

## - Zusammenfassung -

**Karsten Michael Warwas**  
**Dr. med.**

### **Overcoming solid tumor resistance to T cell recruiting bispecific antibodies by providing co-stimulation and checkpoint inhibition at the tumor site**

**Fach:** Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
**Doktorvater:** Prof. Dr. med. Dirk Jäger

Bispezifische, T-Zell rekrutierende Anti-CD3-Antikörper, haben eine bemerkenswerte klinische Wirksamkeit bei hämatologischen Malignomen gezeigt, was zur Zulassung des bispezifischen CD19-CD3 T-Zell-Engagers Blinatumomab geführt hat. Die Behandlung von soliden Tumoren wie Karzinomen oder Sarkomen mit bispezifischen Antikörpern stellt jedoch bis heute eine große Herausforderung dar. Dies ist auf mehrere entscheidende Einschränkungen zurückzuführen, die diese Krebsart mit sich bringt, wie zum Beispiel eine stark immunsuppressive Tumor-Mikroumgebung, eine begrenzte Zugänglichkeit für Antikörper, sowie dosis-limitierende Toxizität, die in zahlreichen klinischen Studien beobachtet wurde. In der hier vorgestellten Arbeit wurde untersucht, ob die zusätzliche Bereitstellung ko-stimulatorisch wirkender bispezifischer Antikörper in Kombination mit bispezifischen Anti-CD3-Antikörpern die T-Zell-Aktivierung und die proliferativen sowie zytotoxischen Kapazitäten weiter steigern und damit die minimal erforderliche wirksame Dosis der angewandten Therapeutika verringern würde.

In dieser Arbeit wurden bispezifische Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper, die auf zahlreiche gut untersuchte, mit soliden Tumoren assoziierte Antigene abzielen, systematisch in verschiedenen Kombinationen untersucht. Die verwendeten bispezifischen Antikörper basierten auf einer tetravalenten (scFv1-Fc<sup>KO</sup>scFv2)<sub>2</sub> molekularen Architektur. Neben CD28-gerichteten bispezifischen Antikörpern wurden auch bifunktionale Fusionsproteine, welche ko-stimulatorische Liganden der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie enthalten, in Kombination mit CD3-basierten bispezifischen Antikörpern untersucht. Die Charakteristika und funktionellen Eigenschaften der bispezifischen und bifunktionalen Antikörper wurden in zellbasierten Assays unter Verwendung von Ko-Kulturen von Tumorzelllinien und gereinigten T-Zellen eingehend untersucht. Diese Studie zielte auch darauf ab, ein fortgeschrittenes, dreidimensionales *in vitro* Tumorsphäroid-Modell zu etablieren, das bestimmte Merkmale solider Tumoren nachbildet, um die vielfältigen Herausforderungen zu replizieren, denen T-Zell-Therapien *in vivo* gegenüberstehen. Die Anti-Tumor-Aktivität der bispezifischen Antikörper wurde auch in einem von Patienten stammenden *ex vivo* Sphäroid-Modell mit Pleuraergüssen von Brustkrebspatientinnen untersucht.

Bei Erkennung und Bindung eines Tumor-assoziierten Antigens aktivierten die bispezifischen Anti-CD3-Antikörper T-Zellen und lösten Zytotoxizität *in vitro* aus. Wichtig zu erwähnen ist, dass die bispezifischen Antikörper in Abwesenheit von Zielzellen keine T-Zell-Stimulation hervorrufen konnten. Dies deutet stark darauf hin, dass die beobachteten Anti-Tumor-Effekte ausschließlich von der Vernetzung von T-Zellen und Tumorzellen abhängen. Wurden die bispezifischen Anti-CD28-Antikörper einzeln verwendet, führten die ko-stimulatorischen bispezifischen Wirkstoffe selbst bei Vernetzung mit Tumorzellen in allen Assays zu keiner

nachweisbaren T-Zell-stimulierenden Wirkung. Die Kombination von Anti-CD3- und ko-stimulatorischen Anti-CD28 bispezifischen Antikörpern verbesserte jedoch die T-Zell-Antwort in Bezug auf die Expression von Aktivierungsmarkern, die Zytokinproduktion, proliferative und zytolytische Kapazitäten, sowie die Verringerung der für die T-Zell-Aktivierung erforderlichen minimalen Dosis erheblich. Immun-Checkpoint-Inhibitoren verstärkten die durch bispezifische Antikörper vermittelte Ko-Stimulation weiter. In von Patienten gewonnenen Tumor-Sphäroiden aktivierten die getesteten bispezifischen Therapeutika autologe tumor-infiltrierende Lymphozyten und lösten eine signifikante Anti-Tumor-Antwort gegen *ex vivo* Brustkrebszellen aus. CD3-basierte bispezifische Antikörper allein präsentierten eine eher begrenzte Wirksamkeit in diesem Modell. Die Kombination mit bispezifischer Ko-Stimulation steigerte jedoch die Immunantwort erheblich und führte zu einer bemerkenswerten Eradikation der Tumorzellen. Durch die Verwendung von bispezifischen CD3- und CD28-Antikörpern, die unterschiedliche Antigene auf separaten Zellen binden, demonstrierten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ein sogenannter geteilter Ko-Stimulationsansatz eine valide Möglichkeit zur Auslösung einer Anti-Tumor-Reaktion darstellt.

Insgesamt zeigten die in dieser Arbeit verwendeten tetravalenten bispezifischen Antikörper eine beträchtliche Anti-Tumor-Wirksamkeit gegen humane primäre Krebszellen, was die Bedeutung und das Potenzial einer gezielten Ko-Stimulation unterstreicht, welche eine wesentliche Rolle bei der Immunreaktion spielt. Die Kombination von aktivierenden und ko-stimulierenden bispezifischen Antikörpern könnte sich als vorteilhaft für die Behandlung solider Tumore erweisen, insbesondere wenn die Ko-Stimulation ein zweites tumor-assoziiertes oder stromales Antigen einbezieht. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung könnte der in dieser Arbeit vorgeschlagene Ansatz der geteilten Ko-Stimulation von Vorteil sein, um eine lokalisiertere Aktivierung des Immunsystems zu erreichen, was die Wirksamkeit erhöhen könnte. Darüber hinaus könnte die geteilte Ko-Stimulation die Verwendung niedrigerer Dosen von bispezifischen CD3-Antikörpern *in vivo* ermöglichen, wodurch die in zahlreichen klinischen Studien beobachteten, systemischen Toxizitäten verringert würden. Bispezifische Antikörper könnten daher eine vielversprechende klinische Anwendung bei der Behandlung von soliden Tumoren finden.