

Márcia Figueiredo Goncalves
Dr. Sc. Hum.

Use of bispecific antibodies to improve transendothelial migration of T cells towards tumor cells

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Momburg

Die Migration von Effektorlymphozyten aus dem zirkulierenden Blut in das Mikromilieu von Tumoren wird als ein wesentlicher Schritt der Tumorabwehr durch das Immunsystem betrachtet. Eine hohe Dichte infiltrierender CD8⁺ T-Zellen im Tumorbett ist bei zahlreichen Tumorentitäten mit einer besseren Prognose korreliert. Schwach infiltrierte Tumoren zeigen häufig eine abnormale und dysfunktionale Vaskularisierung mit reduzierter Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin, ICAM-1/2 und VCAM-1, die an der Extravasation von Immunzellen beteiligt sind.

Es erscheint daher wünschenswert, neue Strategien zu entwickeln, die eine Aktivierung der Tumor-Mikrovaskulatur bewirken, welche dann eine verstärkte transendotheliale Migration von Effektor-T-Zellen in den Tumor erlauben würde. Wir verfolgten die Arbeitshypothese, dass eine Aktivierung von Tumorendothelzellen entweder direkt durch lösliche Faktoren bewirkt werden kann oder indirekt infolge einer T-Zell-Aktivierung in Kontakt mit Endothelzellen.

Im Ansatz der direkten Endothelzellaktivierung wurden rekombinante bifunktionale VEGFR2-bindende Fusionsproteine verwendet, um vaskulären Endothelzellen mit aktivierenden Zytokinen zu beliefern. Diese zielgerichtete Bereitstellung von aktivierenden Zytokinen, die für spätere In-vivo-Ansätze nützlich sein könnte, erzielte erfolgreich eine Hochregulation der Endothelzell-Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 und bewirkte eine verstärkte Bindung von CD3⁺ T-Zellen an aktivierte humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC).

Im T-Zell-Aktivierungsansatz, der einen indirekten Weg zur Aktivierung von Gefäßendothel darstellt, wurden tetravalente bispezifische monoklonale Antikörper (BiMAk) im (scFv1-Fc-scFv1)₂-Format verwendet. Diese BiMAk binden die Endothelzell-Wachstumsfaktorrezeptoren VEGFR2 bzw. TIE2 mit den N-terminalen V_H-V_L Einzelketten-Antikörpern (scFv) und die stimulatorischen/kostimulatorischen T-Zell-Moleküle CD3 ϵ bzw. CD28 mit den C-terminalen scFv-Antikörper. Lokale CD3 ϵ -vermittelte T-Zellaktivierung sollte zu der Freisetzung von Zytokinen führen (z.B. TNF- α oder IFN- γ), die wiederum bei Endothelzellen die Expression von

Adhäsionsmolekülen induzieren. Eine Antikörper-vermittelte Blockade der VEGF-Bindung kann gleichzeitig antiangiogene Effekte haben. Dieser Ansatz könnte die In-situ-Aktivierung von Endothelzellen im Tumorgewebe ermöglichen.

Um die Aktivierungsfähigkeit von eigenen bispezifischen Antikörpern zu ermitteln, wurden CD3⁺ T-Zellen mit HUVEC) für 24 h in Gegenwart von bispezifischen Antikörpern kokultiviert. Die Behandlung mit α VEGFR2- α CD3 BiMAk resultierte in einer starken T-Zell-Aktivierung sowie einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die durch Zelloberflächenfärbungen sowie Zytokin-ELISAs nachgewiesen wurde. Dieser Effekt wurde leicht verstärkt durch die zusätzliche Anwendung eines α TIE2- α CD28 BiMAk.

Ein Transwell-Testsystem wurde etabliert, um die Migrationsfähigkeit von T-Zellen durch einen einschichtigen Endothelzellverband (monolayer) in Gegenwart und Abwesenheit von BiMAk zu messen. Verglichen mit einem monospezifischen α VEGFR2 scFv-Fc Kontrollantikörper, der keine EC oder T-Zellaktivierung vermittelte, war die Migration von T-Zellen in Gegenwart des α VEGFR2- α CD3 BiMAk signifikant verstärkt. Obwohl die T-Zellaktivierung durch eine zusätzliche Behandlung mit dem kostimulatorischen α TIE2- α CD28 BiMAk verstärkt wurde, wurde die Migrationsrate von T-Zellen nicht erhöht. Mit dem Ziel die Migration von CD8⁺ T-Zellen zu favorisieren, wurden verschiedene α EC-Antigen- α CD8 BiMAks zusammen mit den erwähnten (ko)stimulatorischen BiMAk getestet. Es wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Migrationsrate von zytotoxischen T-Zellen beobachtet.

Um die zytotoxische Kapazität von transmigrierten T-Zellen gegenüber Tumorzellen zu analysieren, wurden transmigrierte T-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von tumorzellbindenden BiMAk auf einen Monolayer von MCF-7 Brustkrebszellen gesetzt. Die Abtötung von Tumorzellen wurden durch einen LDH-Freisetzungstest gemessen. Wir beobachteten, dass T-Zellen, die mit dem α VEGFR2- α CD3 BiMAk aktiviert worden waren und einen Endothelzell-Monolayer durchwandert hatten, für eine zytotoxische Aktivität einen zusätzlichen tumorreaktiven α HER-2- α CD3 BiMAk benötigten. Die Zytotoxizität war verstärkt, wenn die transmigrierten T-Zellen mit einer Kombination der (ko)stimulatorischen BiMAk α VEGFR2- α CD3 and α PD-L1- α CD28 vorbehandelt waren.

Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mittels α VEGFR2 x α CD3 BiMAk aktivierte T-Zellen in Kontakt mit Endothelzellen diese indirekt aktivieren, was zu einer verbesserten T-Zell-Migration führt. Diese Behandlung kann kombiniert werden mit anderen BiMAk, die eine T-Zell-Tumorzellbindung und Tumorzellabtötung vermitteln.