreiche *Engraftment* zu belegen. Es konnte gezeigt werden, dass in den Versuchen durch die Applikation humaner PBMC's durch eine i.p. Injektion in den NSG Mäusen eine Anreicherung mit humanen Immunzellen erfolgte (Abb. 10). Die Milz in Abbildung 10 wurde vom Institut der Pathologie mit Antikörpern gefärbt, die gegen Proteine gerichtet sind, gefärbt, welche auch für ihre Routinefärbungen von Patientenmaterial benutzt werden. Somit wird die erfolgreiche Etablierung des humanisierten Mausmodells bestätigt. Auch die Untersuchung der Tumore und der Milzen der therapierten Mäuse im humanisierten Mausmodell (Abb. 23-25) zeigten Infiltrationen mit humanen Immunzellen. Alle verwendeten Antikörper für das humanisierte Modell und das PDX Modell waren humane Antikörper, die ausschließlich humane Strukturen erkennen.

Bei der Bewertung des humanisierten Mausmodells und deren Übertragbarkeit für klinische Studien müssen einige Einschränkungen beachtet werden. Die Tumorzellen entstammten zwar von humanen Zelllinien, die initial aus humanem Gewebe gewonnen wurden, jedoch spiegeln diese die genetische Heterogenität, die in den meisten realen Tumoren beobachtet wird, nur begrenzt wieder. Auch das reale *Tumormicroenvironment* ist in diesem Modell nur schwierig imitierbar, da die Tumorzellen ohne inhibierende oder induzierende Wachstumsfaktoren aus dem Stroma wachsen können. Diese zwei Faktoren sind jedoch klinisch maßgeblich zu berücksichtigen, wenn progredientes Tumorstadium und Therapieresistenzen unter Immuntherapien beobachtet werden [119].

Ein weiterer limitierender Faktor bezüglich der Übertragbarkeit stellt das nicht autologe Setting durch Applikation von Spender PBMC's dar. Es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass das Immunsystem von Beginn der Tumorgenese eine modulierende Funktion hat [120]. So ist es beispielsweise in der Lage beginnende mutierende Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Daher wird davon ausgegangen, dass solide Tumore, die progredient wachsen, diese Funktion des Immunsystems ausgeschaltet haben und ihr entkommen können [12].

Dieser wichtige Faktor der Tumorgenese und deren Auswirkung auf das Immunsystem, kann in einem nicht autologen Mausmodell nicht präzise genug nachgestellt werden. Dennoch dient das humanisierte Mausmodell als ein präklinisches Modell, indem erste Ansätze für neue Therapien untersucht werden können und stellte seinen Wert beispielsweise bei der präklinischen Testung der anti-PD-1 Antikörper und Etablierung der Therapie unter Beweis [121].

Als eine Weiterentwicklung zu dem hier erfolgreich etablierten humanisierten Mausmodell kann daher das PDX Modell gesehen werden, da in diesem sowohl die PBMC's als auch die Tumorfragmente von den gleichen Patienten stammen und somit ein autologes Setting bieten. Ein weiterer Vorteil bei der Transplantation von Primärtumoren ist das mit übertragene *Tumormicroenvironment*, bestehend aus Fibroblasten, Immunzellen, Endothelzellen und deren sekretierte Zytokine und Wachstumsfaktoren [122], [123]. All diese Zellen und Botenstoffen können einen positiven oder negativen Einfluss auf das Tumorwachstum, das Metastasierungsmuster und das Therapieansprechen haben [122], [123]. Da Immuntherapien die Komponenten des *Tumormicroenvironment* beeinflussen und ihren antitumoralen Effekt oft dort erzielen, ist die Übertragung dieses nützlich [124].

Da das Primärmaterial in den meisten PDX Modellen begrenzt ist, musste auch bei unserem PDX Modell eine kleine Änderung in der Methodik zur Humanisierung erfolgen. Es wurden weniger PBMC's zur Humanisierung appliziert als in den anderen humanisierten Modellen, was jedoch in den durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf das *Engraftment* des Immunsystems zeigte (Abb. 29). Die Milzen der untersuchten Mäuse zeigten trotz der geringeren PBMC Anzahl eine ausgeprägte Infiltration mit bis zu 30% humanen CD45+ Immunzellen (Abb. 29). Der Primärtumor des Patienten und die ersten beiden Generationen der PDX Tumore wurden in den von der Pathologie durchgeführten Genanalysen als homolog identifiziert (Tabelle 9). Es bestätigte sich damit die Beobachtung von anderen Forschungsgruppen, die eine gute Übertragbarkeit bezüglich der genetischen Eigenschaften, Histologie und Metastasierung von Primärtumoren auf PDX Tumoren beschrieben haben [125], [126]. Anderen Studien beschreiben, dass die humanen Zellen bereits nach der zweiten Generation durch murine Zellen in PDX Modellen ersetzt werden [127]. Diese Beobachtung konnte in unserem PDX Modell widerlegt werden (Tabelle 9).

Trotz der erfolgreichen Etablierung der beiden humanisierten Mausmodelle, gibt es einige Punkte, die bei der Übertragbarkeit auf den Menschen und bei der Durchführung von Experimenten in diesem Modell weiterführend beachtet werden müssen. Die Humanisierung mittels PBMC's führt zwar zu einem ausgeprägten *Engraftment* von Immunzellen in den Mäuse, jedoch nimmt ca. 4-6 Wochen nach Injektion der PBMC's die Anzahl an vitalen Zellen ab und grenzt daher die Anwendung dieses Modells bei länger angelegten Studien ein [128].

Da die Injektion von PBMC's in NSG Mäuse eine GvHD hervorrufen und damit den Versuchszeitraum einschränken kann, kann alternativ eine Humanisierung mit CD34+ humanen Stammzellen durchgeführt werden [128]. Diese führt zu einem langanhaltenden *Engraftment* der humanen Zellen in den NSG-Mäusen und dient insbesondere in PDX Modellen, an denen über einen längeren Zeitraum Therapien getestet werden, als Methode der Wahl ohne eine GvHD hervorzurufen [129]. Die hier beschriebenen Versuche wurden durch das progressive Wachstum der subkutanen Tumore in den Kontrollgruppen maximal 27 Tage nach Injektion abgebrochen und die untersuchten Mäuse zeigten zu diesem Zeitpunkt noch eine hohes *Engraftment* (Abb. 10 und 29) an humanen Immunzellen in den Milzen und eine *graft-versus-host* Erkrankung wurde innerhalb der Versuchszeitraums nur zweimal unter allen humanisierten Mäusen beobachtet. Daher spielten diese Einschränkungen in den hier beschriebenen Versuchen keine Rolle. Um jedoch eine stabile klinische Übertragbarkeit zu erzielen, sollten Therapien über einen möglichst langen Zeitraum observiert und bewertet werden. Daher könnte als nächster Schritt eine Humanisierung mit CD34+ Stammzellen in den PDX Modellen erfolgen, damit die Überlegenheit der Triple-Kombinationstherapie über einen längeren Zeitraum observiert und bestätigt werden kann.

Die Übertragbarkeit von präklinisch getesteten Therapien im PDX Modellen auf Patienten wurde bereits in einigen Studien positiv bewertet. Es wurden beispielweise in einer Studie PDX Modelle von Patienten etabliert und mögliche Therapieoptionen (Chemotherapien, BRAF-Inhibitoren, VEGFR-Inhibitoren, EGFR-Antikörper und co.) für diese Patienten hinsichtlich eines Ansprechens getestet. 12 von 14 Patienten erhielten die Therapie, die in ihrem PDX zu einer Teilremission geführt hatten und es konnte eine starke Korrelation zwischen Therapie Outcome im PDX und in den Patienten beschrieben werden [130]. Eine solche vorklinische Testung der personalisierten Therapien im PDX Model ist jedoch aktuell noch durch das *Engraftment* der Tumore, der Zeit, die es braucht bis die Tumore anwachsen und der limitierten Verfügbarkeit an Primärmaterial begrenzt und kann daher zukünftig nicht für jeden Patienten zur Verfügung stehen. Dennoch deutet die aktuelle Studienlage daraufhin, dass PDX Modelle zur Identifizierung von Therapien zukünftig von großer Bedeutung sein werden, da die Weiterentwicklungen der Immuntherapien eine komplexe präklinische Untersuchung aller Immunkomponenten verlangt.

4.2 Therapieerfolg Kombinationstherapie aus ACT, TLR-Agonisten und aPD-1 Antikörpern und deren Übertragbarkeit in die Klinik

Die Triple-Kombinationstherapie bestehend aus der ACT, TLR-Agonisten und aPD-1-Antikörpern zeigte in den durchgeführten in vivo Versuchen in allen Modellen eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums (Abb. 11-17). In den humanisierten Modellen mit den Tumorzelllinien H1975, H441 und JimT1 konnte eine signifikante Tumorremission an Tag 24 festgestellt werden und zeigte damit eine Verkleinerung der Tumore im Vergleich zum Therapiebeginn (Abb. 17). Sie war somit die einzige unter allen Kombinationstherapie und Monotherapien, die in allen Modellen eine Tumorregression hervorrufen konnte (Abb. 11-17). In den Kontrollgruppen dominierte bei allen drei Linien ein starker Progress mit einer Vergrößerung der Tumore um beispielsweise das 6-fache in den H441-Tumoren (Abb. 13). Auch im PDX-Model zeigten die Tumore der Triple-Kombinationsgruppe ein verringertes Volumen im Vergleich zur humanisierten Kontrollgruppe (Abb. 19). Die Versuche mussten hier gemäß dem versuchsspezifischen Scoresheet für genehmigungspflichtige Tierversuche spätestens am 27. Tag nach Injektion abgebrochen werden. Die weitere Entwicklung der Tumore unter der Triple-Kombinationstherapie wäre jedoch auch von Interesse gewesen. So konnte in den Versuchen zwar eine Verlangsamung im Wachstum gezeigt werden, jedoch kann keine Aussage über ein mögliches Rezidiv-Verhalten oder eine Metastasierung getroffen werden. Generell wuchsen die Tumore im humanisierten Mausmodell sehr schnell und es konnte selten eine frühe Metastasierung detektiert werden. Um auch im PDX Modell das Ansprechen der Triple-Kombinationstherapie besser evaluieren zu können, müssten diese Versuche über einen längeren Zeitraum unter Therapie beobachtet werden. Beispielsweise könnte bei den transplantierten PDX Tumoren bereits ab einem kleineren initialen Tumolvolumen mit der Therapie gestartet werden oder ein humanisiertes Mausmodell mit einem längeren Versuchszeitraum gewählt werden.

Das Ansprechen der H1975-Tumore auf eine Monotherapie und Kombinationstherapie aus TLR-Agonisten und aPD-1 Antikörper stellte sich hier als Einzelfall dar (Abb. 11). In anderen Arbeiten konnten ebenfalls ein Ansprechen der H1975 Tumore durch eine Checkpoint-Inhibition gezeigt werden und lässt daher vermuten, dass durch eine erhöhte PD-L1 Expression auf diesen Tumorzellen ein Ansprechen ermöglicht wird [51], [131]. Durch die zusätzliche lokale Gabe von TLR-Agonisten zeigte sich bei den H1975 Tumoren eine Remission im Tumolvolumen und deutet auf einen additiven Effekt der Agonisten hin (Abb. 11). In einigen Arbeiten konnte ebenfalls ein zusätzlicher Effekt der TLR-Agonisten, durch additive Aktivierung des lokalen angeborenen Immunsystems, zu einer aPD-1 Antikörper

Therapie beschrieben werden [22], [132]. Für den benutzen 9-TLR-Agonist ODN beschreibt eine Studie beispielsweise ein verbessertes Ansprechen einer Kombination mit einer Checkpoint-Inhibition bei B16-Melanomen im murinen Mausmodell, einhergehend mit einer stärkeren Infiltration an Immunzellen in den Tumoren [133]. In den durchgeführten Versuchen im humanisierten Mausmodell lässt sich diese Beobachtung bestätigen, da auch hier in allen drei Linien durch Kombinationstherapie aus TLR-Agonisten und aPD-1 Antikörpern ein geringeres Tumolvolumen messbar war als bei den Monotherapien mit aPD-1 (Abb. 11-16). TLR-Agonisten werden bisher klinisch nur bei Hautkrebs angewendet, da eine systemische Applikation zu schweren toxischen Krisen führen kann [81], [134]. Neue präklinische Arbeiten beschäftigen sich mit der Applikation von lokalen TLR-Agonisten bei Lungenkrebs durch eine Inhalation dieser, und zeigen in einer Kombination mit aPD-1-Antikörpern ebenfalls ein verbessertes Therapieansprechen und eine erhöhte Infiltration von Immunzellen in den Tumoren [135]. Daher ist die Übertragbarkeit der TLR-Agonisten als Adjuvant zu einer systematischen Checkpoint-Inhibition momentan noch nicht klinisch etablierbar, ist aber dennoch ein potenzieller Kombinationspartner zur Checkpoint-Inhibitoren-Therapie. Die ACT stellt hingegen eine mögliche Therapie dar, die klinisch leichter zu etablieren wäre, da sie systematisch appliziert wird. Die hier verwendete ACT setzte sich aus den vier Effektorzellen zusammen: LAK, CIK, gd-T-Zellen und CTL. Für die Proliferation der LAKs, CIKs und gd-T-Zellen werden naive T-Zellen von den Patienten benötigt, die klinisch leicht aus dem peripheren Blut zu isolieren sind. Für die CTLs hingegen sind Tumorzellen von den Patienten nötig, damit in vitro eine tumorspezifische Differenzierung erfolgen kann. Teilweise könnten solche Tumorzellen leicht durch eine im Zuge der Diagnostik durchgeführte Biopsie gewonnen werden, teilweise stehen Tumorzellen jedoch nicht zur Verfügung. Auch eine CAR-T-Zelltherapie, die bei soliden Tumoren angewendet werden soll, benötigt Tumorzellen, um den Rezeptor für die auf dem Tumor präsentierte Antigene, zu modulieren [52]. Für beide Therapien stellt damit die Gewinnung von Tumorzellen eine Herausforderung zur klinischen Etablierung dieser Therapien dar oder könnte die Anwendung auf einzelne Patientengruppe beschränken. Um die Triple-Kombinationstherapie noch weiter zu optimieren, wurde zu den hier beschriebenen Therapien eine initiale Lymphodepletion hinzugefügt und das Ansprechen erneut evaluiert (Borchmann et al. 2022..).

4.3 Syngenes Mausmodell bestätigt Therapieerfolg der Triple-Kombinationstherapie

Im syngenem Modell wurde die Triple-Kombinationstherapie mit der Kontrollgruppe verglichen. Es zeigte sich hier eine Tumorremission bei den Tumoren, die mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden, die als signifikant zu bewerten war (Abb. 20 und 21). Die Monotherapien mit dem aPD-1 Antikörper konnten im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinen positiven Einfluss auf das Tumolvolumen erzielen (Abb.). Die Tumore der Kontrollgruppe und der aPD-1 Monotherapiegruppe durchliefen ein sehr schnelles Wachstum und mussten daher an Tag 24 entnommen werden. Die Triple-Kombinationstherapie wurde daraufhin ebenfalls einige Tage später beendet um einen passenden Vergleich der Immunzellinfiltrationen zu ermöglichen.

So konnte zusammengefasst auch im syngenem Modell wie auch schon in den oben beschriebenen Modellen eine Remission der Tumore beobachtet werden, wenn diese mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden (Abb. 17 und 21). Neben dem PDX und dem gentechnisch veränderten Mausmodell ist das syngene Mausmodell das am häufigsten verwendete Modell in der onkologischen Therapieerforschung [113]. Bei dem hier benutzten Modell handelt es sich um ein autologes Setting, da sowohl Immunzellen als Tumorzellen aus dem gleichen Stamm hervorgehen. Das KP-Modell wurde schon in vielen anderen Studien bezüglich einem Therapieansprechen mit Immuntherapien untersucht, jedoch konnte bisher keine Therapie gefunden werden, die zu einer Remission der Tumore geführt hat. Bei der Übertragbarkeit der hier gefundenen Ergebnisse auf die klinische Anwendung gibt es einige Einschränkungen zu beachten. Bei der subkutanen Injektion der Tumorzellen können lokale Inflammationen entstehen, die in einer hohen Anlockung von Immunzellen in das Gewebe resultiert und die Auswertung der infiltrierenden Immunzellen verfälschen können [136]. Eine früh stattfindende Immunreaktion gegen die Tumore kann in diesem Modell daher schwer evaluiert werden und bedarf daher einer weiteren Testung in einem genetisch modulierten Mausmodell, indem sich die Tumore naturgemäß entwickeln in stetiger Wechselwirkung mit dem *Tumormicroenvironment* [137]. Wie auch bei dem humanisierten Modell ist das *Tumormicroenvironment* hier nicht als authentisch anzusehen, da reine Tumorzellen appliziert wurden, die auch bezüglich Ihrer genetischen Heterogenität, den Vergleich mit menschlichen Tumoren erschweren. Der Therapieerfolg der Triple-Kombinationstherapie ist in diesem Modell dennoch bemerkenswert und sollte in einem autochthonen Setting bestätigt werden, in dem die de novo Entwicklung und das *Tumormicroenvironment* zusätzliche Hinweise auf die Wirkungsweise der Therapie geben könnten.

4.4 Erhöhte Infiltration der Tumore mit $\gamma\delta$ -T-Zellen korreliert mit Tumorregression

Eine erhöhte Infiltration in soliden Tumoren mit Immunzellen ist mit einem besseren Outcome, weniger Metastasenbildungen und einem niedrigeren Risiko für Rezidive assoziiert [94], [98], [100]. In Abbildung 5 wurde gezeigt, dass insbesondere die Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen ein positiver, prognostischer Faktor für das klinische Outcome von Tumorpatienten darstellt [68]. In den hier durchgeführten Untersuchungen der behandelten Tumore kann von einer starken Korrelation zwischen der Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen und dem Tumolvolumen ausgegangen werden (Abb. 17 und 22-25). Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Zelllinien im humanisierten Model eine Remission erreicht wurde, wenn die Triple-Kombinationstherapie verabreicht wurde. In den Tumoren, die sich durch die Therapie verkleinert haben, konnte eine signifikante höhere Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen festgestellt werden. Die Tumore, die einen starken Progress vollzogen haben, zeigten diese Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht (Abb.22-25) Teilweise konnte schon die alleinige ACT zu einer signifikanten Erhöhung der infiltrierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen führen (Abb. 22), jedoch war dieser Effekt nicht so prominent wie der der Triple-Kombinationstherapie. Durch die Kombination der drei Immuntherapien scheint die Infiltration dieser prognostisch wichtigen Population am stärksten positiv beeinflusst zu werden. Durch die ACT wurden den Versuchstieren die $\gamma\delta$ -T-Zellen als *ex vivo* kultivierte Zellen verabreicht. Daher kann angenommen werden, dass der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen unter allen Immunzellen im Kreislauf bei diesen Tieren erhöht war im Vergleich zu den Tieren, die diese Therapie nicht erhalten haben. Da sich die Monotherapie von der Triple-Kombinationstherapie bezüglich der Infiltrationen jedoch noch unterscheidet, ist anzunehmen, dass die aPD-1 Antikörper und die TLR-Agonisten einen weiteren positiven Einfluss auf eine erhöhte Infiltration der $\gamma\delta$ -T-Zellen haben. Der zusätzlich positive Einfluss der TLR-Agonisten mag darin begründet liegen, dass sie durch die Interaktion mit den Toll-like-Rezeptoren zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer stärker ausgeprägten Tumorantigen- Präsentation führen und dadurch Immunzellen in das *Tumormicroenvironment* locken [133], [138]. Auch ein direkter toxischer Effekt der Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen auf Tumorzellen kann durch eine Kombination mit den TLR-Agonisten erzielt werden und kann den Zusatznutzen zur ACT erklären [139]. Durch die Gabe von aPD-1 Antikörpern könne inhibitorische Stimulationen verschiedener Effektorzellen aufgehoben werden und zu einer stärkeren antitumoralen Aktivität der Immunzellen führen [140]. Inwiefern sich die Checkpoint-Inhibition durch aPD-1 auf die Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen projizieren lässt, ist bisher noch nicht einheitlich definiert. In einer klinischen Studie, die eine aPD-1 Therapie beim Melanom

untersuchte, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die $\gamma\delta$ -T-Zellen Infiltration in einer Responder Gruppe signifikant höher war als in der Non-Responder Gruppe [141]. Hingegen zeigt eine andere Studie zum Pankreas-Adenokarzinom eine vermehrte Expression des inhibitorischen PD-L1 auf aktivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen, welcher wiederum eine Inhibition von T-Zellen herbeiführen kann [142].

Im PDX-Modell konnte, ähnlich der anderen Modelle, eine erhöhte Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen gezeigt werden (Abb. 28). Diese höhere Infiltration war jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. In diesem Modell war die Aussagekraft der ausgewerteten Tumore etwas gemindert, da hier eine niedrigere Stichprobenanzahl vorliegt und die Tumore zu Beginn der Therapie sehr heterogene Werte im Tumolvolumen aufwiesen. Da diese Versuche mit Primärmaterial durchgeführt wurden, war die Möglichkeit zur Wiederholung leider nicht möglich. Die Methodik zur Durchführung wurde in diesem ersten hier beschriebenen PDX Modell stetig verbessert, damit in zukünftigen tierexperimentellen Arbeiten die Stichprobenanzahl erhöht werden kann. Der Trend bezüglich einer erhöhten Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen im PDX Modell bestätigt zusammen mit der signifikanten Steigerung der Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen im humanisierten Modell, eine eindeutige positive Korrelation von tumorinfiltrierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen und einem verminderten Tumorwachstum.

Die Untersuchung der Tumore hinsichtlich der Infiltrationen umfasste T-Zell Subtypen und NK-Zellen, da diese durch die Anwendung der adoptiven T-Zell Therapie von Relevanz waren und durch gezielte Literaturrecherche als prognostisch wichtige Zellen eingestuft werden konnten [55], [68], [140], [143], [144]. Die Infiltration der Tumore durch mit B-Zellen Makrophagen und dendritischen Zellen geht über das Thema dieser Arbeit hinaus. Eine immunologische Wirkung dieser Zellen im Zusammenhang mit einer Immuntherapie sind jedoch nach aktueller Studienlage zu erwarten und sollten bei fortführenden Versuchen berücksichtigt werden, um die Komplexität der Interaktionen des gesamten Immunsystems bei der Therapie zu verstehen [13].

4.5 Immuntherapie Kombinationen erhöhen die Infiltration mit CD4+, CD8+, CD3+ T-Zellen und NKT-Zellen

Die erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen zeigte in bisherigen Studien zum Kolonkarzinom und zum Neuroblastom einen positiven Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten [145], [146], [147]. Auch im Periapullärem- und Pankreaskarzinom konnte eine hohe Dichte mit NKT-Zellen im Tumor mit einem längeren Überleben assoziiert werden [143]. Ähnliche Auswirkungen konnten durch erhöhte Infiltrationen mit CD3+,CD4+ und CD8+ T-Zellen beschrieben werden [68], [98], [100]. In den hier beschriebenen Versuchen konnte in allen

Tumoren der Triple-Kombinationstherapie im humanisierten Model eine signifikant erhöhte Infiltration mit NKT-Zellen gezeigt werden (Abb. 22-28). Diese Infiltration korrelierte auch hier mit einem verlangsamten Tumorwachstum und einer Remission der Tumore (Abb. 11,13,15). Die Infiltration mit andern T-Zell Population wurde im humanisierten Model exemplarisch mit der Zelllinie H441 dargestellt (Abb. 23). Neben der beschriebenen höheren Dichte an $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen sind hier auch die infiltrierenden CD4+, CD8+ und CD3+ T-Zellen signifikant erhöht (Abb. 23). In der ACT Monotherapie sind diese Zellpopulationen ebenfalls signifikant erhöht und korrelieren hier mit einem niedrigeren Tumolvolumen. In der Monotherapie zeigt sich jedoch keine Verkleinerung der Tumore wie bei der Triple-Kombinationstherapie und lässt vermuten, dass durch die zusätzliche Therapie mit TLR-Agonisten und aPD-1 Antikörpern die Infiltration mit $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen verstärkt wird. Im syngenem murine Mausmodell mit der KP-Zelllinie konnte eine Erhöhung der infiltrierenden CD3+, NKT-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen in den Tumoren der Triple-Kombinationstherapie beschrieben werden (Abb. 26 und 27). Da sich auch hier eine Verkleinerung der Tumore an Tag 24 gezeigt hat, kann auch hier von einer Korrelation der Infiltration mit dem Tumolvolumen ausgegangen werden. In Abbildung 24 und 27 sind die immunhistologischen Untersuchungen der H441 und der KP938.3 Tumore dargestellt und beweisen zusätzlich die Infiltration mit den T-Zellen in den Tumoren der Triple-Kombinationstherapie. Bei beiden Tumorentitäten präsentieren sich die T-Zellen in der Immunhistologie im zentralen Tumorgewebe (Abb. 24 und 27). Durch die Entnahme der Tumore aus den Versuchstieren, ist es nicht immer möglich das Stroma mit zu entnehmen. Um eine Aussage über die Lokalisation der Immunzellen treffen zu können, eignet sich daher die Immunhistologie besser als die Durchflusszytometrie, da hier der ganze Tumor in seiner ursprünglichen Struktur betrachtet wird und genauere Rückschlüsse erlaubt, wo sich die Immunzellen befanden. Da diese Differenzierung der Lokalisation der Immunzellen von großer Bedeutung ist, sollte diese Methode weiter ausgebaut werden, um beispielsweise die Lokalisation von $\gamma\delta$ -T-Zellen in Erfahrung zu bringen. Im Stroma sind Zytokine, Wachstumsfaktoren, Angiogenesefaktoren und Interferone zu finden, die alle einen starken Einfluss auf die Immunzellendifferenzierung, Invasion und auf das Wachstum der Tumor haben können [148]. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Anwesenheit von mehr $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen in den Tumoren mit einem langsameren oder rückläufigen Wachstum korreliert. Eine weitere Untersuchung bezüglich ihrer genauen Lokalisation in Tumoren könnte einen zusätzlichen Hinweis auf ihre Wechselwirkungen *Tumormicroenvironment* zulassen würde.

5. Literaturverzeichnis

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] J. D. Stanaway *et al.*, "Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Stu," *Lancet*, 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32225-6.
- [3] B. F.X. *et al.*, "HPV-FASTER: Broadening the scope for prevention of HPV-related cancer," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016.
- [4] N. Vigneron and B. J. Van Den Eynde, "Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes," *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0658-x.
- [5] N. Vigneron, "Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/948501.
- [6] N. Vigneron, V. Stroobant, B. J. van den Eynde, and P. van der Bruggen, "Database of T cell-defined human tumor antigens: The 2013 update," *Cancer Immunity*. 2013.
- [7] L. A. Loeb, "Human cancers express mutator phenotypes: Origin, consequences and targeting," *Nature Reviews Cancer*. 2011, doi: 10.1038/nrc3063.
- [8] T. Lindahl and R. D. Wood, "Quality control by DNA repair," *Science*. 1999, doi: 10.1126/science.286.5446.1897.
- [9] R. F. Wang and H. Y. Wang, "Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine," *Cell Research*. 2017, doi: 10.1038/cr.2016.155.
- [10] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape," *Nature Immunology*. 2002, doi: 10.1038/ni1102-991.
- [11] T. Tsukahara *et al.*, "Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5," *Cancer Sci.*, 2006, doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00317.x.
- [12] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [13] M. Binnewies *et al.*, "Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy," *Nat. Med.*, vol. 24, no. 5, pp. 541–550, 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0014-x.

- [14] S. S. McAllister and R. A. Weinberg, "The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis," *Nature Cell Biology*. 2014, doi: 10.1038/ncb3015.
- [15] D. R. Leach, M. F. Krummel, and J. P. Allison, "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade," *Science (80-.)*, 1996, doi: 10.1126/science.271.5256.1734.
- [16] K. Esfahani, L. Roudaia, N. Buhlaiga, S. V. Del Rincon, N. Papneja, and W. H. Miller, "A review of cancer immunotherapy: From the past, to the present, to the future," *Curr. Oncol.*, vol. 27, no. S2, pp. 87–97, 2020, doi: 10.3747/co.27.5223.
- [17] P. Sharma, S. Hu-Lieskovan, J. A. Wargo, and A. Ribas, "Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy," *Cell*. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017.
- [18] H. F. Tsai and P. N. Hsu, "Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: Mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets John T Kung," *Journal of Biomedical Science*. 2017, doi: 10.1186/s12929-017-0341-0.
- [19] E. I. Buchbinder and A. Desai, "CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition," *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 2016, doi: 10.1097/COC.000000000000239.
- [20] B. T. Fife and J. A. Bluestone, "Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways," *Immunological Reviews*. 2008, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x.
- [21] J. D. Moy, J. M. Moskovitz, and R. L. Ferris, "Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma," *Eur. J. Cancer*, vol. 76, pp. 152–166, 2017, doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.035.
- [22] S. A. Patel and A. J. Minn, "Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies," *Immunity*. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.007.
- [23] F. S. Hodi *et al.*, "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, 2010, doi: 10.1056/nejmoa1003466.
- [24] M. Reck *et al.*, "Updated analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab versus platinum-based chemotherapy for advanced non–small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score of 50% or greater," *J. Clin. Oncol.*, 2019, doi: 10.1200/JCO.18.00149.
- [25] F. Martins *et al.*, "Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019, doi: 10.1038/s41571-019-0218-0.
- [26] J. M. Michot *et al.*, "Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review," *European Journal of Cancer*. 2016, doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.016.

- [27] J. Xin Yu, V. M. Hubbard-Lucey, and J. Tang, "The global pipeline of cell therapies for cancer," *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019, doi: 10.1038/d41573-019-00090-z.
- [28] A. D. Waldman, J. M. Fritz, and M. J. Lenardo, "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 11, pp. 651–668, 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.
- [29] M. G. Morvan and L. L. Lanier, "NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks," *Nature Reviews Cancer*. 2016, doi: 10.1038/nrc.2015.5.
- [30] R. J. Robb, R. M. Kutny, and V. Chowdhry, "Purification and partial sequence analysis of human T-cell growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 80, no. 19 I, pp. 5990–5994, 1983, doi: 10.1073/pnas.80.19.5990.
- [31] S. A. Rosenberg, P. Spiess, and R. Lafreniere, "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes," *Science (80-.)*, 1986, doi: 10.1126/science.3489291.
- [32] S. A. Rosenberg *et al.*, "Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, 1988, doi: 10.1056/nejm198812223192527.
- [33] S. A. Rosenberg *et al.*, "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2," *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994, doi: 10.1093/jnci/86.15.1159.
- [34] S. A. Rosenberg *et al.*, "Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy," *Clin. Cancer Res.*, 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- [35] M. J. Besser *et al.*, "Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: Intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies," *Clin. Cancer Res.*, 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0380.
- [36] R. Andersen *et al.*, "Long-Lasting complete responses in patients with metastatic melanoma after adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and an attenuated il2 regimen," *Clin. Cancer Res.*, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1879.
- [37] M. Lauss *et al.*, "Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma," *Nat. Commun.*, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01460-0.
- [38] F. Garrido, F. Ruiz-Cabello, and N. Aptsiauri, "Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma," *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2017, doi: 10.1007/s00262-016-1947-x.
- [39] T. N. M. Schumacher, "T-cell-receptor gene therapy," *Nature Reviews Immunology*. 2002, doi: 10.1038/nri841.

- [40] L. A. Johnson *et al.*, “Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen,” *Blood*, 2009, doi: 10.1182/blood-2009-03-211714.
- [41] M. V. Maus *et al.*, “An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, 2016, doi: 10.1038/mto.2016.23.
- [42] S. Rafiq *et al.*, “Optimized T-cell receptor-mimic chimeric antigen receptor T cells directed toward the intracellular Wilms Tumor 1 antigen,” *Leukemia*, 2017, doi: 10.1038/leu.2016.373.
- [43] M. Yazdanifar, G. Barbarito, A. Bertaina, and I. Airoidi, “ $\gamma\delta$ T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy,” *Cells*, vol. 9, no. 5, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/cells9051305.
- [44] N. P. Restifo, M. E. Dudley, and S. A. Rosenberg, “Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 269–281, 2012, doi: 10.1038/nri3191.
- [45] M. Sadelain, I. Rivière, and S. Riddell, “Therapeutic T cell engineering,” *Nature*. 2017, doi: 10.1038/nature22395.
- [46] C. H. June, R. S. O’Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, and M. C. Milone, “CAR T cell immunotherapy for human cancer,” *Science*. 2018, doi: 10.1126/science.aar6711.
- [47] D. L. Porter, B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, and C. H. June, “Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, 2011, doi: 10.1056/nejmoa1103849.
- [48] S. J. Schuster *et al.*, “Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas,” *N. Engl. J. Med.*, 2017, doi: 10.1056/nejmoa1708566.
- [49] D. W. Lee *et al.*, “T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial,” *Lancet*, 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [50] K. Feng *et al.*, “Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer,” *Sci. China Life Sci.*, 2016, doi: 10.1007/s11427-016-5023-8.
- [51] M. Liu *et al.*, “Targeting PD-L1 in non-small cell lung cancer using CAR T cells,” *Oncogenesis*, vol. 9, no. 8, 2020, doi: 10.1038/s41389-020-00257-z.
- [52] J. Wagner, E. Wickman, C. DeRenzo, and S. Gottschalk, “CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality?,” *Mol. Ther.*, vol. 28, no. 11, pp. 2320–2339, 2020, doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.015.
- [53] Z. Wang and Y. J. Cao, “Adoptive Cell Therapy Targeting Neoantigens: A Frontier for Cancer Research,” *Frontiers in Immunology*. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00176.
- [54] R. C. Abbott, R. S. Cross, and M. R. Jenkins, “Finding the keys to the CAR: Identifying

- novel target antigens for t cell redirection immunotherapies,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, doi: 10.3390/ijms21020515.
- [55] E. Lanitis, D. Dangaj, M. Irving, and G. Coukos, “Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors,” *Annals of Oncology*. 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx238.
- [56] M. Fane and A. T. Weeraratna, “How the ageing microenvironment influences tumour progression,” *Nature Reviews Cancer*. 2020, doi: 10.1038/s41568-019-0222-9.
- [57] Q. Duan, H. Zhang, J. Zheng, and L. Zhang, “Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment,” *Trends in Cancer*. 2020, doi: 10.1016/j.trecan.2020.02.022.
- [58] S. Hunter *et al.*, “Human liver infiltrating $\gamma\delta$ T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations,” *J. Hepatol.*, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.007.
- [59] D. Kabelitz and J. Déchanet-Merville, “Editorial: ‘Recent advances in gamma/delta T cell biology: New ligands, new functions, and new translational perspectives,’” *Frontiers in Immunology*. 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00371.
- [60] L. M. R. Ferreira, “Gammadelta T Cells: Innately adaptive immune cells,” *Int. Rev. Immunol.*, 2013, doi: 10.3109/08830185.2013.783831.
- [61] V. Lafont *et al.*, “Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: Impact on the anti-tumor response,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. DEC, pp. 1–13, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.
- [62] W. K. Born, C. L. Reardon, and R. L. O’Brien, “The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity,” *Current Opinion in Immunology*. 2006, doi: 10.1016/j.coi.2005.11.007.
- [63] Y. L. Wu *et al.*, “ $\gamma\delta$ T cells and their potential for immunotherapy,” *International Journal of Biological Sciences*. 2014, doi: 10.7150/ijbs.7823.
- [64] I. Airoidi *et al.*, “ $\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ + /CD19+ lymphocytes,” *Blood*, 2015, doi: 10.1182/blood-2014-09-599423.
- [65] P. Vantourout and A. Hayday, “Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology,” *Nature Reviews Immunology*. 2013, doi: 10.1038/nri3384.
- [66] A. G. Ramstead and M. A. Jutila, “Complex role of $\gamma\delta$ T-cell-derived cytokines and growth factors in cancer,” *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2012, doi: 10.1089/jir.2012.0073.
- [67] M. Brandes, K. Willimann, and B. Moser, “Immunology: Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ cells,” *Science (80-.)*, 2005, doi: 10.1126/science.1110267.
- [68] A. J. Gentles *et al.*, “The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 8, pp. 938–945, 2015, doi: 10.1038/nm.3909.

- [69] B. Huang, J. Zhao, J. C. Unkeless, Z. H. Feng, and H. Xiong, "TLR signaling by tumor and immune cells: A double-edged sword," *Oncogene*. 2008, doi: 10.1038/sj.onc.1210904.
- [70] X. Su, J. Ye, E. C. Hsueh, Y. Zhang, D. F. Hoft, and G. Peng, "Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells," *J. Immunol.*, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902813.
- [71] S. Rakoff-Nahoum and R. Medzhitov, "Toll-like receptors and cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2009, doi: 10.1038/nrc2541.
- [72] D. Yang, Z. Han, and J. J. Oppenheim, "Alarmins and immunity," *Immunological Reviews*. 2017, doi: 10.1111/imr.12577.
- [73] K. Takeda and S. Akira, "TLR signaling pathways," *Semin. Immunol.*, 2004, doi: 10.1016/j.smim.2003.10.003.
- [74] I. Sheyhidin *et al.*, "Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma," *World J. Gastroenterol.*, 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i32.3745.
- [75] J. Tuomela *et al.*, "Low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, doi: 10.1007/s10549-012-2181-7.
- [76] A. Herrmann *et al.*, "TLR9 is critical for glioma stem cell maintenance and targeting," *Cancer Res.*, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1151.
- [77] T. Grimmig *et al.*, "TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer," *Int. J. Oncol.*, 2015, doi: 10.3892/ijo.2015.3069.
- [78] M. Zhang, Z. Yan, J. Wang, and X. Yao, "Toll-like receptors 7 and 8 expression correlates with the expression of immune biomarkers and positively predicts the clinical outcome of patients with melanoma," *Onco. Targets. Ther.*, 2017, doi: 10.2147/OTT.S136194.
- [79] J. H. Kauppila, H. Takala, K. S. Selander, P. P. Lehenkari, J. Saarnio, and T. J. Karttunen, "Increased Toll-like receptor 9 expression indicates adverse prognosis in oesophageal adenocarcinoma," *Histopathology*, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03991.x.
- [80] L. A. Ridnour *et al.*, "Molecular pathways: Toll-like receptors in the tumor microenvironment-poor prognosis or new therapeutic opportunity," *Clinical Cancer Research*. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0408.
- [81] E. L. J. M. Smits, P. Ponsaerts, Z. N. Berneman, and V. F. I. Van Tendeloo, "The Use of TLR7 and TLR8 Ligands for the Enhancement of Cancer Immunotherapy," *Oncologist*, 2008, doi: 10.1634/theoncologist.2008-0097.

- [82] S. Kaczanowska, A. M. Joseph, and E. Davila, "TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy," *J. Leukoc. Biol.*, 2013, doi: 10.1189/jlb.1012501.
- [83] C. M. Brackett *et al.*, "Toll-like receptor-5 agonist, entolimod, suppresses metastasis and induces immunity by stimulating an NK-dendritic-CD8+ T-cell axis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, doi: 10.1073/pnas.1521359113.
- [84] B. Huang *et al.*, "Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling," *Cancer Res.*, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4067.
- [85] W. He, Q. Liu, L. Wang, W. Chen, N. Li, and X. Cao, "TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance," *Mol. Immunol.*, 2007, doi: 10.1016/j.molimm.2007.01.022.
- [86] A. Carpentier *et al.*, "Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: A phase II study," *Neuro. Oncol.*, 2010, doi: 10.1093/neuonc/nop047.
- [87] T. Kawasaki and T. Kawai, "Toll-like receptor signaling pathways," *Frontiers in Immunology*. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- [88] K. Chen, J. Huang, W. Gong, P. Iribarren, N. M. Dunlop, and J. M. Wang, "Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer," *International Immunopharmacology*. 2007, doi: 10.1016/j.intimp.2007.05.016.
- [89] Z. Urban-Wojciuk *et al.*, "The role of tlrs in anti-cancer immunity and tumor rejection," *Front. Immunol.*, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02388.
- [90] M. Shi, X. Chen, K. Ye, Y. Yao, and Y. Li, "Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy," *Med. (United States)*, vol. 95, no. 25, 2016, doi: 10.1097/MD.0000000000003951.
- [91] B. G. Zhao, J. P. Vasilakos, D. Tross, D. Smirnov, and D. M. Klinman, "Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors," *J. Immunother. Cancer*, 2014, doi: 10.1186/2051-1426-2-12.
- [92] A. Bubna, "Imiquimod-Its role in the treatment of cutaneous malignancies," *Indian Journal of Pharmacology*. 2015, doi: 10.4103/0253-7613.161249.
- [93] J. C. E. Underwood and N. Rooney, "Immunopathology of Tumours," in *Immunological Aspects of Cancer*, B. W. Hancock and A. Milford Ward, Eds. Boston, MA: Springer US, 1985, pp. 179–191.
- [94] F. Pagès *et al.*, "International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study," *Lancet*, vol. 391, no. 10135, pp. 2128–2139, 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)30789-X.
- [95] Q. Fu *et al.*, "Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis," *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 7, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1080/2162402X.2019.1593806.

- [96] A. F. Letca *et al.*, “Regression and sentinel lymph node status in melanoma progression,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 24, pp. 1359–1365, 2018, doi: 10.12659/MSM.905862.
- [97] S. A. Rosenberg and N. P. Restifo, “Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer,” *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6230, pp. 62–68, 2015, doi: 10.1126/science.aaa4967.
- [98] S. T. Pajens, A. Vledder, M. de Bruyn, and H. W. Nijman, “Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era,” *Cell. Mol. Immunol.*, no. September, pp. 1–18, 2020, doi: 10.1038/s41423-020-00565-9.
- [99] Y. Du and Y. Wei, “Therapeutic potential of natural killer cells in gastric cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2018.03095.
- [100] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sauts-Fridman, and J. Galon, “The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298–306, 2012, doi: 10.1038/nrc3245.
- [101] T. F. Gajewski, L. Corrales, J. Williams, B. Horton, A. Sivan, and S. Spranger, “Cancer immunotherapy targets based on understanding the t cell-inflamed versus non-t cell-inflamed tumor microenvironment,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017.
- [102] P. S. Hegde, V. Karanikas, and S. Evers, “The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition,” *Clin. Cancer Res.*, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1507.
- [103] Y. Liu, Y. Dong, L. Kong, F. Shi, H. Zhu, and J. Yu, “Abscopal effect of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors,” *Journal of Hematology and Oncology*. 2018, doi: 10.1186/s13045-018-0647-8.
- [104] N. McGranahan *et al.*, “Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade,” *Science (80-.)*, 2016, doi: 10.1126/science.aaf1490.
- [105] T. M. Allen *et al.*, “Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities,” *Nat. Immunol.*, vol. 20, no. 7, pp. 770–774, 2019, doi: 10.1038/s41590-019-0416-z.
- [106] A. K. Wege, “Humanized Mouse Models for the Preclinical Assessment of Cancer Immunotherapy,” *BioDrugs*, vol. 32, no. 3, pp. 245–266, 2018, doi: 10.1007/s40259-018-0275-4.
- [107] J. Zschaler, D. Schlorke, and J. Arnhold, “Differences in innate immune response between man and mouse,” *Crit. Rev. Immunol.*, 2014, doi: 10.1615/critrevimmunol.2014011600.
- [108] J. Mestas and C. C. W. Hughes, “Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology,” *J. Immunol.*, 2004, doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.

- [109] Junhee Seok *et al.*, “Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, doi: 10.1073/pnas.1222878110.
- [110] J. Arrowsmith and P. Miller, “Trial Watch: Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012,” *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013, doi: 10.1038/nrd4090.
- [111] B. Olson, Y. Li, Y. Lin, E. T. Liu, and A. Patnaik, “Mouse models for cancer immunotherapy research,” *Cancer Discov.*, vol. 8, no. 11, pp. 1358–1365, 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0044.
- [112] D. E. Mosier, R. J. Gulizia, S. M. Baird, and D. B. Wilson, “Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency,” *Nature*, 1988, doi: 10.1038/335256a0.
- [113] D. S. Chulpanova, K. V. Kitaeva, C. S. Rutland, A. A. Rizvanov, and V. V. Solovyeva, “Mouse tumor models for advanced cancer immunotherapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 11, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/ijms21114118.
- [114] A. T. Byrne *et al.*, “Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts,” *Nature Reviews Cancer*. 2017, doi: 10.1038/nrc.2016.140.
- [115] L. C. Yao, K. E. Aryee, M. Cheng, P. Kaur, J. G. Keck, and M. A. Brehm, “Creation of PDX-Bearing Humanized Mice to Study Immuno-oncology,” in *Methods in Molecular Biology*, 2019.
- [116] R. Teng *et al.*, “Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells Repressed Solid Tumors and Their Relapse in an Established Patient-derived Colon Carcinoma Xenograft Model,” *J. Immunother.*, 2019, doi: 10.1097/CJI.0000000000000251.
- [117] M. Puchalapalli *et al.*, “NSG mice provide a better spontaneous model of breast cancer metastasis than athymic (nude) mice,” *PLoS One*, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163521.
- [118] A. Capasso *et al.*, “Characterization of immune responses to anti-PD-1 mono and combination immunotherapy in hematopoietic humanized mice implanted with tumor xenografts,” *J. Immunother. Cancer*, 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0518-z.
- [119] J. L. Wilding and W. F. Bodmer, “Cancer cell lines for drug discovery and development,” *Cancer Research*. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
- [120] J. P. Bastien, A. Minguy, V. Dave, and D. C. Roy, “Cellular therapy approaches harnessing the power of the immune system for personalized cancer treatment,” *Semin. Immunol.*, vol. 42, no. September, p. 101306, 2019, doi: 10.1016/j.smim.2019.101306.
- [121] M. Wang *et al.*, “Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy,” *FASEB J.*, 2018, doi: 10.1096/fj.201700740R.
- [122] T. L. Whiteside, “The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth,” *Oncogene*. 2008, doi: 10.1038/onc.2008.271.

- [123] Q. Tan, J. K. Sagar, M. Yu, M. Wang, and I. F. Tannock, "Mechanisms of Drug Resistance Related to the Microenvironment of Solid Tumors and Possible Strategies to Inhibit Them," *Cancer Journal (United States)*. 2015, doi: 10.1097/PPO.000000000000131.
- [124] D. S. Chulpanova, K. V. Kitaeva, A. R. Green, A. A. Rizvanov, and V. V. Solovyeva, "Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00402.
- [125] K. E. Valdez, F. Fan, W. Smith, D. C. Allred, D. Medina, and F. Behbod, "Human primary ductal carcinoma in situ (DCIS) subtype-specific pathology is preserved in a mouse intraductal (MIND) xenograft model," *J. Pathol.*, 2011, doi: 10.1002/path.2969.
- [126] Y. S. Derose *et al.*, "Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes," *Nat. Med.*, 2011, doi: 10.1038/nm.2454.
- [127] E. Rosfjord, J. Lucas, G. Li, and H. P. Gerber, "Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology," *Biochemical Pharmacology*. 2014, doi: 10.1016/j.bcp.2014.06.008.
- [128] M. A. King *et al.*, "Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex," *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x.
- [129] A. C. Drake, Q. Chen, and J. Chen, "Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution," *Cellular and Molecular Immunology*. 2012, doi: 10.1038/cmi.2012.6.
- [130] M. Hidalgo *et al.*, "A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer," *Mol. Cancer Ther.*, 2011, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0233.
- [131] N. Chen *et al.*, "Up-regulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-driven NSCLC," *J. Thorac. Oncol.*, 2015.
- [132] A. A. A. Smith *et al.*, "Nanoparticles Presenting Potent TLR7/8 Agonists Enhance Anti-PD-L1 Immunotherapy in Cancer Treatment," *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 9, pp. 3704–3712, 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00812.
- [133] M. J. Reilley, B. Morrow, C. R. Ager, A. Liu, D. S. Hong, and M. A. Curran, "TLR9 activation cooperates with T cell checkpoint blockade to regress poorly immunogenic melanoma," *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0811-x.
- [134] S. Adams *et al.*, "Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated

- rejection of skin metastases in patients with breast cancer,” *Clin. Cancer Res.*, 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1149.
- [135] M. Gallotta, H. Assi, E. Degagne, S. K. Kannan, R. L. Coffman, and C. Guiducci, “Inhaled tlr9 agonist renders lung tumors permissive to pd-1 blockade by promoting optimal CD4 β and CD8 β T-cell Interplay,” *Cancer Res.*, vol. 78, no. 17, pp. 4943–4956, 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0729.
- [136] M. A. Taylor *et al.*, “Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery,” *J. Immunother. Cancer*, 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0794-7.
- [137] M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, “Natural innate and adaptive immunity to cancer,” *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
- [138] H. Lu, “TLR agonists for cancer immunotherapy: Tipping the balance between the immune stimulatory and inhibitory effects,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. MAR, pp. 3–6, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00083.
- [139] D. Kabelitz, R. Serrano, L. Kouakanou, C. Peters, and S. Kalyan, “Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 17, no. 9, pp. 925–939, 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0504-x.
- [140] F. Sato-Kaneko *et al.*, “Combination immunotherapy with TLR agonists and checkpoint inhibitors suppresses head and neck cancer,” *JCI insight*, vol. 2, no. 18, pp. 1–18, 2017, doi: 10.1172/jci.insight.93397.
- [141] Y. R. Miao *et al.*, “ImmuCellAI: A Unique Method for Comprehensive T-Cell Subsets Abundance Prediction and its Application in Cancer Immunotherapy,” *Adv. Sci.*, vol. 7, no. 7, 2020, doi: 10.1002/advs.201902880.
- [142] D. Daley *et al.*, “ $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation,” *Cell*, vol. 166, no. 6, pp. 1485-1499.e15, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.07.046.
- [143] S. Lundgren *et al.*, “The prognostic impact of NK/NKT cell density in periampullary adenocarcinoma differs by morphological type and adjuvant treatment,” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0156497.
- [144] K. D. Moynihan *et al.*, “Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses,” *Nat. Med.*, vol. 22, no. 12, pp. 1402–1410, 2016, doi: 10.1038/nm.4200.
- [145] T. Tachibana *et al.*, “Increased intratumor V α 24-positive natural killer T cells: A prognostic factor for primary colorectal carcinomas,” *Clin. Cancer Res.*, 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0877.
- [146] T. Hishiki *et al.*, “Invariant natural killer T infiltration in neuroblastoma with favorable

- outcome," *Pediatr. Surg. Int.*, 2018, doi: 10.1007/s00383-017-4189-x.
- [147] D. Krijgsman, M. Hokland, and P. J. K. Kuppen, "The role of natural killer T cells in cancer-A phenotypical and functional approach," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. FEB, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00367.
- [148] C. Bazzichetto *et al.*, "Advances in Tumor-Stroma Interactions: Emerging Role of Cytokine Network in Colorectal and Pancreatic Cancer," *J. Oncol.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/5373580.
- [149] S. Borchmann *et al.*, "Tripartite antigen-agnostic combination immunotherapy cures established poorly immunogenic tumors," *J. Immunother. cancer*, vol. 10, no. 10, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-004781.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen der Checkpoint-Inhibitoren	16
Abbildung 2: Schematische Übersicht der Durchführung einer adoptive T-Zelltherapie	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung zu Modulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen und deren Effekte auf Tumorzellen	20
Abbildung 4 Übersicht zu den Immunmodulatorischen Effekten der TLR-Agonisten 3, 7, 9	21
Abbildung 5 Prognostische Effekt von diversen Immzellsubtypen in soliden Tumoren auf deren klinisches <i>Outcome</i>	23
Abbildung 6 Arbeitsablauf und Versuchsdurchführung der <i>in vivo</i> Versuche zum Tumorwachstum im humanisierten Mausmodell	39
Abbildung 7 Versuchsablauf im <i>Patient-Derived-Xenograft</i> Model	42
Abbildung 8 Effektorzellen zeigen durch die <i>in-vitro</i> Proliferation eine Differenzierung zu unterschiedlichen immunologischen Phänotypen	49
Abbildung 9 Kombination aller Effektorzellen im <i>in-vitro</i> Viabilitäts-Essay	50
Abbildung 10 Erfolgreiche Humanisierung der Versuchstiere mit aus PBMC's gewonnenen humanen Immunzellen	52
Abbildung 11: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen H1975 Tumore im humanisierten Mausmodell	54
Abbildung 12: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der H1975 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen	55
Abbildung 13: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen H441 Tumore im humanisierten Mausmodell	56
Abbildung 14: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der H441 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen	57
Abbildung 15: Triple Kombinationstherapie führt zur Verkleinerung der subkutanen JimT1 Tumore im humanisierten Mausmodell	58
Abbildung 16: Darstellung der signifikanten Verkleinerungen der JimT1 Tumore unter Triple Immuntherapie an den festgelegten Messtagen	59
Abbildung 17: Übersicht der signifikanten Verkleinerung der Tumore, die im humanisieren Model mit der Triple-Kombinationstherapie behandelt wurden	60
Abbildung 18: Tumorumfänge und deren Veränderung des PDX-Modells	61
Abbildung 19: Tumorumfänge des PDX-Modells an Tag 24 im Vergleich zur Kontrollgruppe	62
Abbildung 20: Darstellung der signifikanten Verkleinerung der Tumorumfänge im syngenem Mausmodell unter der Triple Kombinationstherapie	64
Abbildung 21: Darstellung der signifikant verringerten Tumorumfänge des syngenem Mausmodells an Tag 24 unter Triple Kombinationstherapie	65

Abbildung 22: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im H1975 Model unter den Immuntherapiekombinationen	67
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellinfiltrationen der H441 Tumore	68
Abbildung 24: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der H441 Tumore unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe	70
Abbildung 25: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im JimT1 Model unter den Immuntherapiekombinationen	71
Abbildung 26: Vergleich der Immunzellinfiltrationen im syngenem Mausmodell unter den Immuntherapiekombinationen	73
Abbildung 27: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der Tumore des syngenem Mausmodells unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe	75
Abbildung 28: Vergleich der Immunzellinfiltrationen durch Immunhistologie der Tumore des syngenem Mausmodells unter Triple Kombinationstherapie und Kontrollgruppe	76

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hersteller der verwendeten Geräte	27
Tabelle 2: Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3: Bezugsquellen der Chemikalien	28
Tabelle 4: Bezugsquellen der Antikörper und Zytokine	28
Tabelle 5: Murine Zelllinien und deren Ursprungsgewebe	30
Tabelle 6: Humane Zelllinien und deren Ursprungsgewebe	30
Tabelle 7: Verwendete Medien und Puffer und deren Zusammensetzung	31
Tabelle 8: Verwendete Therapeutika im humanisiertem Mausmodell und deren Mengenangabe	40
Tabelle 9: Verwendete Therapeutika im murinen Mausmodell und deren Mengenangaben	41
Tabelle 10: Verwendeten humane und murinen Antikörper für die jeweiligen Kanäle des Durchflusszytometers	44
Tabelle 11: Genanalyse des Primärtumors und der PDX Tumore des untersuchten PDX Modells	63

7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

.Borchmann *et al.*, "Tripartite antigen-agnostic combination immunotherapy cures established poorly immunogenic tumors," *J. Immunother. cancer*, vol. 10, no. 10, pp. 1–18, 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-004781.

8. Curriculum Vitae

Name: Hanna Ludwig
Geburtsdatum: 30.01.1993
Nationalität: deutsch
Geboren in: Troisdorf
Familienstand: ledig
Adresse: Berrenratherstraße 158, 50937 Köln
Telefon: +49 170 1921908
Email: hanna.ludwig@uk-koeln.de



Ausbildung

- 10/2016 - heute **Universität zu Köln, Studium der Humanmedizin**
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 04/2018
 Note: 1,5
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 04/2021
 Note: 3,0
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 06/2022
 Note: 1,0
- 07/2018 - heute **Experimentelle Doktorarbeit**
AG Krebstherapie und molekulare Bildgebung
Prof. Dr. Dr. Roland Ullrich
 Titel: Development of a novel combination
 immunotherapy approach using humanized and
 genetically engineered mouse models of cancer
Gefördert durch die Köln Fortune Stiftung
- 04/2013 - 04/2016 **Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Studium
der Pharmazie**
1. Staatsexamen 08/2015
- 07/2003 - 07/2012 **Sankt-Adelheid-Gymnasium Bonn**
Allgemeine Hochschulreife 07/2012
 Note: 1,9

Praxiserfahrung

Seit 07/2022

Assistenzärztin in der Klinik I für Innere Medizin
Hämatologie, Onkologie, Klinische Infektiologie am
Universitätsklinikum Köln

Praktisches Jahr

05/2021 -
09/2021

Innere Medizin
Hämatologie/Onkologie, Internistische Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Köln

09/2021 -
12/2021

Anästhesie, Schmerzmedizin, Intensivmedizin
Universitätsklinikum Köln

12/2021 - 04/2022

Chirurgie
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Spital Schiers, Schweiz
Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Köln

Famulaturen

03/2020

Allgemeinmedizin
Hausarztpraxis Sülz (Ockenfels, Pieper, König)

07/2019

Innere Medizin
Hämatologie/Onkologie IMC Station, Universitätsklinikum Köln

06/2019

Innere Medizin
Notaufnahme, St. Hildegardis Krankenhaus Köln

Nebentätigkeiten

04/2021 - 08/2021

Studentische Aushilfskraft im Impfzentrum Köln Deutz

04/2020 - 10/2020

Studentische Aushilfskraft im Infektionsschutzzentrum
COVID-19 Genesenenambulanz
Universitätsklinikum Köln (Prof. Lehmann)

03/2019-jetzt

Tutorin für die Fächer Anatomie und Physiologie
Vorsemesterkurse, IFS Studentenkurse Köln

06/2018

„FELASA Kurs“ an der Universität zu Köln
Praxis und Theorie zum Umgang mit Mäusen und Ratten
als Versuchstiere

06/2017 - 02/2021

Studentische Aushilfskraft im Schlaflabor
Polysomnografie und CPAP/BiPAP- Einstellungen,
St. Hildegardis Krankenhaus Köln

10/2017 - 03/2018

Studentische Aushilfskraft im Präparierkurs
Tutorin im Kurs Makroskopische Anatomie
Universitätsklinikum Köln (Prof. Scaal)

Köln, 22.12.2022

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Scaal', written in a cursive style.