

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Schipper

Entwicklung einer CD44v6-basierten
CAR-T-Zell-Therapie
für solide Kopf-Hals-Karzinome

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elena Schulte

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Norbert Gattermann

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Artikel

Haist, C., **Schulte, E.**, Bartels, N., Bister, A., Poschinski, Z., Ibach, T., Geipel, K., Wiek, C., Wagenmann, M., Monzel, C., Scheckenbach, K., Hanenberg, H. (2021). *CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells*, Oral Oncology.

Vorträge

Schulte, E., Scheckenbach, K., Bister, A., Hanenberg, H., Wiek, C., Haist, C. (2021). CD44v6-basierte CAR-T-Zell-Therapie für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome. 92. & 91. Online-Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V, online

Scheckenbach, K., Bister, A., **Schulte, E.**, Hanenberg, H., Wiek, C., Wagenmann, M., Schipper, J., Haist, C. (2021). Entwicklung einer Immuntherapie mit gegen EGFR-gerichteten chimären Antigenrezeptor (CAR) T-Zellen bei Kopf-Hals-Karzinomen. 92. & 91. Online-Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V, online

Scheckenbach, K., Bister, A., **Schulte, E.**, Hanenberg, H., Wiek, C., Wagenmann, M., Schipper, J., Haist, C. (2022). EGFR- und CD44v6-based CAR T-cell therapy for head and neck squamous cell carcinoma in Fanconi anemia. International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer, Essen, Germany

Poster

Haist, C., Bister, A., Ibach, T., **Schulte, E.**, Scheckenbach, K., Hanenberg, H., Wiek, C. (2019). New hinge domains from human CD34 and CD271 allow detection and selection of CAR T-cells recognizing hematopoietic and solid tumor cells for clinical applications. 1st European CAR T-cell Meeting, Paris, France

Bister, A., Haist, C., **Schulte, E.**, Scheckenbach, K., Gattermann, N., Wiek, C. (2019). Dual antigen targeting to reduce on-target off-tumour toxicities in CAR T-cell therapy for mantle cell lymphoma. 1st European CAR T-cell Meeting, Paris, France

Haist, C., Bister, A., Ibach, T., **Schulte, E.**, Rölleke, K., Scheckenbach, K., Hanenberg, H., Wiek, C. (2019). Developing novel CD34 and CD271 spacer domains for enhanced detection and selection of CAR T-cell. Retreat Düsseldorf School of Oncology, Düsseldorf, Germany

Schulte, E., Haist, C., Bister, A., Scheckenbach, K., Hanenberg, H., Wiek, C. (2019). CD44v6-targeted CAR T-cell therapy for head and neck squamous cell carcinoma. Retreat Düsseldorf School of Oncology, Düsseldorf, Germany

Haist, C., **Schulte, E.**, Bister, A., Scheckenbach, K., Hanenberg, H., Wiek, C. (2019). Specificity and efficacy of second generation CAR T-cells against CD44v6 antigen in primary HNSCC cells. European Society of Gene & Cell Therapy Congress, Barcelona, Spain

Bister, A., Haist, C., **Schulte, E.**, Scheckenbach, K., Hanenberg, H., Gattermann, N., Wiek, C. (2019). Combining ROR1, CD5 or CD19 targeted chimeric antigen receptors reduces off-tumour toxicity while maintaining lysis against double positive mantle cell lymphoma cells. European Society of Gene & Cell Therapy Congress, Barcelona, Spain

Schulte, E., Scheckenbach, K., Haist, C., Bister, A., Hanenberg, H., Wiek, C. (2020). CD44v6-targeted CAR T-cell therapy for head and neck squamous cell carcinoma. Laryngo- Rhino-Otologie. 99. 10.1055/s-0040-1710995.

Scheckenbach, K., Bister, A., **Schulte, E.**, Hanenberg, H., Wiek, C., Wagenmann, M., Schipper, J., Haist, C. (2020). Development of an EGFR-targeted CAR T-cell immunotherapy in head and neck cancer. Laryngo-Rhino-Otologie. 99. 10.1055/s-0040-1710993.

Haist, C., Bister, A., **Schulte, E.**, Poschinski, Z., Wiek, C., Scheckenbach, K., Hanenberg, H. (2021). EGFR- und CD44v6-basierte CAR T-Zell-Therapie für Kopf-Hals- Plattenepithelkarzinome bei Fanconi-Anämie. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, Frankfurt am Main, Germany

ZUSAMMENFASSUNG

Die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (KHPEK) liegt auch unter den aktuellen Therapieschemata mit multimodalen Ansätzen nur bei 50 %. In den letzten sechs Jahren haben neuartige adoptive zelluläre Behandlungsmodalitäten bei Patienten mit infausten malignen B-Zell-Erkrankungen, bei denen die autologen T-Zellen mittels genetischer Modifikation mit sogenannten chimären Antigenrezeptoren (CARs) ausgestattet wurden, beeindruckende Remissions- und Überlebensraten erzielt. Dabei nutzen die CAR-Konstrukte ein Einzelkettenfragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers, das ein spezifisches Antigen auf den Zielzellen erkennt, damit die CAR-T-Zellen die malignen Zielzellen erkennen und abtöten können. Bislang sind jedoch nur wenige Zielantigene als potenzielle Kandidaten für eine CAR-T-Zell-Therapie bei KHPEK beschrieben worden. CD44v6, eine Spleißvariante des Adhäsionsmoleküls CD44, ist ein tumor-assoziiertes Antigen (TAA), das auf KHPEK häufig überexprimiert wird und somit ein potenziell geeignetes Ziel für eine derartige CAR-T-Zell-Therapie sein könnte. In dieser Arbeit sollte deshalb eine CD44v6-spezifische CAR-T-Zell-Therapie gegen KHPEK-Zellen *in vitro* etabliert werden.

In einem ersten Schritt wurde die CD44v6- und CD44-Expression bei 31 primären KHPEK-Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht, wobei sich unterschiedliche Expressionen von CD44v6 und CD44 zeigten. Als Positivkontrolle wurde deshalb eine cDNA für CD44v6 stabil in der KHPEK-Zelllinie UT24A exprimiert. Ein CD44v6-CAR der zweiten Generation mit dem scFv-Fragment des monoklonalen Antikörpers BIWA8 und mit den Signalketten von humanem CD28 und der CD3 ζ -Kette wurde durch lentiviralen Gentransfer stabil in primären humanen T-Zellen exprimiert und die transduzierten Zellen dann über eine CD34-abgeleitete *hinge*-Domäne mittels der MACS-Technologie zu >90 % angereichert. Um das zytotoxische Potenzial der genetisch modifizierten T-Zellen zu beurteilen, wurden diese mit KHPEK-Zelllinien für 16 Stunden kokultiviert und dann die Lyse der KHPEK-Zellen durchflusszytometrisch oder mit einem Zell-basierten Proliferationsassay bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Lyseeffizienz der genetisch veränderten T-Zellen vorwiegend von der Antigendichte auf den Zielzellen abhing: Zelllinien mit höheren CD44v6-Expressionsniveaus (UM14C, UM11B) wurden bereits bei niedrigen T-Zell- zu Zielzell-Verhältnissen effizient lysiert, während die naiven UT24A-Zellen mit niedriger CD44v6-Expression kaum eliminiert wurden. Die lentivirale Überexpression von CD44v6 erhöhte dann die Lyse der UT24A-Zellen durch die CAR-T-Zellen deutlich, was ein Hinweis für die Spezifität des CD44v6-CARs war.

In dieser Arbeit wurde somit eine CD44v6-ausgerichtete CAR-T-Zell-Therapie etabliert, mit der *in vitro* KHPEK-Zellen effizient in kurzer Zeit eliminiert werden können. Zukünftige Ansätze sollten nun die CAR-T-Zellen vor dem immunsuppressiven *Tumorenvironment* von KHPEK besser schützen, zusätzliche Kombinationstherapien entwickeln, die Lyseeffizienz gegenüber den malignen Zellen weiter optimieren und die Toxizität gegenüber CD44v6-positiven gesunden Geweben weitgehend umgehen.

SUMMARY

The five-year survival probability of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is only 50 %, even under current treatment regimens with multimodal approaches. Over the past six years, novel adoptive cellular treatment modalities for patients with *infaust* B-cell malignancies, in which the autologous T-cells are genetically modified with so-called chimeric antigen receptors (CARs), have achieved impressive remission and survival rates. The CAR constructs here use a single chain fragment (scFv) of a monoclonal antibody that recognizes a specific antigen on the target cells and allows the CAR T-cells to recognize and kill the malignant target cells. To date, however, only a few target antigens have been described as potential candidates for CAR T-cell therapy in HNSCC patients. CD44v6, a splice variant of the adhesion molecule CD44, is a tumor-associated antigen that is frequently overexpressed on HNSCC and could therefore be a potentially suitable target for CAR T-cell therapy. The aim of this work therefore was to establish a CD44v6-specific CAR T-cell therapy against HNSCC cells *in vitro*.

Initially, the CD44v6 and CD44 expression patterns were analyzed in 31 primary HNSCC cell lines by flow cytometry. The cell lines showed different expressions of CD44v6 and CD44. Therefore, a cDNA for CD44v6 was stably expressed in the HNSCC cell line UT24A as a positive control. A second generation CD44v6 CAR with the scFv fragment of the monoclonal antibody BIWA8 and with the signaling chains of human CD28 and the CD3 ζ -chain was stably expressed by lentiviral gene transfer in primary human T- cells and the transduced T-cells were then enriched to >90 % via a CD34-derived hinge domain using the MACS technology. To assess the cytotoxic potential of the genetically modified T-cells, they were co-cultured with HNSCC cell lines for 16 hours and then the lysis of the HNSCC cells was determined by flow cytometry or with a cell-based proliferation assay. This showed that the lysis efficiency of the genetically modified T- cells depended predominantly on the antigen density on the target cells: cell lines with higher CD44v6 expression levels (UM14C, UM11B) were already efficiently lysed at low target-to-effector cell ratios, while the naive UT24A cells with low CD44v6 expression were hardly eliminated. Lentiviral overexpression of CD44v6 then significantly increased the lysis of UT24A cells by the CAR T-cells, indicating the specificity of the CD44v6 CAR.

In this work, a CD44v6-targeted CAR T-cell therapy was established, by which HNSCC cells can be efficiently eliminated *in vitro* in a short time period. Future approaches should better protect the CAR T-cells from the immunosuppressive tumor microenvironment of HNSCC and additionally develop combination therapies that further optimize the lysis efficiency against the malignant cells and largely circumvent toxicity against CD44v6-positive healthy tissues.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
A. dest.	<i>Aqua destillare</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCMA	B-Zell-Reifungsantigen
BFP	Blaufloreszierendes Protein
BIWA	Antikörper Bivatuzumab
BIWI1	Mertansin-konjugierter Antikörper Bivatuzumab
bp	Basenpaar(e)
CAIX	Carboxy-Anhydrase-IX
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CM	Kostimulatorisches Molekül
CMV	Zytomegalievirus
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Repeats</i>
CRS	<i>Cytokine Release Syndrome</i>
CSPG4	Chondroitinsulfat-Proteoglycan 4
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DOK	Dysplastische orale Keratinozyten
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	Europäische Arzneimittel Agentur
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül

ERBB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homologue</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	α -Folate Receptor
g	Gramm
GD2	Disialogangliosid
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
h	Stunde(n)
HDAC	Histondeacetylase
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i> (Zelllinie)
HeLa.P3	Etablierte Zervixkarzinomzelllinie
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIV	Humanes immundefizientes Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HOK	Humane orale Keratinozyten
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV-tk	Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase
iCAR	Inhibitorischer chimärer Antigenrezeptor
IFN-α	Interferon-alpha
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL13Rα2	Interleukin-13-Rezeptor-alpha-2
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
JAK	Januskinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
KHPEK	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom
KO	<i>Knock Out</i>
l	Liter
LB	<i>Luria broth</i>
LV	Leervektor
MACS	Magnetische Zellseparation
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MM	Multiples Myelom
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mCi/m²	Milicurie pro Quadratmeter
ml	Mililiter
mM	Milimolar
min	Minute(n)
MTS	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium</i>
MUC1	Mucin-1
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein-1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
pmol	Pikomol

PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>Single Chain Fragment of the Variable Region</i>
sec	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SUPRA	<i>Split, universal and programmable</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tbl.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TM	Transmembran-Domäne
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>
TPS	<i>Tumor Proportion Score</i>
TP53	Tumorsuppressorgen P53
TRUCK	<i>T-cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing</i>
TSA	Tumorspezifisches Antigen
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UD	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien, etabliert in Düsseldorf
UM	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom -Zelllinien, etabliert in Michigan
UT	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom -Zelllinien, etabliert in Turku
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Faktor
vgl.	vergleiche
VSV	vesikuläres Stomatitisvirus
wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent
+	positiv

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome und die bisherige Therapie	1
1.2	T-Zell-Therapie mit chimären Antigenrezeptoren	5
	Aufbau und Funktion chimärer Antigenrezeptoren	6
	CARs in klinischen Studien	8
1.3	Potenzielle CAR-Zielproteine bei KHPEK	11
1.4	Zielprotein CD44v6	14
1.5	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Medium, Puffer und Lösungen	18
2.1.3	Antibiotika	19
2.1.4	Kits, Enzyme und Längenstandard.....	19
2.1.5	Oligonukleotide	20
2.1.6	Plasmide	20
2.1.7	Zelllinien.....	22
2.1.8	Antikörper	22
2.1.9	Software.....	23
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1	Primer- <i>Annealing</i>	23
2.2.2	DNA-Plasmid-Restriktion.....	23
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.4	Ligation	24
2.2.5	Transformation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	24
2.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	24
2.2.7	DNA-Sequenzierung	25
2.3	Zellkultur-Methoden	25
2.3.1	Kultivierung von adhärenenten eukaryotischen Zelllinien	25
2.3.2	Kryokonservierung von Zelllinien.....	25
2.3.3	Gewinnung und Aktivierung von primären T-Zellen	26

2.3.4	Lentivirale Vektorproduktion und Transduktion.....	26
2.3.5	Zellseparation via MACS.....	28
2.3.6	Durchflusszytometrische Analyse.....	28
2.3.7	Zytotoxizitätsassay via Durchflusszytometrie	29
2.3.8	Zytotoxizitätsassay via Zellproliferationsmessung (MTS)	29
3	Ergebnisse	31
3.1	CD44v6-Expression auf KHPEK-Zelllinien	31
3.1.1	Überexpression von CD44v6 und CD44s auf KHPEK-Zellen	31
3.1.2	Screening der CD44- und CD44v6-Genexpression in KHPEK-Zelllinien	33
3.2	Zytotoxizität der auf primären humanen T-Zellen exprimierten CARs.....	37
3.2.1	Expression der CAR-Konstrukte auf primären humanen T- Zellen .	37
3.2.2	Zytotoxizitätsassays der CAR-T-Zellen mit KHPEK-Zelllinien.....	40
3.2.3	Die Lyse der malignen Zellen korreliert mit der Höhe ihrer Antigenexpression	42
3.2.4	Spezifität der CD44v6-CAR ⁺ -T-Zellen gegenüber ihrem Zielantigen	44
4	Diskussion	46
4.1	CD44v6 als Zielantigen für die CAR-T-Zell-Therapie von KHPEKs	46
4.2	CAR-Optimierung zur Therapiekontrolle	53
4.3	Probleme und Lösungen zur Behandlung solider Tumorentitäten	55
4.4	Potenzial von CAR-T-Zellen in Kombinationstherapien	57
5	Literaturverzeichnis	61
6	Anhang.....	85
6.1	Auflistung der Abbildungen	85
6.2	Auflistung der Tabellen	86

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome und die bisherige Therapie

Mit einer Inzidenz von mehr als 890.000 Patienten jährlich weltweit stellen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (KHPEK) die sechsthäufigste globale maligne Tumorentität dar¹. Es erkrankten zwei- bis viermal mehr Männer als Frauen². Mehr als 90 % der Tumore im Kopf-Hals-Bereich sind Plattenepithelkarzinome³, die vom Schleimhautepithelgewebe der oberen Atemwege ausgehen und je nach ursprünglichem Entstehungsort in Mundhöhlen-, Nasopharynx-, Oropharynx-, Hypopharynx- und Larynx-Tumore klassifiziert werden, wobei sie sich sekundär auf mehrere Bereiche ausbreiten können¹.

Die primäre Metastasierung von KHPEK erfolgt abhängig von der Lokalisation des Primärtumors lymphogen in die Halslymphknoten und kommt bei 26-80 % der Fälle vor⁴. Eine meistens sekundäre hämatogene Metastasierung in periphere Organe wie die Leber oder die Lunge ist jedoch gerade bei sehr großen Primaria sowie beim Auftreten von sekundären Metastasen und/oder Rezidiven des Primärtumors mit einem Vorkommen von 10 % möglich^{5,6}. Rezidive treten in 50 % der Fälle auf und sind ebenso wie Metastasen oftmals limitierend für den weiteren Krankheitsverlauf⁷.

Zu den häufigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von KHPEK gehören der Alkohol- und/oder Nikotinkonsum^{8,9}. Im Speziellen bei Oropharynxkarzinomen spielt zudem die Infektion mit onkogenen humanen Papillomaviren (HPV, vornehmlich die Subtypen 16 und 18) eine wesentliche Rolle^{10,11}. HPV-positive Oropharynxkarzinome bilden eine eigene Entität und grenzen sich auf molekularer Ebene durch ein differentes Profil deutlich von HPV-negativen Karzinomen ab. Klinisch zeigen sie ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie¹².

Die Tumore werden nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, die die Tumorausdehnung (T), einen möglichen Lymphknotenbefall (N) sowie Metastasierungen (M) beschreibt¹³. Die aktuelle 8. Version der TNM-Klassifikation für KHPEKs wurde 2017 veröffentlicht und umfasst als größte Änderung im Vergleich zur vorangegangenen 7. Version die Einführung des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms als eigene Entität¹⁴. Die immunhistochemische Färbung des bei HPV-positiven Tumoren regelhaft überexprimierten p16-Proteins wird dabei als indikativ für eine HPV-Infektion gewertet, ohne dass diese spezifisch nachgewiesen werden muss¹⁷. Aufgrund der besseren Überlebenswahrscheinlichkeit entspricht die Stadieneinteilung der HPV-positiven Oropharynxkarzinome im Vergleich zu den HPV-negativen einem faktischen

Downstaging und so einer Anpassung der TNM-Klassifikation an die klinischen Studienergebnisse der letzten Jahre¹⁷.

Bei der Primärdiagnose stellen die Operation des Primärtumors mit oder ohne Sanierung der Halslymphknoten durch eine *Neck Dissection*, eine oftmals Platin-basierte Chemotherapie und die lokale Bestrahlung des Primarius und ggf. der Metastasen die möglichen kurativen Behandlungsoptionen für KHPEK-Patienten dar, die auch in Kombination angewendet werden^{18–20}. Die jeweilige Therapie orientiert sich an Leitlinien, welche als Handlungsempfehlung in der onkologischen Behandlung dienen, jedoch können Patienten-individuelle Voraussetzungen dazu führen, dass Therapien daran angepasst werden^{21–24}. Im Falle einer chirurgischen Tumorresektion wird eine vollständige Tumorfreiheit des verbleibenden Gewebes, ein sog. R0-Status mit einem Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe angestrebt, da ansonsten mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit zu rechnen ist²⁵. Wird dieser R0-Status nicht erreicht oder ist er aus Gründen der Funktionalität nicht möglich, muss über eine Nachresektion oder adjuvante Radio(chemo-)therapie entschieden werden^{23,26,27}.

Bei höheren Tumorstadien mit einer großen Wahrscheinlichkeit okkulten lymphogener Metastasierung oder bei bereits vorhandenem klinischem Halslymphknotenbefall wird im Rahmen einer operativen Therapie eine *Neck Dissection* der betroffenen und ggf. der Gegenseite durchgeführt²⁸. Prognostisch negative Faktoren wie das Vorhandensein eines extranodalen Wachstums von Lymphknotenmetastasen, ein R1-Status oder ein ausgedehnter Metastasierungsstatus (hoher N-Status, Infiltration benachbarter Strukturen) erfordern zudem regelhaft eine adjuvante Radiochemotherapie^{26,32}.

In der Situation einer Metastasierung und/oder eines rezidierten Karzinoms haben zudem seit einigen Jahren Immuntherapien Einzug in die klinische Routine erhalten^{30,31}. *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGFR) wird zu 80-90 % auf KHPEK exprimiert³² und eignet sich daher als Zielantigen bei KHPEK. Der gegen EGFR gerichtete Antikörper Cetuximab wurde im Jahr 2006 in Kombination mit Radiotherapie für das fortgeschrittene Kopf-Hals-Karzinom sowie später in Kombination mit Platin-basierter Chemotherapie für fortgeschrittene, metastasierte KHPEK zugelassen^{33,34}. In einer palliativen Situation kann Cetuximab alleinig als Erhaltungstherapie verabreicht werden, wobei durch die Kombinationstherapie ein besseres Überleben als durch die Monotherapie erreicht wird³⁵.

Als innovative Immuntherapie konnten **immunologische Checkpointinhibitoren** wie Nivolumab und Pembrolizumab^{37,38} für die Therapie des rezidierten und/oder metastasierten KHPEK eingeführt werden. Checkpointinhibitoren sind monoklonale Antikörper, die Rezeptoren oder ihre Liganden auf u. a. KHPEK sowie Immunzellen

blockieren und dadurch eine gesteigerte Immunantwort vermitteln³⁹. Oftmals sind sie auf Tumorgewebe im Sinne eines *Immune Escape*-Mechanismus hochreguliert⁴⁰. Bei einem dieser Checkpoint-Rezeptoren handelt es sich um das Transmembranprotein *Programmed Cell Death Protein-1* (PD-1) auf T-Zellen, das nach Bindung durch seinen Liganden PD-L1 auf Tumorzellen inhibitorische Signale in den T-Zellen auslöst, was dann zu einer Verminderung z. B. der Aktivität, der Proliferation und der IL-2-Freisetzung führt⁴¹. Durch die Inhibition von PD-1 mit einem PD-1-Checkpointinhibitor, wie Nivolumab und Pembrolizumab, wird daher eine gesteigerte Immunaktivität aller T-Zellen im Körper vermittelt⁴².

Die Zulassung von **Nivolumab** für KHPEK erfolgte 2017 zur Anwendung nach erfolgloser Platin-basierter Chemotherapie in der *2nd line*-Therapie⁴³. **Pembrolizumab** ist seit 2018 in der *2nd line*- und folgend auch in der *1st line*-Therapie zugelassen⁴⁴. Im Rahmen der KEYNOTE-48-Studie und der CheckMate-141-Studie konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Nivolumab und Pembrolizumab neben dem Gesamtüberleben der Patienten auch die Lebensqualität verbesserte^{37,38}.

Für die Therapie sollte eine Expression des Checkpoints der Tumor- bzw. Tumor- und Immunzellen im Vorfeld nachgewiesen werden: Abhängig von der PD-L1-Expression lässt sich der CPS (*Combined Positive Score*) ermitteln, anhand dessen sich die Indikationsstellung für die Checkpointinhibitor-Therapie ergibt²². Der CPS wird aus der Anzahl PD-L1-positiver Zellen (Tumor- und Immunzellen) dividiert durch die Gesamtzahl vitaler Tumorzellen mal 100 errechnet⁴⁶. Ab einem Score ≥ 1 ist eine Therapie mit einem Checkpointinhibitor in Kombination mit Chemotherapie oder alleinig (v.a. bei CPS ≥ 20) zugelassen (KEYNOTE-048-Studie)³⁸. Der TPS (*Tumor Proportion Score*) zeigt das Verhältnis PD-L1-positiver zu vitalen Tumorzellen in Prozent an⁴⁶. Es konnte für KHPEK gezeigt werden, dass Pembrolizumab im Vergleich zur Standardtherapie bei einem TPS $\geq 50\%$ zu einem besseren Gesamtüberleben führt (KEYNOTE-040-Studie)⁴⁷.

Neben den PD-1-Antikörpern wurden auch monoklonale Antikörper gegen PD-L1, wie **Durvalumab** oder **Atezolizumab**, in klinischen Phase I/II/III-Studien bei KHPEK untersucht. Durvalumab wurde im Rahmen der KESTREL Phase III-Studie, die 2022 publiziert wurde, mit oder ohne den CTLA-4-Antikörper Tremelimumab bei rezidiertem oder metastasiertem KHPEK angewendet und mit dem EXTREME-Regime (Cetuximab sowie Cisplatin/Carboplatin und Fluorouracil mit Cetuximab-Erhaltungstherapie im Anschluss) verglichen. Bei hoher PD-L1-Expression konnte durch Durvalumab ein mit dem EXTREME-Schema vergleichbarer Therapieeffekt erzielt werden und zudem ein länger währendes Therapieansprechen sowie eine geringe Toxizität gezeigt werden (NCT02551159)⁴⁸. 2023 wurden Ergebnisse der COTEST Phase II-Studie veröffentlicht,

die die Gabe von Cobimetinib (Proteinkinase-Inhibitor) plus Atezolizumab bei soliden Tumoren untersuchte, u. a. bei KHPEK, die entweder mit PD-1-/PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren vorbehandelt oder dahingehend naiv waren. Die Checkpointinhibitor-vorbehandelten Patienten zeigten kein Therapieansprechen, der Effekt bei der nicht vorbehandelten Kohorte wurde als moderat eingestuft. Insgesamt kam es zu tolerierbaren Toxizitäten (NCT03264066)⁴⁹. Botticelli *et al.* sehen Anhaltspunkte dafür, dass PD-L1-Checkpointinhibitoren bei Frauen, Lokalrezidiven und HPV-positiven Tumoren der PD-1-basierten Therapie überlegen sind⁵⁰. Bei bestimmten klinischen Indikationen führte die Behandlung mit Durvalumab oder Atezolizumab also zu einer Verbesserung der Prognose, sie hat bisher aber keine klinische Zulassung für die Therapie von KHPEK erhalten.

Ipilimumab ist ein Checkpointinhibitor, der sich gegen *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4* (CTLA-4) richtet und für die Behandlung maligner Melanome bereits seit 2011 zugelassen ist⁵¹. CTLA-4 interagiert als Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und vermittelt dadurch ko-inhibitorische Signale, die die weitere T-Zell-Aktivierung und -Proliferation einschränken. Dabei konkurriert CTLA-4 beispielsweise mit dem strukturverwandten CD28 um die Bindung von APCs, wobei es den Vorteil einer höheren Affinität aufweist. Durch die CTLA-4-Blockade wird die Einschränkung der T-Zell-basierten Immunantwort ausgeschaltet⁵². In einer Phase-Ib-Studie (NCT01935921) wurde der Checkpointinhibitor Ipilimumab in Kombination mit Cetuximab und Bestrahlung zwischen Juli 2013 und Mai 2016 an 18 KHPEK-Patienten des Stadiums III erfolgreich getestet. Die Ipilimumab-Dosis wurde nach sechs Patienten toxizitätsbedingt reduziert und von den 12 weiteren Patienten ohne Dosis-limitierende Toxizitäten toleriert. Es kam lediglich zu reversiblen Nebenwirkungen wie Dermatitis, Colitis und Hyperthyreoidismus. Das Gesamt-Überleben der Patienten lag bei 72 %⁵³. Im Jahr 2022 wurden von Haddad *et al.* die Ergebnisse der Phase III-Studie CheckMate-651 mit über 900 Patienten publiziert, in der die Gabe von Nivolumab plus Ipilimumab gegenüber dem EXTREME-Schema bei Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem KHPEK untersucht wurde. Zwar zeigte das mittlere Gesamtüberleben beider Verfahren keine wesentlichen Unterschiede, die Therapie mit Nivolumab plus Ipilimumab erwies sich jedoch als verträglicher, da weniger hochgradige Nebenwirkungen auftraten (NCT02741570)⁵⁴. Die Kombination von Nivolumab und Ipilimumab wurde in der Phase II-Studie CheckMate-714 bei rezidivierten und metastasierten KHPEK auch gegenüber Nivolumab allein untersucht (NCT02823574), ohne – bei ähnlichem Nebenwirkungsprofil – einen Vorteil der Kombinationstherapie feststellen zu können⁵⁵.

Trotz aller klinisch zugelassenen Therapieoptionen versterben nach wie vor die Hälfte der KHPEK-Patienten jährlich an ihrer Tumorerkrankung¹. Bei zunehmenden Erfolgen immuntherapeutischer Ansätze bei anderen Tumorentitäten⁵⁶ ist es deshalb erstrebenswert, auch bei KHPEK die Immuntherapie um zusätzliche Optionen zu bereichern⁴⁵. In den letzten 10 Jahren konnte die zelluläre Immuntherapie mit autologen, genetisch veränderten T-Zellen von Patienten mit infausten hämatologischen Erkrankungen sehr große therapeutische Erfolge erzielen und hat insbesondere die Therapie von malignen Erkrankungen der B-Zellreihe revolutioniert^{57–59}. Deshalb wird zur Zeit von vielen Arbeitsgruppen auf der Welt untersucht, ob und wie die zelluläre Immuntherapie auch bei KHPEK möglichst optimal eingesetzt werden kann^{60,61}.

1.2 T-Zell-Therapie mit chimären Antigenrezeptoren

Klassische T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung

T-Zellen gehören zur Gruppe der Lymphozyten und sind Teil des menschlichen Immunsystems mit der Aufgabe, den Körper vor infizierten oder transformierten Zellen zu schützen⁶². Auf ihnen finden sich natürlicherweise T-Zell-Rezeptoren (TCR), die aus jeweils einer α - und β -Polypeptidkette aufgebaut und über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der einzelne TCR interagiert dann in dem sog. TCR-Komplex mit δ / ϵ - und γ / ϵ -Heterodimerketten sowie ζ -Homodimeren des CD3-Komplexes⁶³, wodurch aktivierende Signale vermittelt werden. Mit Hilfe der TCRs können die T-Zellen fremde Peptide des Histokompatibilitätskomplexes (MHC = *Major Histocompatibility Complex*), beim Menschen auch HLA (humane Leukozytenantigene) genannt, MHC-abhängig erkennen und dann nach Aktivierung die erkannten APC töten/eliminieren⁶⁴. Diese Eliminierung wird über die Sekretion lytischer Moleküle wie Perforin zur Zellmembran-Destruktion sowie Granzym B vermittelt, aber auch durch die Hochregulierung von Todesrezeptorliganden, die bei Bindung der Immuneffektorzelle an die Zielzelle Apoptose induzieren⁶⁵. Die TCRs von CD4⁺-T-Helferzellen interagieren mit Peptiden auf MHC-II-Molekülen, die prozessierten Peptide präsentieren, während zytotoxische CD8⁺-T-Zellen über MHC-I-Moleküle Peptide erkennen/binden^{66,67}.

Für die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zelle sind **drei Signale** wichtig: Erstens präsentiert die APC dem TCR der T-Zelle ein kurzes Peptid auf ihrem MHC-Komplex und aktiviert dadurch die CD3 ζ -Kette durch Phosphorylierung von Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungsmotiven (ITAMs, Engl.: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)⁶⁴. Zweitens liefert die Interaktion der Oberflächen-Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der APC mit dem CD28-Rezeptor auf der T-Zelle das entscheidende Kostimulationssignal zur Differenzierung und Proliferation, wobei diese

Kostimulation auch andere strukturverwandte Moleküle der B7-Familie mit ihren Liganden herbeiführen können⁵². Drittens treiben Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- γ), IL-2 und IL-6 (proinflammatorisch) oder IL-10 (antiinflammatorisch) die Proliferation und Differenzierung oder Seneszenz und Apoptose der T-Zelle voran^{62,68}. Tumorzellen können sich der klassischen Immunüberwachung durch T-Zellen entziehen, indem sie die MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche herunterregulieren und dadurch von T-Zellen über den TCR nicht als fremd oder bösartig erkannt werden⁶⁹.

Aufbau und Funktion chimärer Antigenrezeptoren

Das Einbringen eines chimären Antigenrezeptors (CARs) in autologe T-Zellen umgeht den TCR-Komplex und die MHC-Restriktion bei der Antigenbindung und stellt somit eine Möglichkeit zur direkten Tumor-Antigen-Bindung mit konsekutiver T-Zell-Aktivierung dar⁷⁰. CARs sind synthetische Moleküle, die im Wesentlichen aus einem antigenbindenden Einzelkettenfragment (scFv, Engl.: *single chain fragment of the variable region*) bestehen, das über eine *hinge* mit einer Transmembrandomäne (TM) und mit zytoplasmatischen T-Zell-Rezeptorsignaleinheiten verbunden ist (**Abb. 1**)^{70,71}. Im Gegensatz zum nativen TCR erkennen CARs direkt Zielantigene, die auf der Tumorzelloberfläche exprimiert werden⁷². Daher werden die CAR-T-Zellen nach Erkennung des Tumorantigens MHC-unabhängig aktiviert, sezernieren lytische Moleküle wie Granzym B und Perforin und regulieren FasL, den Liganden eines Apoptose-induzierenden Todesrezeptors, hoch, um die malignen Zielzellen zu eliminieren⁶⁵. Zusätzlich führt die Sekretion entzündungsfördernder und proliferativer Zytokine zur Aktivierung weiterer Immunzellen und treibt die T-Zell-Expansion voran⁷⁴.

Die **Antigenbindedomäne** des CARs besteht meistens aus einer schweren und einer leichten Kette eines monoklonalen Antikörpers, die über einen flexiblen Peptidlinker miteinander verbunden sind und ein Epitop auf dem Zielantigen der Tumorzellen binden⁷⁵. Die Affinität des scFvs ist kritisch für die CAR-Wirksamkeit, wobei CARs mit hoher Affinität in der Regel gut gegen Tumore mit geringer Antigendichte eingesetzt werden können, da sie immer noch zu einer starken Aktivierung und Tumorzelllyse führen⁷⁶. Jedoch kann eine zu hohe CAR-Affinität auch eine Überstimulation mit CAR-T-Zell-Tod oder eine *on-target*, aber *off-tumor* Toxizität auf gesundem Gewebe zur Folge haben⁷⁷. Bei einer geringen scFv-Affinität erfolgt möglicherweise eine zu niederschwellige oder keine CAR-T-Zell-Aktivierung⁷⁸.

Die **hinge** des CARs verbindet die Antigenbindedomäne mit der Transmembrandomäne und verleiht dem CAR die nötige Stabilität und Flexibilität, damit das scFv sein Zielepitop erreichen kann⁷⁹. Daher werden Epitope, die sich in der Nähe der Membran befinden

oder in Bereichen mit starker Glykosylierung liegen, mit längeren *hinges* oft besser erreicht. Im Gegensatz dazu können kurze *hinges* besser sein, wenn sich das Epitop auf dem Zielantigen distal von der Membran befindet^{78–83}. Fragmente von Immunglobulinen (IgG1 oder IgG4) waren aufgrund von Kreuzreaktionen mit Fc-Rezeptoren z. B. auf myeloischen Zellen in der Vergangenheit nicht ideal, da es durch die Bindung über die *hinge* zur unspezifischen T-Zell-Aktivierung und in der Folge zur *off-target*-Toxizität kam⁸⁴. Die *hinge* kann nicht nur als Verbindungsmotiv zwischen scFv und Transmembrandomäne dienen, sondern kann auch mit Erkennungs- und Anreicherungsmarkern ausgestattet werden^{85–87}.

Über die **Transmembrandomäne** werden die extra- und intrazellulären Anteile des CARs miteinander verbunden und der CAR so stabil in der T-Zell-Membran verankert⁸⁸. Häufig werden Domänen von Proteinen verwendet, die natürlicherweise auf T-Zellen exprimiert werden, wie CD8 oder CD28, um eine hohe und stabile Expression sowie eine lange Persistenz der CAR-T-Zellen *in vivo* zu gewährleisten⁸⁹.

Die **intrazellulären Signaldomänen** vermittelt nach Antigenbindung Aktivierungs- und kostimulierende Signale, wodurch die Proliferation und Persistenz von T-Zellen gefördert wird⁹⁰. CARs der **ersten Generation** enthalten nur eine CD3ζ-Kette, die einem TCR-Komplex als Signalmotiv entstammt^{91,92}. Erste-Generation-CARs haben keine kostimulatorische Domäne, wodurch sie zwar *in vitro* und *in vivo* über den CAR antigenträgende Tumorzellen erkennen können, aber ohne ein kostimulatorisches Signal von den Tumorzellen keine ausreichende Aktivierung der CAR T-Zellen induziert wird, wodurch Proliferation, Zytokinproduktion und damit Persistenz stark reduziert werden und eher Anergie auftritt⁹³. Bei den CARs der **zweiten Generation** wurde eine Kostimulationsdomäne für zusätzliches intrazelluläres Signal integriert⁹⁴ (**Abb. 1**). Anfangs wurde CD28 als kostimulatorische Domäne zur signalgebenden ζ-Domäne im CAR hinzugefügt, was zu einer deutlichen Steigerung der autokrinen Produktion von IL-2 und der Zytotoxizität führte^{95,96}. Später wurden auch andere kostimulatorische Domänen wie CD27, OX40, 4-1BB, 2B4 und ICOS verwendet, die alle die Proliferation und Persistenz von T-Zellen verbessern^{97–100}. Zahlreiche klinische Studien haben die Wirksamkeit von autologen CAR-T-Zellen der zweiten Generation gezeigt, die in der Lage sind, das Tumorwachstum auch *in vivo* zu kontrollieren, sodass es schließlich zur Zulassung mehrerer CAR-Therapien durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) und die europäische Arzneimittel Agentur (EMA) kam^{101,102}.

Während die **dritte CAR-Generation** zwei statt nur ein kostimulatorisches Signal in Kombination mit der CD3ζ-Kette enthält^{100,103–105}, erlaubt die **vierte Generation**, auch bekannt als TRUCKs (Engl.: *T-cells Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing*),

Einleitung

die aktivierungsabhängige Expression von anderen Transgenen wie IL-12, IL-7 oder IL-18, um die Immunantwort weiter zu verbessern¹⁰⁶. Dies führt zu einer stärkeren lokalen Produktion von Zytokinen innerhalb der Tumormikroumgebung und verbessert somit die Bedingungen für die T-Zell-Persistenz in soliden Tumoren^{107–109}. Zur Zytokinfreisetzung über einen NFAT/IL-2-Promoter im CAR-Konstrukt kommt es allerdings erst nach Antigenbindung und CAR-T-Zell-Aktivierung^{109,110}.

Bei CARs der **fünften Generation** ist ein Zytokinrezeptordomäne z. B. von der IL-2R β -Kette in die intrazellulären Domänen integriert¹¹¹. Durch Aktivierung des CARs wird zusätzlich noch der STAT/JAK-Signalweg induziert und dadurch werden u. a. entzündliche Zytokine freigesetzt, die wiederum eine CAR-T-Zell-Aktivierung und -Proliferation verursachen. Diese CARs zeigten eine überlegene Proliferation und Tumorkontrolle sowie eine geringere T-Zell-Erschöpfung (*Exhaustion*) als vergleichbare CARs der zweiten Generation¹¹².

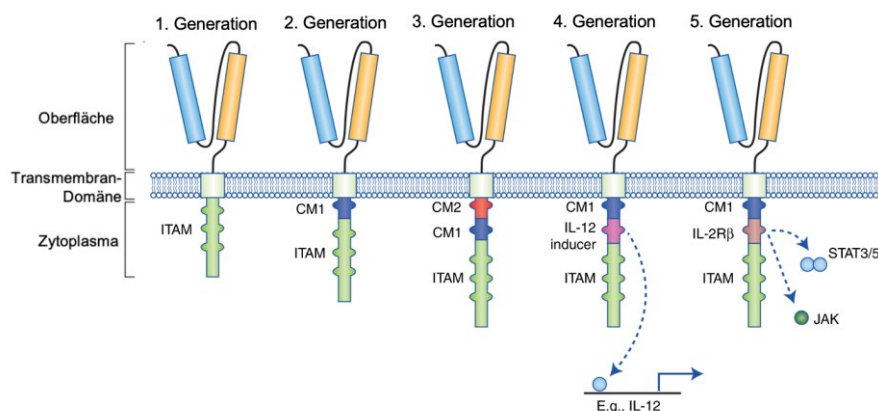


Abbildung 1: Aufbau und Entwicklung der CAR-Generationen

Die 1. Generation von CARs besitzt ITAMs der CD3 ζ -Kette im zytoplasmatischen Anteil. Die 2. Generation enthält zusätzlich ein kostimulatorisches Molekül (CM), während bei der 3. Generation zwei kostimulatorische Moleküle enthalten sind. Die CARs der 4. Generation, auch als TRUCKs bezeichnet, induzieren nach Aktivierung der T-Zellen zusätzlich die Expression von Zytokinen. Die 5. Generation beinhaltet zusätzlich in der zytoplasmatischen Domäne eine Zytokinrezeptor-Signaleinheit aus der IL-2-Rezeptor- β -Kette. (Abbildung modifiziert nach¹¹¹.)

CARs in klinischen Studien

Schon 1989 wurde der CAR der ersten Generation beschrieben⁸⁹, doch es dauerte bis zum Anfang der 2000er Jahre, bis den CARs kostimulatorische Anteile hinzugefügt wurden und somit die CARs der zweiten Generation entstanden¹¹⁴. Bislang wurde insbesondere für hämatologische Erkrankungen der Einzug der CAR-Therapie in die Klinik erreicht, wobei vor allem das Zielantigen CD19 mit diesen Erfolgen assoziiert ist¹¹⁵. Inzwischen liegt die Anzahl registrierter CAR-Studien bei etwa 1.300 (<https://www.clinicaltrials.gov>, Stand Juli 2023), die zumeist in den USA, aber auch in China und Europa initiiert wurden^{116,117}. Bis dato wurden in den USA und Europa sechs

CAR-Produkte zur klinischen Anwendung bei 12 Indikationen zugelassen, die u. a. großzellige B-Zell-Lymphome, B-Zell-ALL und Mantelzelllymphome umfassen¹¹⁴.

Leider ist der Erfolg der CAR-T-Zell-Therapie bei hämatologischen Indikationen nicht gleichermaßen auf solide Tumore zu übertragen. Dies erklärt auch die Verteilung der bisher hauptsächlich getesteten Zielantigene: Bis 2016 wurden die meisten klinischen Studien mit CARs gegen **CD19**, **CD22** und **CD30** als Zielantigene durchgeführt; bei den soliden Tumoren wurden vor allem zu **CEA**, **ErbB2/Her2neu** und **Mesothelin** klinische Studien durchgeführt¹¹⁶. Inzwischen sind viele weiteren Antigene hinzugekommen. So haben Labanieh *et al.* 2023 CAR-Zielantigene mit klinischer Evidenz zusammengefasst: Während **CD19**, **CD20**, **CD22**, **CD30**, **CD7**, **CD38** und **κ light chain** für hämatologische/nicht-solide Malignome angegeben wurden, nannten die Autoren für solide Tumore das Disialogangliosid **GD2**, den Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2 (**HER2**), **EGFR**, den Interleukin-13-Rezeptor-alpha-2 (**IL13Rα2**), **Mesothelin**, **Claudin-18.2** und das Prostataspezifisches Membranantigen (**PSMA**)¹¹⁴. Bisher gibt es allerdings weltweit keine Zulassung für eine CAR-Therapie von soliden Malignomen.

Eines der vielen **Probleme bei soliden Tumoren** ist die **heterogene Antigenexpression** der bisher getesteten Zielstrukturen auf den Tumorzellen – sowohl im Vergleich zwischen verschiedenen Patienten mit der gleichen Tumorentität als auch in den verschiedenen Tumorlokalisationen im gleichen Patienten¹¹⁸. In den klinischen Studien selbst wurde beobachtet, dass die Tumoren durch Immunevasionsprozesse (z. B. aufgrund genetischer Instabilität) ihr **Zielantigen** verlieren (**Antigen Escape**)^{88,119–121}, sodass die CAR T-Zellen die malignen Zellen nicht mehr erkennen/abtöten können und eine Tumorprogression auftritt¹²². Eine hohe Antigendichte auf den Tumorzellen kann sich in diesem Zusammenhang als hilfreich erweisen, um auch bei niedriger CAR-Affinität Tumor- statt Normalgewebe zu binden und beim Abtöten der Zellen gesundes Gewebe zu schonen¹¹⁴.

Neben der Antigenexpression auf der Oberfläche der einzelnen Tumorzellen hat auch das **Tumor Microenvironment (TME)** aufgrund seiner negativen immunsuppressiven Wirkung eine wesentliche Bedeutung für den Erfolg von klinischen Studien. In der Tumorumgebung solider Tumore fehlt häufig der Effekt kostimulatorischer Moleküle und es wird eine ausgeprägte Immunsuppression der CAR-T-Zellen induziert, z. B. durch hohe Konzentrationen von immunsuppressiven Zytokinen wie z. B. IL-10 oder *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β)¹²⁰, durch die Expression von Checkpoint-molekülen wie PD-L1/2, B7-H3 oder LAG3 auf den Tumorzellen und durch die Präsenz von inhibitorischen Zellen wie regulatorischen T-Zellen, *myeloid-derived suppressor cells* oder tumor-assoziierten Fibroblasten. Zusätzlich entsteht eine metabolisch

ungünstige Tumorumgebung mit hohem Laktatspiegel, saurem pH-Wert, Hypoxie und oxidativem Stress¹²⁰. Das Erreichen und Infiltrieren des Tumors (*Trafficking*) und auch das Überleben von CAR-T-Zellen wird durch alle diese Faktoren erschwert¹²¹.

Dem TME wird in den bisherigen klinischen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen begegnet; trotzdem bleiben Schwierigkeiten, wie folgende Untersuchungen beispielhaft zeigen: In einem Ansatz wurde ein CAR entwickelt, der im Epitop der Carboxy-Anhydrase-IX (CAIX) bindet, die häufig in klarzelligen Nierenzellkarzinomen überexprimiert ist. Patienten, die trotz einer Tumornephrektomie und einer Therapie mit Interferon-alpha (IFN- α) einen *progressive disease*-Status zeigten, erhielten CAIX CAR-T-Zellen. Unter der Therapie fielen bei den ersten drei Patienten Leberwerterhöhungen auf, die durch den Angriff nicht-maligner Leberzellen durch die CAR-T-Zellen zu erklären und somit als **on-target off-tumor-Toxizität** zu werten waren. Die Therapie wurde daraufhin abgebrochen und es kam in allen drei Fällen zu einem Tumorprogress (*progressive disease*)¹²³.

Für Ovarialkarzinome testete eine Phase I-Studie einen α -*Folate Receptor* (FR1)-CAR auf autologen T-Zellen. Eingeschlossen wurden Patienten mit rezidiertem oder residualem epithelialem FR-positivem Ovarialkarzinom, bei denen mit der Standardtherapie inkl. Cisplatin/Carboplatin oder Paclitaxel kein Ansprechen erzielt werden konnte. Bei keinem der vierzehn Patienten in der Studie konnte eine Verringerung der Tumormasse nach der Infusion der FR1-CAR-T-Zellen beobachtet werden. Da die CAR-T-Zellen das Tumorgewebe schlecht infiltrierten und ihre Anzahl auch im zirkulierenden Blut rasch abnahm, wurde das Therapieversagen auf das erfolglose Tumor-*Trafficking* mit konsekutiv **unzureichender Proliferation und Persistenz** der CAR-T-Zellen zurückgeführt¹²⁵.

Prinzipiell könnte die CAR-T-Zell-Therapie für alle Patienten sinnvoll sein, die unter einem Tumorrezidiv oder ausbleibendem Therapieerfolg unter den Standardtherapien leiden. Durch die Vor-Therapien ist es jedoch möglich, dass das patienteneigene T-Zell-Kompartiment stark geschädigt ist und es nicht gelingt, für eine wirksame CAR-Therapie die autologen T-Zellen zu nutzen; hier werden in der Zukunft auch allogene T-Zellen genutzt werden müssen, aber dieser Ansatz setzt zwingend voraus, dass die Alloreaktivität der alloenen T-Zellen z. B. durch *Knockouts* der T-Zell-Rezeptor-alpha- und -beta-Ketten kontrolliert werden kann¹¹⁵. Sowohl bei der Infusion von alloenen als auch bei autologen CAR-T-Zellen ist es notwendig, vorher nicht-myeloablativ Chemotherapien zur Lymphodepletion zu verabreichen⁵⁶, um den genetisch veränderten T-Zellen das Überleben im Körper zu erleichtern.

1.3 Potenzielle CAR-Zielproteine bei KHPEK

Durch das Antigen-bindende scFv eines monoklonalen Antikörpers kann die CAR-T-Zell-Therapie grundsätzlich gegen verschiedenste Oberflächenantigene gerichtet sein¹¹¹. Als Ziel können u. a. **tumorassoziierte Antigene (TAA)** dienen, welche zwar auf Tumorgeweben stark, in geringerer Dichte aber auch auf gesundem Normalgewebe exprimiert sind¹²⁶. Außerdem werden von den malignen Zellen auch noch **Keimbahn-Antigene** (z. B. *cancer testis antigens*) oder **Neo-Antigene** exprimiert. Letztere können im Zuge der Kanzerogenese durch spezifische Mutationen zu tumor-spezifischen Antigenen (TSA) werden¹²⁷.

Die Heterogenität von Antigenen auf KHPEK-Tumorzellen mit unterschiedlich hoher Expression erschwert die Festlegung geeigneter Zielstrukturen für CAR-T-Zellen^{60,120}; einige potenzielle Kandidaten sind jedoch in präklinischen und klinischen CAR-Studien bereits getestet worden und im Folgenden näher beschrieben.

HER2/neu (ERBB2) ist eine Rezeptortyrosinkinase der EGFR-Familie, die über intrazelluläre Signalkaskaden zellproliferative Prozesse vermittelt¹²⁸. Physiologischerweise besitzt ERBB2 selbst keinen direkt bindenden Liganden, meistens entsteht eine intrazelluläre Aktivierung durch Heterodimerisierung mit anderen ERBB-Rezeptoren¹²⁸. Auf malignen Zellen kann es durch Mutationen oder Genamplifikationen zu einer Daueraktivierung der Rezeptortyrosinkinase kommen, die dann mit oder auch ohne Ligandenbindung Proliferations- und *Pro-survival*-Signale intrazellulär vermittelt^{129,130}. In einer klinischen Phase-I-Studie wurden CAR-T-Zellen mit einem ein pan-ERBB-CAR-Konstrukt mit CD28- und CD3ζ-Intrazellulärdomäne und mit einem chimären IL-4-Zytokinrezeptor zur spezifischen Stimulation direkt in die Tumoren von KHPEK-Patienten gegeben. Interessanterweise kam es zu keiner dosislimitierenden Toxizität bei den Injektionen der CAR-T-Zellen; allerdings entwickelten einige Patienten u. a. eine reversible Lymphopenie, Tumorschwellungen, Schmerzen, Fieber und Fatigue. Bei einer Zwischenauswertung konnte bei 69 % der Patienten durch die Therapie eine gewisse Tumorkontrolle erreicht werden. Wichtig war auch, dass die CAR-T-Zellen zwar für eine Zeitlang im Tumor persistierten, aber nicht in der Peripherie nachgewiesen werden konnten (NCT01818323)¹³¹.

Der **epidermale Wachstumsfaktor EGFR (ERBB1)** ist eine Rezeptortyrosinkinase der ERBB-Familie, die auf 80 % der KHPEK überexprimiert wird¹³⁰ und die Grundlage der etablierten Therapie mit Cetuximab für rezidierte oder metastasierte KHPEK darstellt³⁴, welcher als monoklonaler Antikörper in der *1st line*-Therapie bei KHPEK zusammen mit

einer Chemotherapie oder auch in Kombination mit der Strahlentherapie klinische Anwendung findet¹³². Durch die Bindung von EGF werden Signalwege induziert, die Zellwachstum und Proliferation vermitteln¹³³. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass eine vermehrte Expression von EGFR und der anderen Mitglieder der ERBB-Familie das Tumorwachstum fördert und mit einer schlechten Krankheitsprognose bei KHPEK assoziiert ist¹³⁴. Die Gabe von blockierenden Antikörpern wie Cetuximab oder auch Tyrosinkinaseinhibitoren kann deshalb eine wirkungsvolle Therapie sein, die potenziell zur Verbesserung der Prognose bei KHPEK-Patienten geeignet ist. Aufgrund der physiologischen Expression von EGFR müssen aber bei Ansätzen, die gegen EGFR gerichtet sind, mögliche Toxizitäten (*on-target off-tumor*) bedacht werden. Da EGFR relativ stark auf Keratinozyten in der Haut exprimiert wird¹³⁵, kommt es im Rahmen der Anwendung von Cetuximab regelmäßig auch zu Hauttoxizitäten¹³⁶, die natürlich auch im Rahmen der CAR-Therapie auftreten können.

Feng *et al.* publizierten 2016 Ergebnisse einer Phase I/II-Studie (NCT01869166) zur Gabe von EGFR-CAR-T-Zellen bei 11 Patienten mit fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Die Patienten erhielten die Therapie alleinig oder in Kombination mit Chemotherapie. Bei 5 Patienten war ein stabiler Krankheitsverlauf, bei 2 Patienten ein Teilansprechen und bei 4 Patienten einen Progress zu beobachten. Interessanterweise fielen die Nebenwirkungen/Toxizitäten der Therapie (Hautreaktionen, Übelkeit und Dyspnoe sowie Hypotension) relativ mild aus¹³⁷. Im Jahr 2021 wurden Ergebnisse einer Phase I/II-Studie (NCT03182816) von Zhang *et al.* veröffentlicht, in der Patienten mit rezidiertem oder therapierefraktärem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom EGFR-spezifische CAR-T-Zellen erhielten. Nur ein Patient zeigte eine 13 Monate anhaltende Teilremission, während sechs im Status der *stable disease* blieben und zwei Patienten einen Progress hatten. Es traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf, am häufigsten kam es zu Fieber¹³⁸.

Das Oberflächenprotein **Chondroitinsulfat-Proteoglycan 4 (CSPG4)** wird bei KHPEK ebenfalls vermehrt exprimiert und ist an Tumormigration, -invasion und -metastasierung beteiligt, indem es Zelladhäsion und Zellmotilität vermittelt^{139,140}. In einer Studie in einem murinen Xenotransplantationsmodell wurde ein CSPG4-CAR-Konstrukt mit CD28 und CD3 ζ als *Signaling*-Domänen gegen humane Melanom-, KHPEK- und Mamma-Karzinomzelllinien verwendet¹⁴¹. *In vivo* verringerten die humanen CAR-T-Zellen das Tumorwachstum erheblich, jedoch führte die Therapie zu keiner anhaltenden Remission oder vollständigen Tumoreliminierung. Die Autoren vermuteten, dass die humanen T-Zellen nur kurze Zeit im Tumor der immundefizienten Mäuse persistierten, was den

Therapieerfolg limitierte¹⁴¹. CSPG4-CAR⁺-T-Zellen wurden zudem *in vitro* an Chondrosarkom-, Glioblastom- und Leukämie-Zellen erfolgreich getestet. Es konnte in allen Studien eine effektive Lyse der malignen Zielzellen durch die CSPG4-CAR-Konstrukte erreicht werden^{142–144}.

Ein weiteres auf KHPEKs exprimiertes Antigen ist das Transmembranprotein **Mucin-1 (MUC1)**, das dem Tumormarker CA15-3 entspricht¹⁴⁵. MUC1 gehört zur Mucin-Familie von Glykoproteinen und spielt aufgrund seiner exzessiven Glykosylierung eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Schleimhautbarriere¹⁴⁶. MUC1 ist auch ein Onkogen, das in unterschiedlichen Signalwegen in Zellen aktiv ist und Wachstum, Apoptose, Metastasierung und Differenzierung beeinflussen kann¹⁴⁷. Viele epitheliale Tumorzellen überexprimieren MUC1; dabei ist allerdings die Glykosylierung häufig inkomplett, sodass immunologische (Neo-)Epitope im Proteingrundgerüst von MUC1 für Antikörper zugänglich werden¹⁴⁷. Mehrere Gruppen haben deshalb monoklonale Antikörper entwickelt, die überwiegend die Tumor-assoziierten Glykoformen von MUC1 erkennen und in CAR-Konstrukten genutzt werden können. Zum Beispiel haben Posey *et al.* *in vitro* und in murinen Xenotransplantationsmodellen gezeigt, dass gegen pathologische MUC1-Glykoformen gerichtete CAR-T-Zellen bei leukämischen Zellen sowie Pankreaskarzinom-Zellen zu tumorspezifischer Zytotoxizität in der Lage waren¹⁴⁸. Für KHPEK zeigten Mei *et al.* 2019 *in vitro* und im Mausmodell, dass ihr MUC1-spezifischer CAR der zweiten Generation (MUC1-CAR) KHPEK-Zellen effektiv lysierte, wobei der Effekt sich durch zusätzlich IL-22-sezernierenden CAR-T-Zellen der vierten Generation (TRUCKS, MUC1-IL22-CAR) noch steigern ließ; hierbei regulierte IL-22 die MUC1-Expression auf den Tumorzellen hoch, was sich positiv auf die T-Zell-Proliferation und -Persistenz auswirkte¹⁴⁷. Im Februar 2022 wurde in den USA eine multizentrische Phase I-Studie für diverse solide Malignome (inkl. KHPEK) gestartet, die die Anwendung und Dosierung von MUC1-CAR-T-Zellen bei fortgeschrittenen Tumoren untersucht (NCT05239143). In ihrem 2023 erschienenen *Review* unterstreichen Summers *et al.*¹⁴⁹ das Potenzial von MUC1 als CAR-Zielantigen für KHPEK, da Kombinationen mit anderen immunologischen Ansätzen aufgrund der Tumorassoziation der pathologisch glykosylierten MUC1-Formen sehr attraktiv erscheinen. Ein interessantes Beispiel hier ist das Split-CAR-Design von Wilkie *et al.*¹⁵⁰, bei dem zwei inkomplette CAR-Konstrukte der ersten Generation (der ERB2-CAR mit der ζ -Kette und der MUC1-CAR mit der CD28 Signaldomäne) nur bei Koexpression der beiden Konstrukte auf einer T-Zelle spezifisch diejenigen Tumorzellen erkannt und getötet haben, die beide Zielantigene koexprimierten. Allerdings war die zytotoxische Aktivität und die Zytokinfreisetzung der T-Zellen mit den beiden erste

Generation-CAR-Konstrukten deutlich geringer als die Effekte, die mit den zweite Generation-CAR-Kontrollkonstrukten (mit starker CAR-T-Zell-Aktivierung) beobachtet wurden¹⁵⁰.

Das **epitheliale Zelladhäsionsmolekül**, engl. *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (**EpCAM**) ist ein weiteres Oberflächenprotein, das als TAA auf KHPEK beschrieben ist¹⁵¹. Das Transmembranprotein vermittelt Zellkontakte sowie Zellmigration, -proliferation und -differenzierung. Eine vermehrte Glykosylierung von EpCAM bewirkt eine höhere Stabilität und Expression des Proteins auf malignen Zellen¹⁵². EpCAM diente bereits als Zielantigen klinischer CAR-Studien bei soliden Tumoren: In Kombination mit dem Oberflächenprotein Transmembranes 4 L6-Familienmitglied 1 (**TM4SF1**) wird EpCAM in einer 2019 geöffneten Phase I-Studie als bispezifischer CAR bei Pankreas-, kolorektalem, Magen- und Lungenkarzinom untersucht (NCT04151186), 2016 startete eine EpCAM-CAR-Studie für Patienten mit metastasierten Nasopharynx-Neoplasien, Brustkrebs-Rezidiven sowie metastasiertem Magenkarzinom (NCT02915445) und seit 2017 rekrutiert eine Phase I-Studie Patienten mit vorbehandeltem hepatozellulärem Karzinom für die Therapie mit EpCAM-CAR-T-Zellen (NCT03013712), wobei die Ergebnisse derzeit ausstehen.

1.4 Zielprotein CD44v6

Das Glykoprotein **CD44v6** ist eine Spleißvariante des CD44-Gens auf Chromosom 11, das als KHPEK-assoziiertes Antigen für CAR-T-Zell-Therapieansätze beschrieben ist^{153,154} und in dieser Arbeit als Zielstruktur für die Entwicklung einer CAR-T-Zell-Therapie für KHPEK ausgewählt wurde. CD44v6 ist als eine Isoform des Antigens CD44 an der Zelloberfläche lokalisiert, wo es Kontakte zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix vermittelt, um so die Integrität des Gewebes zu fördern, kann aber, je nach Auswirkung der Interaktion von CD44v6 mit seinen Liganden wie Hyaluronsäure, Osteopontin, Kollagen oder Matrix-Metalloproteinasen¹⁵⁶, durch proteolytische oder degradierende Prozesse an der extrazellulären Matrix auch an Tumorwachstum, -differenzierung und -metastasierung beteiligt sein¹⁵⁵.

Das CD44-Gen hat 20 Exons und besitzt 3 konstante Domänen (extrazellulär, transmembranär und zytoplasmatisch). Durch Spleißen entstehen verschiedene Isoformen mit varianten Exons, die zwischen den konstanten *Upstream*- (Exon 1-5) und *Downstream*-Regionen (Exon 16-20) (**Abb. 2**) zu finden sind¹⁵⁷. Alternatives Spleißen verschiedener Exons sowie posttranslationale Modifikationen des Moleküls, wie u. a. Unterschiede in der Glykosylierung, erzeugen ein reichhaltiges Repertoire an CD44-

Einleitung

Isoformen (CD44v), von denen einige Schlüsselrollen beim Wachstum und der Metastasierung solider Tumorzellen zu spielen scheinen. Konformationsänderungen aufgrund des alternativen Spleißens von Exons und/oder posttranslationaler Modifikationen des Moleküls, die auch in normalen Geweben zelltypspezifisch sein können, erzeugen daher unter Umständen CD44-Varianten, die sich der Immunerkennung entziehen¹⁵⁵. CD44s ist die Isoform von CD44, bei der sich in der mRNA kein variables Exon zwischen den konstanten mRNA-Sequenzen befindet¹⁵⁷, während bei CD44v6 zusätzlich das Exon 11 als variantes Exon nach dem Spleißvorgang verbleibt¹⁵⁸ (**Abb. 2**, erstellt und modifiziert nach¹⁵⁷).

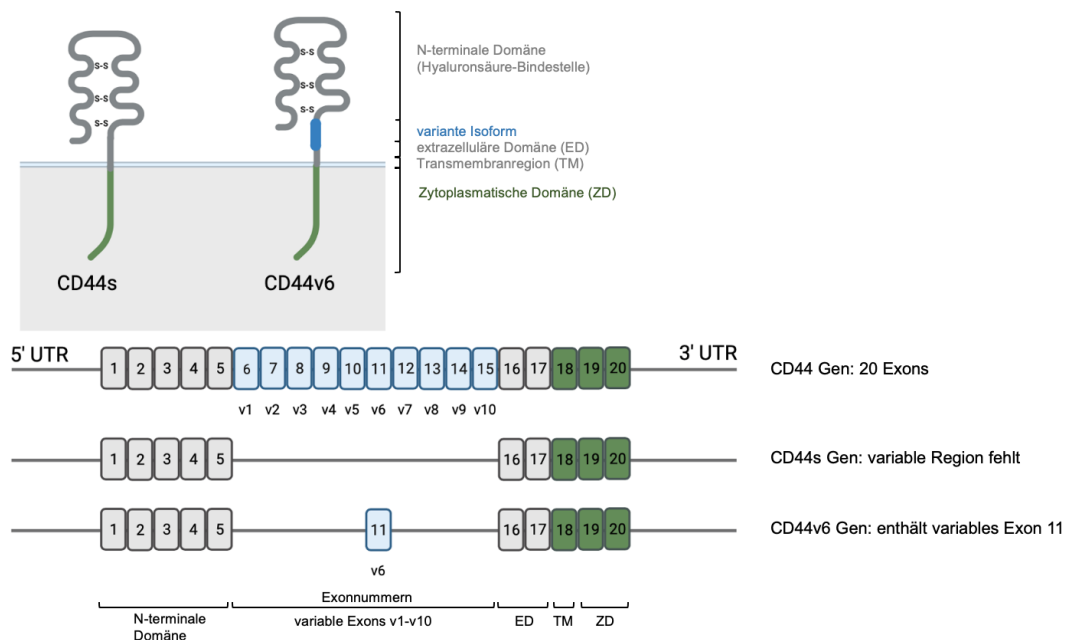


Abbildung 2: Schematische Darstellung von CD44 und den varianten Isoformen CD44s und CD44v6 als Oberflächenproteine und auf Exonebene

CD44v6 wird auf KHPEK stark überexprimiert und kann als diagnostischer und prognostischer Marker genutzt werden¹⁵⁹. Die Expression von CD44v6 ist nicht tumorspezifisch, da diese Spleißform mit schwächerer Expression auch auf normalen Plattenepithelzellen (z. B. Hautkeratinozyten) und Monozyten vorkommt^{157,161–163}. Eine Überexpression von CD44v6 ist ebenso auf anderen Tumorentitäten beschrieben, wie z. B. beim Kolon-, Ösophagus-, Pankreas-, Mamma- und Ovarialkarzinom sowie Nierenzellkarzinom^{164–168}.

Wahrscheinlich gibt es eine direkte Korrelation zwischen der gesteigerten Expression von CD44v6 und einer erhöhten Aggressivität und Metastasierung der malignen Zellen. An Brustkrebs-Zellen wurde eine CD44v6-assoziierte Tumoraggressivität im Sinne einer Invasionstendenz und eines abgeschwächten Therapieansprechens beschrieben¹⁶⁹,

sodass auf CD44v6-abzielende Behandlungsoptionen möglicherweise ein besseres Therapie-*Outcome* erzielen könnten.

CD44v6 rückte auch als Zielantigen für CAR-therapeutische Therapieansätze in den Fokus. Casucci *et al.* entwickelten im murinen Xenotransplantationsmodell eine effektive und nebenwirkungsarme CD44v6-CAR-T-Zell-Therapie gegen akute myeloische Leukämie (AML) und multiples Myelom (MM)¹⁷⁰. Allerdings ist hier anzumerken, dass humane CD44v6-Antikörper und somit auch CARs Spleißformen von CD44 in der Maus nicht erkennen und somit dieses Mausmodell nicht für die Evaluation von *on-target off-tumor* Toxizitäten geeignet ist.

In der Vergangenheit waren zunächst murine Antikörper gegen CD44v6 wie BIWA1 und U36 verfügbar, die imstande waren, unterschiedliche Epitope von CD44v6 zu binden¹⁷¹. BIWA1 und U36 fanden Anwendung im Bereich der Radionukleotid-markierten Antikörperrnutzung, jedoch kam es bei BIWA1 häufiger als bei U36 zu einer humanen Anti-Maus-Antikörper-Antwort bei der Anwendung im Patienten¹⁵⁸. Als Versuch, die Immunogenität der murinen Antikörper zu verringern, wurden zunächst BIWA2 als chimärer Antikörper und schließlich die humanisierten Antikörper BIWA4 und BIWA8 entwickelt, die eine bessere Tumoraффinität bei geringer Immunogenität besaßen. BIWA4 zeigte eine insgesamt geringere Tumoraффinität als der hochaffine Antikörper BIWA8, allerdings wurde für BIWA4 eine höhere Anreicherung im Tumor festgestellt¹⁷².

In zwei Phase-I-Studien von Tijink *et al.* und Riechelmann *et al.* wurde ein mit dem Toxin Mertansin konjugierter CD44v6-Antikörper Bivatuzumab (BIWI1) bei Patienten mit KHPEKs getestet, wobei zwar eine Aktivität des zytotoxischen Mertansins gegen den Tumor beobachtet wurde, es aber zu schwerwiegenden Nebenwirkungen mit Todesfolge in einem Fall kam, was zum Studienabbruch führte^{153,163}.

1.5 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit war – aufbauend auf dem hochaffinen Antikörper BIWA8 – die Etablierung eines CD44v6-CAR-Konstruktes der zweiten Generation gegen KHPEK-Zelllinien *in vitro*. Daraus ergaben sich folgende Zielsetzungen:

1. Charakterisierung der CD44v6-Spleißform auf KHPEK als potenzielles Ziel für eine CAR-T-Zell-Therapie.
2. Herstellung und Aufreinigung von primären humanen CD44v6-CAR⁺-T-Zellen.
3. Bestimmung der Zytotoxizität und Spezifität von CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegen KHPEK-Zelllinien.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Hersteller Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Applichem (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.1.2 Medium, Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Medium, Puffer und Lösungen

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l D-glucose, Pyruvate, GlutaMAX™-I (#31966-021, Gibco® by Life Technology™, Darmstadt, Deutschland)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media (#I3390, Sigma Aldrich)
OKM	Oral Keratinocyte Medium (#2611, ScienCell, CA, USA) mit festem Zusatz von 5 ml Oral Keratinocyte Growth Supplement (OKGS, #2652) und 5 ml Antibiotic Solution (Penicillin/Streptomycin, #0503)
Mediumzusätze	10 % Fetal Bovine Serum, heat-inactivated (#10500-064, Gibco® by Life Technology™) 1 % Penicillin/Streptomycin (#15140-122, Gibco® by Life Technology™) 200 mM L-Glutamin (#25030-024, Gibco® by Life Technology™) 1000 U/μl IL-2 (Chiron, Marburg) MycoZap™ Prophylactic (#VZA-2032, Lonza, Basel, Schweiz)
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (#T3924, Sigma Aldrich)
Accutase®-Lösung	in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Ca ⁺⁺ oder Mg ⁺⁺ (#A6964, Sigma Aldrich)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (#14190-094, Gibco® by Life Technology™)
Gelatine-Lösung (0,1 %)	1 g Gelatine aus Schweinehaut (#G1890, Sigma Aldrich) ad 1 l A. dest.
RetroNectin®	Recombinant Human Fibronectin Fragment (#T100B, Takara Bio Europe, Frankreich)
MACS Puffer	0,5 % Albumin aus bovinem Serum (#A7906-10G, Sigma Aldrich) 2 mM EDTA in PBS, pH 7,2
Erythrozyten-Lyse Puffer	8,99 g NH ₄ CL 1 g KHCO ₃ 40 μl 0,5 M EDTA ad. 1 l A. dest, pH 7,3
PEI	Polyethylenimin, 1 mg/ml (#MKBK7352V, Sigma Aldrich)
Propidiumiodid-Lösung	0,5 μg/ml Propidiumiodid (PI) (#P4864, Sigma Aldrich) in PBS
Protaminsulfat	1 μg/μl (#P4020, Sigma Aldrich) in A. dest.
DAPI	Diamidinphenylindoldihydrochlorid (#D9542, Sigma Aldrich)
DMSO	Dimethylsulfoxid (#D8418, Sigma Aldrich)

Material und Methoden

Ficoll-Paque™ PLUS	#17-1440-03, GE Healthcare (München)
LB-Medium	20 g Luria Bertani Broth (#L3022, Sigma Aldrich) aufgefüllt mit 1 l A. dest.
LB-Agar	37 g Luria Bertani Agar (#L2897, Sigma Aldrich) aufgefüllt mit 1 l A. dest.
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l A. dest., pH 8,5
Probenpuffer (10x)	250 mg Bromphenylblau 250 mg Xylene Cyanol 33 ml 150 mM Tris pH 7,6 60 ml Glycerine Ad. 100 ml A. dest.
NEBuffer™ 2.1	#B7202S, NEB (Frankfurt am Main)

2.1.3 Antibiotika

Tabelle 2: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Konzentration
Ampicillin	#A5354-10, Sigma-Aldrich	100 µg/ml
Puromycin	#A11138-03, Gibco® by Life Technology™	1-2 µg/ml
Penicillin, Streptomycin	#15140-122, Gibco® by Life Technology™	10000 Units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin

2.1.4 Kits, Enzyme und Längenstandard

Tabelle 3: Kits, Enzyme und Längenstandard

Kits	Hersteller
Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Maxi	#740414100, Macherey-Nagel (Düren)
High Pure PCR Product Purification Kit	#11732676001, Roche (Grenzach-Whylen)
PureYield™ Plasmid Miniprep System	#A1222, Promega (Walldorf)
CD34 MicroBead Kit	#130-046-702, Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	#G358B, Promega
Enzyme	
T4-DNA-Ligase	#M0202M, NEB
Restriktionsenzyme	NEB
DNA-Längenstandard	
GeneRuler 1 kb plus DNA ladder	#SM1333, Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

2.1.5 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 4: Oligonukleotide

#	Sequenz 5' zu 3'	Funktion
		Sequenzierung
184	GGACCTGAAATGACCCTGCG	<i>Forward</i> -Primer, bindet in der SFFV U3 Kasette
257	CTAGGAATGCTCGTCAAGAAG	<i>Reverse</i> -Primer, bindet in der HAT Site
545	GGACCTGAAATGACCCTGCG	<i>Forward</i> -Primer, bindet im MPSV-Promotor
997	CATTAAAGCAGCGTATCCACATAGCG	<i>Reverse</i> -Primer, bindet im WPRO-Element
2074	CTTCTAACATGCGGTGACGTGG	<i>Forward</i> -Primer, bindet in der T2A Site
2075	CCAAGTCACCGCATGTTAGAAG	<i>Reverse</i> -Primer, bindet in der T2A Site
		Primer-Annealing
CD44s_fw	AATTCCTGCCACCAGAGACCAGGA CACATTTTCATCCTAGCGGCG	<i>Forward</i> -Primer, bindet im CD44s, genutzt für Fragment 2
CD44s_rev	GGATCCGCCGCTAGGATGAAATG TGTCTGGTCTCTGGTGGCAGG	<i>Reverse</i> -Primer, bindet im CD44s, genutzt für Fragment 2

2.1.6 Plasmide

Klonierungsvektoren

pMK_RQ_CD44v6c6	Kommerzieller Vektor von GeneArt (Thermo Fisher Scientific), beinhaltet die Kodon-optimierte Sequenz des CD44v6-scFv
puc57_CD44v6	Kommerzieller Vektor von BioCat GmbH (Heidelberg), beinhaltet Kodon-optimierte cDNA von CD44v6

Helferplasmide

pCD/NL-BH	CMV-Promoter gesteuerter Expressionsvektor für HIV <i>gag/pol</i> und zusätzliche akzessorische/regulatorische Gene; <i>Envelope</i> - und Verpackungs-Signale, sind durch Deletion inaktiviert ¹⁷³
pczVSV-G wt	Expressionskonstrukt für das Glycoprotein G des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) ¹⁷⁴

Lentivirale Expressionsvektoren

Eine schematische Darstellung eines selbstinaktivierenden (SIN) lentiviralen Vektors, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in **Abb. 3** dargestellt. Der 5'-Long Terminal

Repeat (LTR) besteht aus einem Zytomegalievirus (CMV)- abgeleiteten Promotor, gefolgt von der R- und U5-Region. Darüber hinaus beinhaltet der Vektor Sequenzen für das Verpackungssignal (Ψ), das Rev-bindende-Element (RRE) und den zentralen Polypurintrakt (cPPT). Die Transgenkassette wird von einem internen Promotor (iP) angetrieben. Um mehr als ein Transgen zu exprimieren, wird das HAT-Element (*Internal Ribosome Entry Site*) oder eine T2A Site verwendet. WPRO (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, optimiert) fördert den mRNA-Transport und die Stabilität. Auf das WPRO folgt der 3'-LTR, bestehend aus einer Δ U3-, R- und U5-Region.

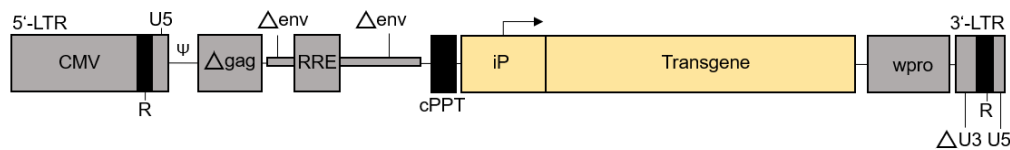


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines SIN lentiviralen Vektors

Plasmid

puc2CL7I2Pcowo Lentiviraler Vektor mit einem HAT-Element und ein Kodon-optimiertes Puromycin-Resistenzgen unter Kontrolle des SFFV-U3-Promoters.

+ Insert

puc2CL7CD44v6I2Pcowo

puc2CL7CD44sl2Pcowo

CD44-Isoform

CD44v6

CD44s

Plasmid	scFv	Marker
p2CL21BFPT2ACD19c6CD28	CD19	Blaufloreszierendes Protein (BFP)
p2CB21BFPT2ACD44v6c6CD28z	CD44v6	
p2CB21BFPT2ACD5c6CD28z	CD5	

Die CAR-Expressionsplasmide enthalten einen MPSV-Promotor sowie BFP als Marker, das über eine T2A Site mit der Expressionskassette des CARs verbunden ist. Die CARs bestehen aus dem scFv, einer CD34 abgeleiteten c6-*hinge*, CD28 als Transmembran- und zytoplasmatische Domäne sowie aus einer CD3 ζ -Kette.

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
HEK293T	Hergestellt aus HEK293-Zellen, humane embryonalen Nierenzellen, die das <i>large T</i> -Antigen SV40 stabil exprimieren. SV40 kann an SV40-Enhancer von Expressionsvektoren binden und erhöht die Proteinproduktion. Zusätzlich ist eine Neomycin-Resistenz enthalten.	175,176
HOK	Humane orale Keratinozyten, ScienCell, #2610	177
DOK	Dysplastische orale Keratinozyten	178
HeLa.P3	Zervixkarzinomzelllinie	179
UM14C	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Mundbodenkarzinom)	180–182
UM14C EGIN	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Mundbodenkarzinom), die lentiviral mit einer EGFP-IRES-Neomycin-Kassette transduziert wurde. Nach Selektion mit Geneticin exprimiert diese Zelllinie stabil EGFP.	179
UM11B	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Supraglottiskarzinom)	180–182
UT24A	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Zungenkarzinom)	183,184
UT24A CD44v6 ⁺	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Zungenkarzinom), die CD44v6 durch Überexpression verstärkt exprimiert	183,184
UT24A LV	Humane Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie (Zungenkarzinom), die einen lentiviralen Leervektor exprimiert	183,184

2.1.8 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden nach Herstellerangaben zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet.

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Hersteller
CD44v6 PE-Vio 770, human, Klon REA706, #130-111-239	Miltenyi Biotec
CD44 PE, human, Klon DB105, #130-113-335	Miltenyi Biotec
CD5 PE, human, Klon UCHT2, #130-119-942	Miltenyi Biotec
CD19 PE, human, Klon LT19, #130-113-169	Miltenyi Biotec
CD34 PE, human, Klon QBEND/10, #MA5-16927	Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Software

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden unter Verwendung von MACSQuantify™ Software und BD CellQuest Pro ausgewertet. Berechnungen des arithmetischen Mittels und des mittleren Standardfehlers wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Primer-Annealing

Die Methode des *Primer-Annealing* wurde durchgeführt, um die Insertion von doppelsträngiger, kurzer DNA in einen Vektor zu ermöglichen. Hierzu wurden zwei komplementäre Primer (je 12,5 µl, 100 µM) in einem Volumen von 50 µl bei 95 °C für 5 min inkubiert, anschließend erfolgte ein langsames Herunterkühlen auf RT in einem Biometra *Cycler*.

2.2.2 DNA-Plasmid-Restriktion

Die DNA-Plasmid-Restriktion umfasst das sequenzspezifische Schneiden von DNA mittels Enzymen. Diese Methode dient einerseits zur analytischen Identifizierung von Plasmiden und zum anderen zur präparativen Klonierung. Bei den genutzten Enzymen handelt es sich um Restriktionsendonukleasen vom Typ II, die meist palindromische Sequenzen erkennen. Durch die Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden können glatte bzw. überhängende Enden entstehen. Die beste Aktivität zeigt das Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und der angegebenen Inkubationstemperatur. Für diese Reaktion wurden in der Regel 2-5 U Restriktionsenzym für bis zu 5 µg DNA verwendet.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer unterschiedlichen Größe durch Anlegen einer Spannung zwischen 30 bis 130 V. Das Gel enthielt 1 % Agarose (aufgelöst in 1x TAE-Puffer) sowie 0,2 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10x Probenpuffer gemischt. Mit Hilfe des interkalierenden Ethidiumbromids wurden die aufgetrennten DNA-Banden durch einen UV-Transilluminator detektiert. Durch einen mitgeführten DNA-Standard-Größenmarker konnte den einzelnen Banden ihre entsprechende Größe zugeordnet werden.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese unter schwachem UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mittels *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) protokollgetreu aus der Agarose eluiert.

2.2.4 Ligation

Nach Restriktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde das *Insert* mit einem Vektor ligiert, der mit passenden Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Die T4 DNA-Ligase verknüpfte die 3'-Hydroxyl- und die 5'-Phosphategruppen der DNA-Fragmente und ligierte diese durch die Bildung von Phosphodiesterverbindungen. Im Ligationsansatz wurden Vektor und *Insert* im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und mit 2 U T4 DNA-Ligase und Ligationspuffer bei RT für 3 h inkubiert.

2.2.5 Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden oder Ligationsansätzen wurden One shot® Top 10 kompetente *E. coli*-Zellen von Invitrogen (Karlsruhe) genutzt. Zunächst wurden kompetente *E. coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut. 50 µl der Suspension wurden mit der Ligationsreaktion oder bei Re-Transformationen mit Plasmid-DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec, um die Permeabilität der *E. coli*-Membran und somit die Aufnahme der Plasmide zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Bakterien mit 250 µl LB-Medium in einem Schüttler bei 37 °C für 30 min inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien auf LB-Agar mit Ampicillin plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den Agar-Platten gewachsene Kolonien wurden gepickt und bei 37 °C schüttelnd über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin inkubiert. Die Plasmid-DNA, mit der jeweils gearbeitet wurde, enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen.

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde DNA entweder aus kleinen Bakterienkulturen (2-5 ml) mittels *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) extrahiert oder aus größere Mengen (100-150 ml) mit dem Kit *Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Maxi*.

Die Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer gelöst und die DNA-Quantifizierung über eine Spektrometrie gemessen (NanoDrop™ 1000, Thermo Fisher Scientific).

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Um die Sequenz der Klonierungsprodukte zu kontrollieren, wurde der Sequenzierungsservice von Microsynth SEQLAB (Göttingen) genutzt. Hierfür wurde die DNA in einer Konzentration von 70 ng/µl zusammen mit den erforderlichen Primern (10 µM) an das Labor geschickt.

2.3 Zellkultur-Methoden

2.3.1 Kultivierung von adhärenenten eukaryotischen Zelllinien

HEK293T, DOK und die KHPEK-Zelllinien wurden kultiviert in DMEM mit 4,5 mM Glukose und 2 mM GlutaMAX mit dem Zusatz von 10 % fetalem bovinem Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Bei allen KHPEK-Zelllinien wurde MycoZap™ Prophylactic zum Medium zugegeben, um Kontaminationen mit Mycoplasmen zu vermeiden. Bei den HOK wurde OKM mit Wachstumszusätzen sowie 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet.

Die Zellen wurden abhängig von ihrer Proliferationsrate passagiert, sobald eine Konfluenz von 80-90 % bestand. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin-EDTA und Inkubation für ca. 5 min bei 37 °C wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Trypsin-Reaktion konnte durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium gestoppt werden. Nach ausreichender Resuspendierung wurde für die weitere Kultivierung ein Teil der Zellsuspension (1:3 bis 1:15) in ein neues Zellkulturgefäß überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.2 Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Aufbewahrung der verwendeten Zelllinien wurden diese bei -80 °C eingefroren und danach langfristig in Flüssigstickstofftanks gelagert. Dafür wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin abgelöst und anschließend in ihrem Medium zentrifugiert (200 x g, 5 min, RT). Die entstehenden Zellpellets wurden in Einfriermedium (bestehend aus Kulturmedium, 8 % DMSO und zusätzlich 5 % hitzeinaktiviertem FBS) resuspendiert, in Kryo-Röhrchen transferiert und in speziellen Gefrierbehältern (Mr. Frosty, Nalgene, Thermo Fisher Scientific) schrittweise auf -80 °C heruntergekühlt. Nach ca. 24 h wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

2.3.3 Gewinnung und Aktivierung von primären T-Zellen

Gesunden, freiwilligen Spendern wurde peripher Blut abgenommen. Alle Spender waren Freiwillige und unterschrieben eine Einwilligung. Ein positives Ethikvotum durch das Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf liegt vor (#4687 und 4698R). Das abgenommene Spenderblut wurde anschließend mittels Ficoll-Paque-Zentrifugation in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt, um primäre humane T-Zellen zu gewinnen (**Abb. 4**). Nach dem Protokoll des Herstellers wurde das Blut mit DPBS resuspendiert und vorsichtig auf eine Ficoll-Schicht gegeben. Nach der Zentrifugation bildeten sich vier Schichten aus: Erythrozyten, Ficoll-Lösung, Lymphozyten mit Monozyten und Plasma mit Thrombozyten.

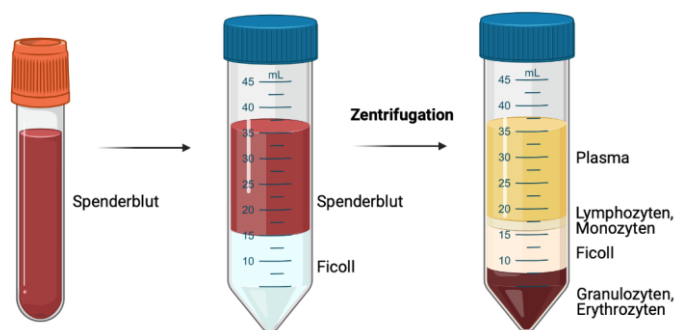


Abbildung 4: Ficoll-Zentrifugation zur Auftrennung von Blutbestandteilen

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

Die Lymphozyten-Schicht wurde aufgenommen, mit DPBS gewaschen und dann mit Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurden die Zellen in IMDM-Medium (mit dem Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 100 U/ml IL-2) kultiviert. Zur Stimulierung der T-Zellen erfolgte die Kultivierung in 6-well-Platten (*non tissue culture-treated*), die mit CD3- und CD28-Antikörpern (jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in PBS-Lösung) beschichtet waren. Die Platten wurden vorher bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach zwei Tagen Kultivierung konnten die expandierten T-Zellen für die Transduktion eingesetzt werden.

2.3.4 Lentivirale Vektorproduktion und Transduktion

Unter Transfektion versteht man die Aufnahme von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen¹⁸⁵. Für die Transfektion wurde das Polykation PEI verwendet, welches Nukleinsäure-bindende und -kondensierende Eigenschaften besitzt. Verschiedenste Zellarten können die Komplexe aus DNA und PEI effizient aufnehmen¹⁸⁶.

Am Tag vor der Transfektion wurden 5×10^6 HEK293T-Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml Medium mit Zusätzen ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Für die Transfektion wurden zwei Ansätze hergestellt:

Tabelle 7: Transfektions-Ansatz

1.	Volumen	
PEI-Ansatz	955 µl	DMEM ohne Zusätze
	45 µl	PEI (1 mg/ml)
	1000 µl	
2.		
DNA-Ansatz	982 µl	DMEM ohne Zusätze
	6 µl	Helferplasmid VSV-G (1 µg/µl)
	6 µl	Helferplasmid pCD/NL-BH (1 µg/µl)
	6 µl	Lentiviraler Vektor (1 µg/µl)
	1000 µl	

Der PEI- und DNA-Ansatz wurden gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Das Medium der HEK293T-Zellen wurde entfernt und durch 4 ml DMEM mit dem Zusatz von 15 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz auf die HEK293T-Zellen gegeben und erneut für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Das Medium wurde nach der Inkubation vorsichtig entfernt und durch 10 ml IMDM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin ersetzt.

Um am darauffolgenden Tag den produzierten extrazellulären Virusüberstand zu ernten, wurde das gesamte Medium mit einer 10 ml-Spritze aufgenommen und durch einen 0,45 µm großen Filter (Sarstedt, Germany) gegeben, um Zellen entfernen zu können und nur den Virus-enhaltenden Überstand zu gewinnen.

Transduktion von eukaryotischen Zelllinien

Für die Transduktion der adhärennten Zelllinien HEK293T und UT24A wurden 75×10^3 Zellen in 6-well-Platten plattiert und am darauffolgenden Tag mit dem geernteten Virusüberstand in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Puromycin-Selektion mit 1 µg/ml zwei Tage nach der Transduktion.

Transduktion von primären T-Zellen

Für die T-Zell-Transduktion wurden 1×10^6 T-Zellen (in 500 μ l IMDM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und zusätzlichem IL-2 (5x)) in 6-*well*-Platten (*non tissue culture-treated*) transferiert, die zuvor mit RetroNectin® (Takara) (2 μ g/cm² in PBS-Lösung) bei 4 °C über Nacht beschichtet wurden. Jeweils 2 ml des geernteten Virusüberstandes wurde zu den T-Zell-*wells* zugefügt. Für eine verbesserte Transduktionseffizienz wurde Protaminsulfat (8 μ g/ml) zu allen Virus-enthaltenden *wells* hinzugegeben¹⁸⁷. Ebenso wurden T-Zellen mit Medium, aber ohne Virus, parallel kultiviert, um als *no virus*-Kontrolle zu dienen. Die Inkubation fand bei 37 °C statt. Nach 24 h wurden 4 ml IMDM mit Zusätzen und 1x IL-2 hinzugefügt.

2.3.5 Zellseparation via MACS

Zur positiven Selektion transduzierter T-Zellen wurde das MACS® MicroBead System von Miltenyi Biotec gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt. In dieser Arbeit wurden eisenkonjugierte CD34-Antikörper verwendet, welche die CAR-positiven T-Zellen anhand der CD34-*hinge*-Region (c6) binden können.

Dafür wurden die transduzierten T-Zellen gewaschen und mit CD34 MACS® MicroBeads inkubiert. Die markierten Zellen wurden dann im magnetischen Feld eines MACS-Separators (OctoMACS Separator, Miltenyi, #130-042-109) platziert. Magnetisch markierte Zellen wurden in der Säule (MACS® Separation Columns MS, Miltenyi, #130-042-201) gehalten, während die nicht markierten Zellen hindurchliefen. Nach dreimaligem Waschen mit MACS-Puffer wurden positive Zellen mit MACS-Puffer aus den Säulen eluiert und mit PBS gewaschen. Die eluierten T-Zellen wurden in 1 ml IMDM mit Zusätzen und IL-2 für weitere 24 h inkubiert. Um die MACS-Effizienz zu untersuchen, wurden Proben vor und nach der Separation sowie aus dem Durchfluss gesammelt und durchflusszytometrisch mittels CD34-PE-Färbung analysiert.

2.3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Morphologie, Größe und Fluoreszenz der Zellen einer Probe gemessen. Das ermöglicht durch Markergene oder Antikörperfärbungen, verschiedene Zellpopulationen zu unterscheiden und zu quantifizieren.

Zur Zelldissoziation vor *Fluorescent Activated Cell Sorting* (FACS)-Analysen wurde Accutase® statt Trypsin verwendet, was eine weniger zellschädigende Wirkung auf die KHPEK-Zelllinien ausübt und verhindert, dass Zielantigene wie CD44v6 durch Trypsin

abgebaut werden, was so die falsche Messung nicht-intakter Zellen vermeiden kann¹⁸⁸. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem entsprechenden Antikörper in 100 µl MACS-Puffer gefärbt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen und in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Je nach Experiment war der MACS-Puffer zusätzlich mit Propidium Iodid (PI) oder Diamidinphenylindoldihydrochlorid (DAPI) zur Lebend-/Totfärbung gemäß dem Protokoll des Herstellers versetzt. Die Messung der Expression der Markergene und/oder der Antikörperfärbungen wurden entweder mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson) oder dem MACSQuant® Flow Cytometer (Miltenyi Biotec) durchgeführt.

2.3.7 Zytotoxizitätsassay via Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der Zytotoxizität CAR-transduzierter humaner primärer T-Zellen gegen KHPEK-Zelllinien wurde ebenfalls durchflusszytometrisch durchgeführt. Dazu wurden GFP+ KHPEK-Zelllinien in einer 24-*well*-Platte (*tissue culture treated*) in einem Volumen von 500 µl ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach einem Tag wurden MACS-selektierte transduzierte T-Zellen (und nicht transduzierte T-Zellen als Negativkontrolle) mit PBS gewaschen und in T-Zell-Medium (komplettes IMDM ohne IL-2) resuspendiert. Dann wurden 500 µl der T-Zell-Suspension mit den Zielzellen koinkubiert. Hierbei wurden verschiedene T-Zell- zu Zielzell-Verhältnisse verwendet:

- 10:1 (10x10⁴ T-Zellen, 1x10⁴ Zielzellen)
- 3:1 (3x10⁴ T-Zellen, 1x10⁴ Zielzellen)
- 1:1 (1x10⁴ T-Zellen, 1x10⁴ Zielzellen)
- 0,3:1 (3x10³ T-Zellen, 1x10⁴ Zielzellen)
- 0,1:1 (1x10³ T-Zellen, 1x10⁴ Zielzellen)

Nach 16 h wurde die Absterberate der Zielzellen durchflusszytometrisch ermittelt. Unter Zuhilfenahme von Trypsin wurden sämtliche Zellen eines *well*s geerntet, mit PBS gewaschen und in 300 µl MACS-Puffer + PI aufgenommen. Die Anzahl lebender und toter Tumorzellen wurde durch PI-Färbung und GFP-Signal ermittelt. CAR-T-Zellen konnten aufgrund ihres BFP-Markers detektiert werden.

2.3.8 Zytotoxizitätsassay via Zellproliferationsmessung (MTS)

In einem zweiten Ansatz wurden 20.000 Zellen der KHPEK-Zelllinien pro *well* einer Gelatine-beschichteten 96-*well*-Platte (*tissue culture treated*) in 100 µl DMEM ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zugabe von CAR-transduzierten humanen primären T-

Material und Methoden

Zellen erfolgte am zweiten Tag in einem Gesamtvolumen von 200 µl pro *well*. Auch hierbei wurden verschiedene T-Zell- zu Zielzell-Verhältnisse für 16 h inkubiert:

- 3:1 (6x10⁴ T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)
- 1:1 (2x10⁴ T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)
- 0,3:1 (6x10³ T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)
- 0,1:1 (2x10³ T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)
- 0,03:1 (6x10² T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)
- 0,01:1 (2x10² T-Zellen, 2x10⁴ Zielzellen)

Als Kontrolle wurden auch *blank-wells* sowie *wells*, die nur KHPEK- und keine T-Zellen in 200 µl DMEM enthielten, genutzt.

Das Ausmaß der Zytotoxizität wurde mittels CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) von Promega ermittelt. Zuerst wurde das Medium aller *wells* entfernt, dann die *wells* drei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen, um die T-Zellen zu entfernen und zum Schluss wurden 20 µl Tetrazolium als Substrat zugefügt, das von lebenden Zellen umgesetzt werden kann. Das gelbe Substrat wird durch Enzyme lebender Zellen in das unlösliche Formazan reduziert, das lila erscheint. Es kommt je nach Zellaktivität zu einem messbaren Farbumschlag im *well*. Mit dieser kolorimetrischen Methode ließ sich die Anzahl lebender Zellen detektieren, indem die Lichtabsorption bei 490 nm mit einem Platten-Messgerät (Sunrise™ Tecan) gemessen wurde, die mit der Aktivität und Anzahl lebender Zellen korreliert. Der Prozentsatz der Zielzellen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Prozentuale Lyse} = 100 \% - \left(\frac{\text{Absorption der mit T-Zellen inkubierten Zielzellen}}{\text{Absorption der Zielzellen}} \times 100 \right)$$

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde für die Eliminierung von KHPEK mithilfe von CAR-T-Zellen das Tumor-assoziierte Antigen (TAA) CD44v6, eine Spleißvariante von CD44, als Zielstruktur genutzt. Bei CD44 handelt es sich um ein membranständiges, aus 20 Exons bestehendes Protein mit 19 bekannten Strukturvarianten, die durch alternatives Spleißen von 10 variablen Exons entstehen¹⁵⁵. CD44v6 unterscheidet sich strukturell von der kürzesten Variante CD44s durch ein zwischen den konstanten Exons 1-5 und 16-20 in das Transkript eingeschlossenes Exon 11. CD44s, das ubiquitär auf Gewebe exprimiert wird, besitzt kein variables Exon und diente als Kontrolle (Kap. 1.3, Abb. 2)¹⁸⁹.

3.1 CD44v6-Expression auf KHPEK-Zelllinien

Um mithilfe von CAR-T-Zellen maligne KHPEK-Zellen zu eliminieren, muss das Zielantigen, an das der CAR bindet, auf den Tumorzellen vorliegen und kann je nach Affinität des CARs in der Expression variieren. Wir haben uns für CD44v6 als Zielantigen entschieden und die Expression dieser Spleißvariante und gleichzeitig die von CD44 auf 31 primären KHPEK-Zelllinien gemessen.

Um die Expression beider Rezeptorvarianten auf KHPEK-Zellen durchflusszytometrisch nachzuweisen, wurden fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper verwendet (Kap. 2.1.8), um beide Antigene auf Zellen von KHPEK-Zelllinien im FACS nachzuweisen.

3.1.1 Überexpression von CD44v6 und CD44s auf KHPEK-Zellen

Da die Zielantigene CD44s und CD44v6 auf unterschiedlichen Zelllinien lentiviral überexprimiert werden sollten, wurden zunächst die humanen cDNA-Sequenzen in den lentiviralen Leervektor (puc2CL7I2Pcowo) integriert. Die Sequenz der 1211 bp langen cDNA von CD44v6 wurde nach unseren Vorgaben kommerziell durch die Firma BioCat GmbH (Heidelberg) synthetisiert (Plasmid puc57_CD44v6) und über die Schnittstellen *XhoI* und *NheI* in den Vektor puc2CL7I2Pcowo integriert (**Abb. 5**).

Die CD44v6-cDNA (Plasmid puc57_CD44v6) wurde auch als *Template* für die Herstellung der 1082 bp langen cDNA Sequenz von CD44s genutzt, indem mittels *Primer Annealing* aus CD44_fw und CD44_rev (entspricht Fragment 2) der Sequenzabschnitt, der dem CD44v6-spezifischen Exon 11 entspricht, entfernt wurde. Die Herstellung des CD44s-Überexpressionsplasmids erfolgte mittels einer Vier-Fragmente-Ligation durch die Schnittstellen *XhoI*, *EcoRI*, *BamHI* und *NheI* in einem Zwischenvektor (**Abb. 5**). Das daraus resultierende CD44s-kodierende *Insert* wurde letztlich mithilfe der Schnittstellen *XhoI* und *NheI* in den Vektor puc2CL7I2Pcowo integriert.

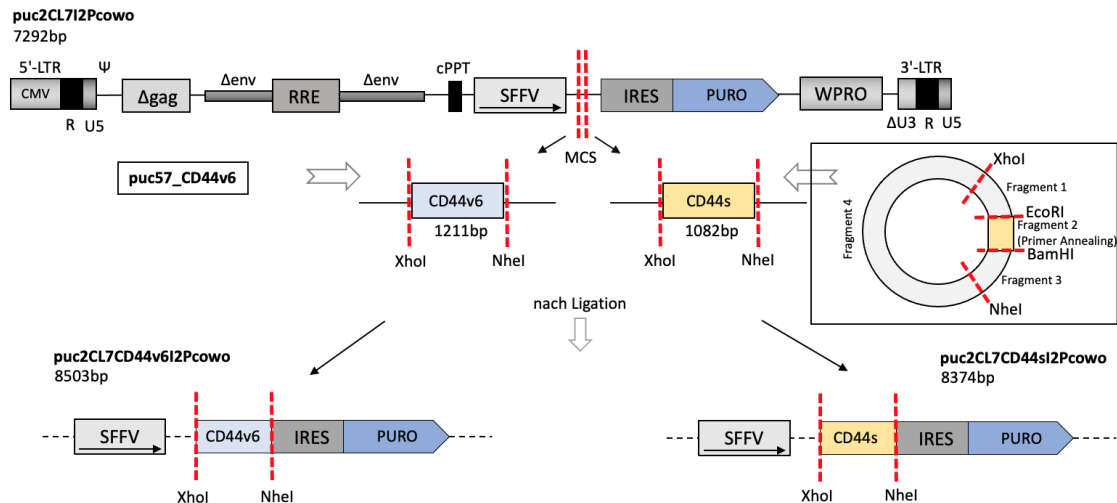


Abbildung 5: Klonierungsstrategie für die CD44v6- und CD44s-Expressionsplasmide

Die finalen Konstrukte (puc2CL7CD44v6l2Pcowo und puc2CL7CD44sl2Pcowo) wurden mit dem *Forward*-Primer 184, der in der SFFV U3 Kasette bindet, und dem *Reverse*-Primer 257, der in der IRES bindet, sequenziert. Beide Plasmide exprimieren die cDNAs unter Kontrolle des SFFV-Promoters und zusätzlich ein Puromycin-Resistenzgen, welches die Selektion von CD44v6- bzw. CD44s-positiven Zellen ermöglicht.

HEK293T-Zellen wurden mit den lentiviralen Partikeln transduziert und dann mit Puromycin selektioniert. Daraus resultierten HEK293T-Zellen, die entweder CD44v6, CD44s oder den dazugehörigen Leervektor stabil exprimierten, und an denen die spezifische Bindung der CD44v6- und CD44-Antikörper (Kap. 2.1.8) durchflusszytometrisch bestimmt wurde (**Abb. 6**).

Lediglich 2,1 % bzw. <0,1 % der untransduzierten HEK293T-Zellen sowie 1,7 % bzw. 0,6 % der HEK293T-Zellen transduziert mit dem Leervektor ließen sich mit den CD44v6- bzw. CD44-Antikörpern anfärben, da diese Rezeptoren nicht nativ auf den HEK293T-Zellen vorkommen¹⁹⁰. Wurde in den Zellen CD44s lentiviral überexprimiert (HEK293T CD44s), ließ sich zwar eine leichter Anstieg der CD44v6-Expression mit dem spezifischen Antikörper messen (von 2,1 % auf 8,8 %), jedoch wurden mit dem CD44-Antikörper 54,6 % CD44s-positive Zellen detektiert. Exprimierten die Zellen das Zielantigen CD44v6 (HEK293T CD44v6), waren 55,1 % Zellen für CD44 und 57,4 % Zellen für CD44v6 positiv.

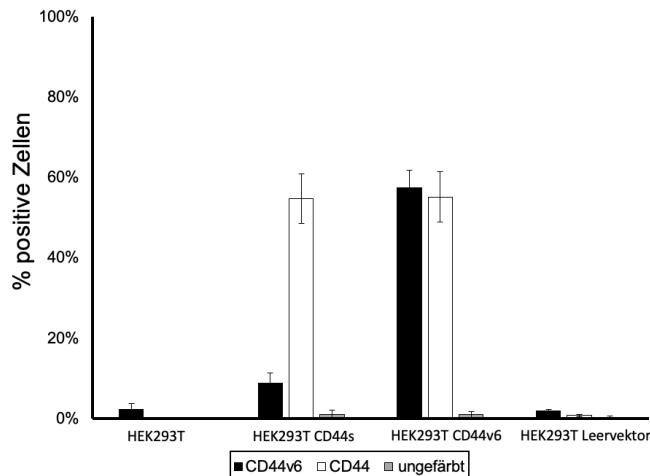


Abbildung 6: CD44- bzw. CD44v6-Expression auf HEK293T-Zellen nach Transduktion

HEK293Ts wurden lentiviral transduziert (CD44s, CD44v6 oder Leervektor) und die Expression von CD44 und CD44v6 mithilfe der Antikörper CD44v6 PE-Vio 770 und CD44 PE durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Daten aus drei Experimenten $\pm$ SEM.

Somit konnten wir bestätigen, dass das Epitop des Antikörpers CD44v6 PE-Vio770 (Klon REA706, Miltenyi) tatsächlich im Bereich des Exons 11 liegt, weshalb mit seiner Hilfe Zellen, die CD44v6 exprimierten, spezifisch angefärbt werden konnten. Im Gegensatz dazu hat der PE-konjugierte Antikörper CD44 PE (Klon DB105, Miltenyi) an ein Epitop gebunden, das irgendwo in den konstanten Exons (Exons 1-5) liegt. Der CD44-Antikörper bindet somit an alle CD44-Varianten, also auch CD44v6, was den hohen Prozentsatz positiver Zellen erklärt.

3.1.2 Screening der CD44- und CD44v6-Genexpression in KHPEK-Zelllinien

In unserem Labor sind 31 primäre KHPEK-Zelllinien mit unterschiedlichen Eigenschaften (Tbl. 8) vorhanden, die als nächstes im Rahmen einer durchflusszytometrischen Screening-Messung mittels Antikörperfärbungen hinsichtlich ihrer Expression von CD44v6 und CD44 untersucht wurden. Die Zelllinien sind jeweils aus primärem Tumor- oder Metastasengewebe gewonnen worden und wurden in HNO-Laboren aus Düsseldorf (UD), Turku (UT) und Michigan (UM) etabliert^{180,181,183}.

Wie in der Literatur beschrieben, erkrankten Männer im Vergleich zu Frauen zwei bis viermal häufiger an einem KHPEK¹, was sich ebenfalls in der Geschlechterverteilung der in unserem Labor vorhandenen KHPEK-Zelllinien widerspiegelt: Insgesamt stammten 65 % (20/31) der Zelllinien von männlichen Patienten und nur 32 % (10/31) der Zelllinien von weiblichen Patientinnen; bei einer Zelllinie (1/31) ist das Geschlecht unbekannt. Während 29 % (9/31) der Zelllinien aus Metastasen etabliert wurden, stammten 45 % (14/31) der Zelllinien aus Primärtumorgewebe. 13 % (4/31) der Zelllinien wurden aus

Ergebnisse

dem Rezidivtumorgewebe entnommen, für 4 weitere Linien (4/31) fehlten die diesbezüglichen Informationen.

Tabelle 8: Übersicht der untersuchten primären KHPEK-Zelllinien

Zelllinie	Geschlecht	Tumorart	HPV	P53	Referenz
UD01	M	Primärtumor	-	<i>Skip exon 3</i>	193,194
UD02	M	Primärtumor	+	wt	193,194
UD03	M	Metastase	-	p.Q224 <i>Stop</i>	193,194
UD04	M	Primärtumor	-	NT 664 <i>del</i> /13	193,194
UD05	M	Primärtumor	-	p.H179Y	193,194
UD06	M	Primärtumor	-	p.Y220C	193,194
UT02	M	Primärtumor	-		195,196
UT04	W	Metastase	-		196
UT05	M	Primärtumor	-		197
UT06B	W	Metastase	-		197
UT07	M	Metastase	-	p.G266E	196,198
UT09	M	Metastase	-		197
UT14	M	Primärtumor	-	<i>Skip exon 8, Insertion intron 8</i>	197,198
UT15	M		-	N77 <i>del</i> 116	198,199
UT24A	M	Primärtumor	-	NT 775ins49	197,198
UT24B	M	Metastase	-	NT 775ins50	197,198
UT33	W		-	p.R282W	198,199
UT34	M		-		198,199
UT50	M		-	<i>Skip exon 9</i>	198,199
UM10A	M	Primärtumor	-	p.G245C	184,194,195,198,200
UM10B	M	Metastase	-	p.G245C	184,194,195,198,200
UM11B	M	Primärtumor	-	p.C242S	184,194,195,198,200
UM14A	W	Rezidivtumor	-	p.R280S	184,194,195,198,200
UM14B	W	Rezidivtumor	-	p.R280S	184,194,195,198,200
UM14C	W	Rezidivtumor	-	p.R280S	184,194,198,200
UM17A	W	Primärtumor	-	wt	184,194,195,198,200
UM17B	W	Metastase	-	wt	184,194,195,198,200
UM22B	W	Metastase	-	p.Y220C	184,194,195,200
UM74A	M	Primärtumor	-	wt	198–200
UM74B	M	Primärtumor	-	wt	198–200
UM104	/	Rezidivtumor	+	wt	201

Die Entstehung eines KHPEK resultiert bei 25 % der Patienten aus einer Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), wobei die Assoziation von HPV und Oropharynxkarzinomen mit einem Anteil von 36 % am höchsten ist¹⁹¹. Die zwei im Labor vorhandenen HPV-positiven Zelllinien (UD2 und UM104) reflektierten insofern nicht den natürlichen Anteil HPV-positiver Tumore bei KHPEK-Patienten in der Klinik. Bei 61 % (19/31) der Zelllinien liegt eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 vor. Hierbei handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Protein, das als sogenannter *Wächter des Genoms* genomische Instabilität und nachfolgend maligne Zellentartungen verhindern soll¹⁹². Das TP53-Gen ist bei 70 % aller KHPEK mutiert und gilt somit als eine der häufigsten Mutationen bei diesen Tumoren¹⁹². Während Mundhöhlen-, Larynx- und Hypopharynx-Karzinome häufig TP53-Mutationen aufweisen, ist der Anteil bei den Oropharynxkarzinomen geringer¹⁹².

Um die Heterogenität und die Expressionsstärke des Zielantigens CD44v6 auf den o.g. primären KHPEK-Zelllinien zu bestimmen, wurden sie geerntet, mit Antikörpern gegen CD44 und CD44v6 nach Herstellerangaben gefärbt und die Expressionsprofile durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 7**). Als zusätzliche Kontrollzellen wurden primäre humane orale Keratinozyten (HOK), primäre humane dysplastische orale Keratinozyten (DOK) und die humane Zervixkarzinomzelllinie (HeLa.P3) ebenfalls nach Antikörperfärbungen gemessen.

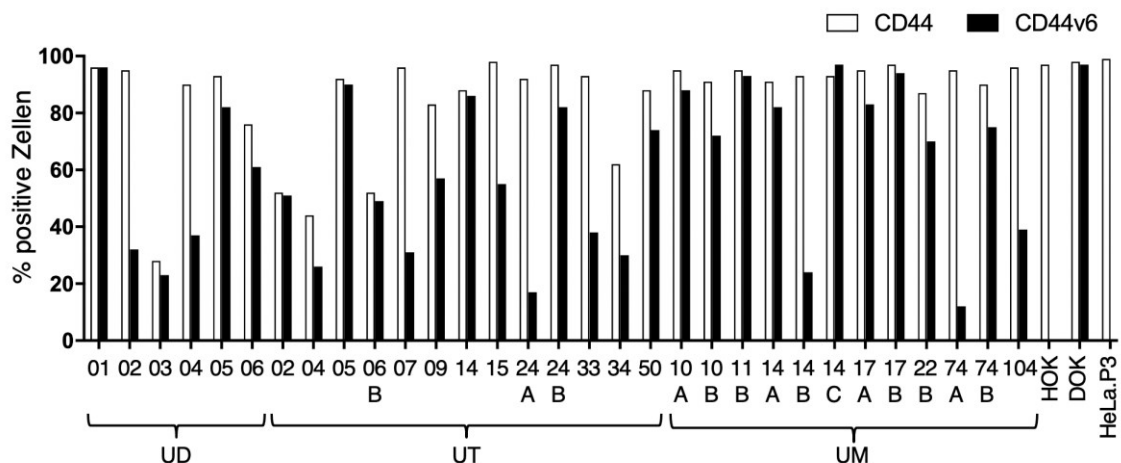


Abbildung 7: CD44 und CD44v6 Expression auf KHPEK-Zelllinien, HOK, DOK und HeLa.P3

31 KHPEK-Zelllinien, HOK, DOK und HeLa.P3 wurden mit kommerziellen Antikörpern (Kap. 2.1.8) nach Herstellerangaben gefärbt und ihre CD44- und CD44v6-Expression durchflusszytometrisch analysiert (in Haist *et al.* ²⁰², n=1). Die Zelllinien wurden ursprünglich in unterschiedlichen Laboren etabliert: Düsseldorf (UD), Turku (UT) und Michigan (UM).

Die Darstellung des Prozentanteils der CD44- und CD44v6-positiven Zellen zeigt, dass CD44v6 innerhalb der KHPEK-Linien sehr heterogen exprimiert wurde: 48 % der

KHPEK-Zelllinien wiesen eine CD44v6-Expression von über 60 % der Zellen auf, 36 % der Zelllinien hatten sogar über 80 % CD44v6-positive Zellen. Bei 20 % der KHPEK-Zelllinien exprimierten zwischen 40 % bis 60 % der Zellen CD44v6. 32 % der KHPEK-Zelllinien zeigten eine CD44v6-Expression auf unter 40 % der Zellen.

Da der gegen CD44-gerichtete Antikörper alle Spleißformen von CD44 erkennt, lagen die Messungen für die CD44-Expression im Vergleich zur CD44v6-Expression bei jeder KHPEK-Zelllinie höher. Nur bei 12 % der KHPEK-Zelllinien waren weniger als 40 % der Zellen positiv für CD44. Bei fünf Zelllinien zeigten sich zwischen 30 % bis 60 % CD44-positiv, während bei den übrigen Zelllinien 80 % oder über 80 % CD44-positive Zellen gemessen wurden.

Diese Expressionsprofile für CD44v6 und auch für CD44 konnten nicht mit den bekannten Merkmalen der KHPEK-Zelllinien korreliert werden, was sich beispielsweise daran zeigte, dass die CD44v6 schwach- (unter 40 %) exprimierenden Zelllinien aus Primärtumoren (UD02, UD04, UT24A, UT74A), von Metastasen (UD03, UT04, UT07) und von Rezidivtumoren (UM14B) etabliert worden waren.

Keratinocyten stellen humane Schleimhautzellen dar, die als Normalgewebe anzusehen sind, sich jedoch zu dysplastischen und malignen Zellen entwickeln können. Da CD44v6 in der Literatur als ein TAA beschrieben ist, dessen Expression häufig mit zunehmender Zellentartung zunimmt^{164–166,159,164–166,170,203}, wurde die Expression von CD44 und CD44v6 auch auf kommerziell erworbenen HOK als Zellen eines gesunden Gewebes und DOK als ein Beispiel für dysplastische, aber noch nicht maligne Zellen mit einer atypischen Zellproliferation durchflusszytometrisch gemessen. Als eine weitere Kontrolle dienten maligne Epithelzellen einer etablierten Zervixkarzinomzelllinie, Hela.P3. Bei den Messungen zeigte sich eindeutig, dass auf allen drei Zelltypen CD44 auf fast 100 % der Zellen exprimiert wurde, aber CD44v6 nur auf den dysplastischen Keratinocyten nachweisbar war: 96 % der Zellen waren im Durchflusszytometer positiv (**Abb. 7**).

Da über 80 % der KHPEK-Zellen CD44v6 als Antigen tragen (**Abb. 7**), war für eine Einteilung in stark- bzw. schwach-exprimierenden Zelllinien eine Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) erforderlich. Die MFI von direkt fluoreszent markierten monoklonalen Antikörpern, die an ein Antigen auf Zellen gebunden sind, korreliert direkt mit der Expressionshöhe dieses Antigens. Je höher also die MFI ist, umso stärker exprimieren die Zellen das jeweilige Protein. Zur näheren Charakterisierung des CD44v6-CARs wurden letztlich drei KHPEK-Zelllinien ausgewählt, die sich in ihrer CD44v6-Expression unterscheiden (**Abb. 8**).

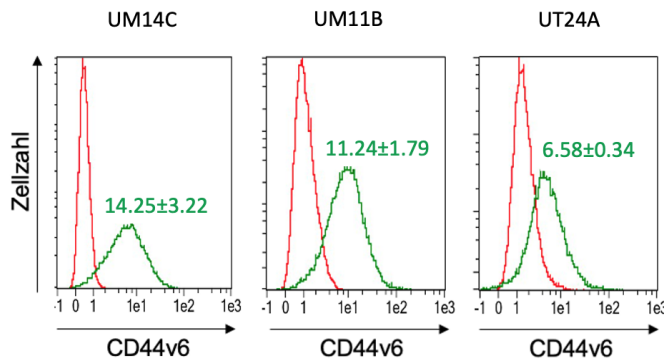


Abbildung 8: Expressionsniveau von CD44v6 in ausgewählten KHPEK-Zelllinien

In den Histogrammen ist die Fluoreszenzmessung der mit dem Antikörper CD44v6 PE-Vio770 gefärbten Zellen (grün) und der ungefärbten Zellen (rot) gegen die Zellzahl nach durchflusszytometrische Analyse aufgetragen. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI, grüne Zahlen) konnten die gemessenen Zelllinien in starke (UM14CCD44v6⁺⁺⁺), mittlere (UM11BCD44v6⁺⁺) und schwache (UT24ACD44v6⁺) CD44v6-Expression eingeteilt werden.

56 % der UM14C Zellen exprimierten CD44v6 mit einer MFI von $14,2 \pm 3,2$ und wurden deshalb als stark CD44v6-positiv klassifiziert (UM14CCD44v6⁺⁺⁺). Die Zelllinie UM11B wurde mit einer MFI von $11,2 \pm 1,8$ von uns als CD44v6 mittelstark-exprimierenden Linie eingestuft (UM11BCD44v6⁺⁺). Lediglich 21 % der Zellen der Linie UT24A zeigten eine schwache CD44v6-Expression mit einer MFI von $6,5 \pm 0,3$ (UT24ACD44v6⁺).

3.2 Zytotoxizität der auf primären humanen T-Zellen exprimierten CARs

3.2.1 Expression der CAR-Konstrukte auf primären humanen T- Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die Zellen der KHPEK-Zelllinien bei der Nutzung von CD44v6 als Zielantigen spezifisch abtöten lassen, konzipierten wir einen CD44v6-CAR der zweiten Generation in unserem lentiviralen CD19-CAR-Vektor. Die CD44v6-scFv-Sequenz stammt von dem Antikörpers BIWA8¹⁷² (Kap. 1.3) und wurde von uns über die Firma GeneArt (Thermo Fisher Scientific) zuerst für *human codon usage* optimiert und dann synthetisiert (Plasmid pMK_RQ_CD44v6c6). Zur Herstellung des lentiviralen Vektors wurde das CD19-scFv des im Labor etablierten CD19-CARs²⁰⁴ über die Klonierung mit den Restriktionsenzymen *RsrII* und *NotI* durch die CD44v6-scFv-Sequenz ausgetauscht, sodass das Plasmid puc2CL21BFPT2ACD44v6c6 entstand (**Tbl. 9**).

Insgesamt enthält das klonierte CAR-Konstrukt der zweiten Generation neben einer auf CD34-basierenden *hinge*-Region⁸⁵ und einer Transmembrandomäne von CD28 auch

die intrazelluläre *Signaling*-Domäne von CD28 ko-stimulatorische Signaleinheit sowie die CD3ζ-Kette. Das finale CAR-Konstrukt wurde mit Hilfe eines Kontrollverdaus mit *XmaI* und durch Sequenzierungen mit den Primern 997, 2074 und 2075 kontrolliert (Kap. 2.1.5).

Tabelle 9: Klonierungsstrategie für puc2CL21BFPT2ACD44v6c6

		Ausgangsplasmid	Verdau
CD44v6 CAR	Vektor	puc2CL21BFPT2AR.CD19c6wo	<i>RsrII</i> / <i>NotI</i>
	Insert	pMK_RQ_CD44v6c6	<i>RsrII</i> / <i>NotI</i>

Für die Herstellung der CAR-T-Zellen wurde zunächst gesunden Spendern peripher Blut abgenommen, aus dem mittels Ficoll-Zentrifugation (Kap. 2.3.3) mononukleäre Zellen aufgetrennt wurde. Die Zellen wurden in der Gegenwart von IL-2 auf CD3/CD28-beschichteten bakteriellen Kulturplatten für 2-3 Tage stimuliert/inkubiert.

Parallel dazu wurden HEK293T-Zellen mit jeweils drei lentiviralen Vektoren, die die Sequenzen für ein CD5-, ein CD19- und das CD44v6-CAR-Konstrukt tragen, einem Helferplasmid für Lentiviren und einem Hüllproteinplasmid (VSV-G) transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die extrazellulären lentiviralen Partikel geerntet und anschließend die primären T-Zellen von gesunden Spendern transduziert, sodass CD5-, CD19- oder CD44v6-CAR⁺-T-Zellen entstanden (**Abb. 9A**). Die gegen CD5 bzw. CD19 gerichteten CARs fungierten als Negativkontrollen, da beide Zielantigene nicht von KHPEK exprimiert werden^{205,206}.

Mithilfe des MACS-Systems von Miltenyi (Kap. 2.3.5) wurden dann die CAR-positiven T-Zellen selektioniert und angereichert. Hierzu wurden die transduzierten T-Zellen mit *Microbeads*-Antikörpern des Klons QBEND-10, der in der CD34-*hinge* bindet, gefärbt. Die CD34-positiven, mit *Microbeads* konjugierten T-Zellen wurden dann über eine in einem magnetischen Feld platzierte Säule gegeben und die drei unterschiedlichen Zellfraktionen – vor MACS, Durchfluss, nach MACS – separat aufgefangen. Diese Zellpräparationen wurden dann mit dem CD34-PE-Antikörper QBEND-10 gefärbt und durchflusszytometrisch hinsichtlich der Anzahl der CAR-positiven T-Zellen in den einzelnen Fraktionen analysiert (**Abb. 9B**). Da im lentiviralen Vektor zusätzlich zu dem CAR-Konstrukt auch noch das BFP koexprimiert wurde, konnte der Anteil der CAR-positiven Zellen über die Analyse beider Parameter bestimmt werden. Für die **Abb. 9B** wurden die Daten der CD34-Messungen genutzt.

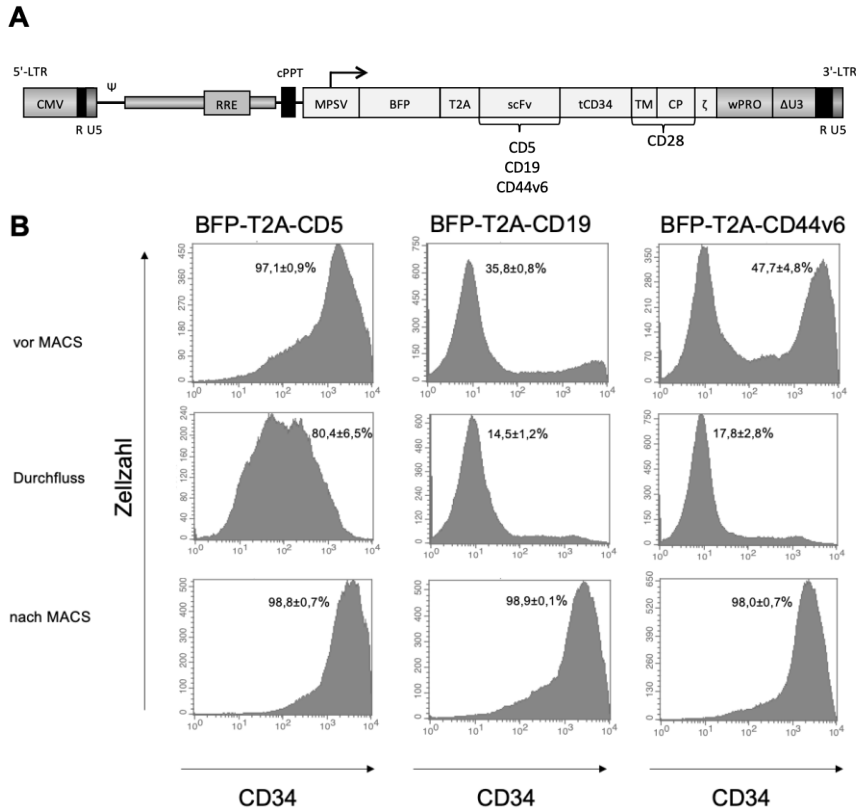


Abbildung 9: Expression der CAR-Konstrukte auf primären T-Zellen

A. Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren, die zur Herstellung von CD5-, CD19- und CD44v6-CAR-T-Zellen genutzt wurden. Die Konstrukte enthalten neben dem spezifischen scFv die CD34-*hinge*-Domäne, die transmembranären und -intrazellulären Domänen von CD28 sowie den intrazellulären Teil der CD3ζ-Kette. **B.** Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Reinheit der CAR-T-Zellen nach MACS. Die CD34-Fluoreszenz ist gegen die Zellzahl aufgetragen. Die Zellproben wurden vor MACS, aus dem Durchfluss und aus dem Eluat (nach MACS) gewonnen. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ SEM des Prozentsatzes der CD34⁺ Zellen aus drei Experimenten.

Die Transduktionseffizienz bei den CD19- bzw. CD44v6-CAR-T-Zellen lag bei $35,8 \pm 0,8$ % (CD19-CAR) und $47,7 \pm 4,8$ % (CD44v6-CAR) vor dem MACs. Obwohl im Durchfluss $14,5 \pm 1,2$ % (CD19-CAR) und $17,8 \pm 2,8$ % (CD44v6-CAR) der CAR-positiven Zellen verloren gingen, konnten jedoch für beide CARs $98,9 \pm 0,1$ % (CD19-CAR) bzw. $98,0 \pm 0,7$ % (CD44v6-CAR) reine Eluate generiert werden, welche für die weiteren Experimente verwendet wurden.

Überraschenderweise waren nach der Transduktion der primären T-Zellen mit dem CD5-CAR-Vektor bereits in der vor-MACS-Fraktion $97,1 \pm 0,9$ % CAR-positive Zellen vorhanden. Da das Zielantigen CD5 auch auf primären T-Zellen exprimiert wird²⁰⁷, können folglich die CD5-CAR⁺-T-Zellen die untransduzierten T-Zellen binden und lysieren. Dieses Phänomen wird auch *Brudermord/Fratricide* genannt. Die transduzierten CD5-CAR⁺-T-Zellen dagegen sind relativ gegen diesen *Fratricide* geschützt, da das Zielantigen CD5 auf ihrer Zelloberfläche herunterreguliert wird, sodass eine resistente und selektionierte CD5-CAR-Population generiert werden kann, ohne Verluste in der Expansion zu verzeichnen²⁰⁸. Um die Experimente methodisch

vergleichbar zu halten, wurde die magnetische Zellseparation trotzdem auch für die CD5-CAR⁺-T-Zellen durchgeführt. Nach der MACS-Anreicherung wurden dann die 98,8±0,7 % positiven Zellen für die Zytotoxizitätsassays eingesetzt.

3.2.2 Zytotoxizitätsassays der CAR-T-Zellen mit KHPEK-Zelllinien

Um die Zytotoxizität der MACS aufgereinigten CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegenüber KHPEK-Zellen zu testen, wurden Zellen der CD44v6-positiven Zelllinie UM14C^{CD44v6+++} EGIN (**Abb. 10A**), welche zur späteren Zellseparation auch das grüne fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten, als Zielzellen in 6-*well*-Platten ausgesät und am nächsten Tag nach ihrer Adhäsion mit verschiedenen Verhältnissen der MACS-angereicherten CAR-T-Zellen (10:1; 3:1; 1:1; 0,3:1; 0,1:1) für 16 h ko-inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden sämtliche Zellen eines *well*s geerntet und unter Zugabe von Propidium Iodid (PI), das durch die perforierte Zellmembran von toten Zellen gelangen kann und nach Interkalation in die DNA tote Zellen markiert²⁰⁹, in Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der vitalen bzw. avitalen Zellen mittels Durchflusszytometrie. Bei der Messung wurden die Zellen nach ihrem Farbspektrum in lysierte tote Zellen (rot), lebende Zielzellen (grün) und CAR-T-Zellen (blau) unterschieden (**Abb. 10B**).

Die GFP-positive UM14C^{CD44v6+++} EGIN-Zelllinie wurde durch die CD44v6-CAR⁺-T-Zellen effizient lysiert. Insbesondere in den hohen T-Zell- zu Zielzell-Verhältnissen von 10:1 und 3:1 konnte eine Lyse der UM14C^{CD44v6+++}-Zellen von 95,6±0,9 % bzw. 92,8±1,5 % erzielt werden, welche bei geringeren T-Zell- zu Zielzell-Konzentrationen zwar stetig abfiel, aber dennoch bei der geringsten T-Zell- zu Zielzell-Konzentration von 0,01:1 eine Lyse von 44,5±12,3 % aller Tumorzellen zeigte. Die Zielzellen wurden durch die Negativkontroll-CAR-T-Zellen (*no-virus*, CD5) in geringem Maße unspezifisch eliminiert: Die T-Zell- zu Zielzell-Verhältnisse 10:1 bis 0,1:1 zeigten zwischen 36,8±10,6 % und 5,7±12,0 % Lyse (*no virus*) bzw. zwischen 49,7±8,6 % und 16,0±5,6 % Lyse (CD5), was am ehesten durch eine hohe Restaktivität der aktivierten T-Zellen erklärbar war. Insgesamt beinhaltete die durchflusszytometrische Messung der adhärent wachsenden KHPEK-Zellen, die ursprünglich bei uns als Messmethode für Zytotoxizitätsassays mit leukämischen Zellen etabliert wurde²¹⁰, bei einigen Zelllinien methodische Schwierigkeiten, die lediglich durch einen hohen Stichprobenumfang (n=7) kontrolliert werden konnten. Die Überführung der Zellen aus den *well*s sowie Zellliniencharakteristika, beispielsweise die Tendenz zur Ausbildung von Zellkonglomeraten, veränderten die Messergebnisse, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwerte.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine alternative Messmethode zur Auswertung der Zytotoxizitätsassays mit adhären wachsenden Tumorzellen etabliert.

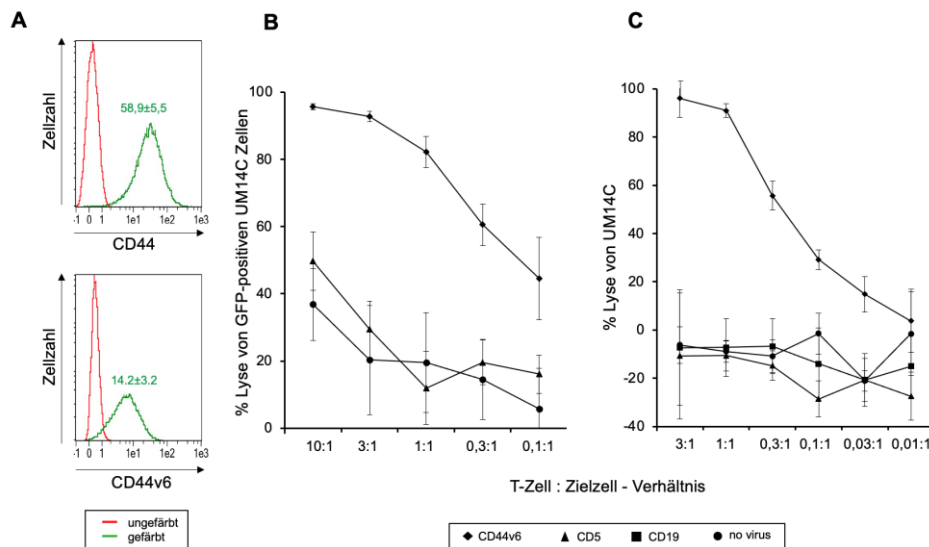


Abbildung 10: Zytotoxizität von CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegen UM14C-Zellen via FACS- und MTS-basierter Assaymethode

A Die CD44- und CD44v6-Expression der UM14C^{CD44v6+++}-Zelllinie wurde mittels Färbung mit den Antikörpern CD44v6 PE-Vio770 und CD44 PE durchflusszytometrisch bestimmt. **B** Auswertung des Zytotoxizitätsassays der CD44v6-CAR⁺-T-Zellen mit GFP-positiven UM14C^{CD44v6+++} EGIN-Zellen. Die Zelllinie UM14C^{CD44v6+++} EGIN wurde mit verschiedenen Verhältnissen primärer T-Zellen inkubiert (*no-virus*-, CD5- und CD44v6-CAR-T-Zellen). Nach 16 h wurde die Anzahl lebender UM14C^{CD44v6+++} EGIN-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Angaben der Zytotoxizitätsmessung als Mittelwert ± SEM aus sieben Messungen. **C** Auswertung des Zytotoxizitätsassays der CD44v6-CAR⁺-T-Zellen mit UM14C^{CD44v6+++}-Zellen. Die Zelllinie UM14C^{CD44v6+++} wurde mit verschiedenen Verhältnissen der primären T-Zellen inkubiert (*no virus*-, CD5-, CD19- und CD44v6-CAR-T-Zellen). Nach 16 h wurde die Anzahl lebender UM14C^{CD44v6+++}-Zellen kolorimetrisch (MTS-Assay) bestimmt. Angaben der Zytotoxizitätsmessung als Mittelwert ± SEM aus drei Messungen.

Für diesen Vergleich wurden die UM14C^{CD44v6+++}-Zelllinie in 96-*well*-Platten ausgesät und am nächsten Tag nach ihrer Adhäsion mit verschiedenen Verhältnissen der MACS-angereicherten CAR-T-Zellen (3:1; 1:1; 0,3:1; 0,1:1; 0,03:1; 0,01:1) für 16 h ko-inkubiert. Die Auswertung der Zytotoxizität erfolgte hierbei durch einen Zellproliferations-Assay, der auf einer kolorimetrischen Messmethode mittels Tetrazolium (MTS) basiert (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Tetrazolium wird von den Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt bioreduziert, das im Medium löslich ist. Diese Umwandlung erfolgt laut Herstellerangaben durch NADPH oder NADH, das von Dehydrogenase-Enzymen in metabolisch aktiven Zellen produziert wird. Nach der Ko-Inkubation der Ziel- mit den T-Zellen wurden das Medium sowie alle nicht-adhären Zellen (T-Zellen und lysierte Zielzellen) aller *wells* vorsichtig durch „Ausschlagen“ der Platte mit mehrfachem Waschen entfernt und dann Tetrazolium als Substrat hinzugegeben (Kap. 2.3.8). Die Lichtabsorption des umgesetzten Substrates steht in

Korrelation zur Anzahl lebender Zellen in den einzelnen *wells*, sodass diese nach 1- 4 h Inkubation bei 490 nm mit einem Platten-Messgerät (Tecan) bestimmt werden konnte.

Beim Vergleich der beiden Messmethoden (**Abb. 10B** und **10C**) wird deutlich, dass der Verlauf der Lysekurve der Zelllinie UM14C^{CD44v6+++} durch die CD44v6-CAR⁺-T-Zellen in beiden Verfahren ähnlich ist. Insbesondere in den hohen T-Zell- zu Zielzell-Konzentrationen von 3:1 und 1:1 konnte eine Lyse von $96,1 \pm 7,9$ % (vgl. $92,8 \pm 1,5$ % mit durchflusszytometrischer Messung) bzw. $90,9 \pm 2,8$ % (vgl. $82,2 \pm 4,6$ % mit durchflusszytometrischer Messung) erzielt werden, welche bei geringeren Konzentrationen – wie bereits bei der durchflusszytometrischen Messung gezeigt werden konnte – stetig abfiel und sich bis hin zu einer Konzentration der T-Zellen zu den Zielzellen von 0,01:1 bei $3,8 \pm 13,9$ % zeigte. Die Zielzellen konnten bei Nutzung des MTS-Assays nicht durch die Negativkontroll-T-Zellen (*no-virus*, CD5, CD19) lysiert werden. Die Tumorzellen zeigten sogar eher eine Proliferationstendenz, was die rechnerische Erklärung für den Kurvenverlauf im teils negativen Lysebereich ist.

Insgesamt war bei der zweiten kolorimetrischen Methode kein Zelltransfer der lebenden Tumorzellen notwendig und die methodischen Fehler/Ausreißer konnten drastisch minimiert werden, wodurch eine Messung in Triplikaten (n=3 T-Zell-Spender) für die Signifikanz der Ergebnisse ausreichend war. Neben der besseren Handhabung erfolgten die Analysen direkt in den 96-*well*-Platten, sodass geringere Zellzahlen zum Ansetzen des Assays ausreichten und mehr Bedingungen parallel getestet werden konnten. Zusätzlich benötigten weder die Tumor- noch die T-Zellen die konstitutive Expression eines fluoreszenten Proteins.

3.2.3 Die Lyse der malignen Zellen korreliert mit der Höhe ihrer Antigenexpression

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, in wieweit die effiziente Lyse der Zelllinie UM14C^{CD44v6+++} (MFI: 14,2) durch CD44v6-CAR⁺-T-Zellen auf Zelllinien mit einer schwächeren Zielantigenexpression übertragen werden kann. Dazu wurden die zwei KHPEK-Zelllinien UM11B^{CD44v6++} mit einer mittleren (UM11B MFI: 11,2) und UT24A^{CD44v6+} mit einer schwachen (UT24A MFI: 6,5) CD44v6-Expression mit den MACS-angereicherten CAR-T-Zellen ko-inkubiert und die Lyse der Zielzellen mittels MTS-Methode bestimmt (**Abb. 11**).

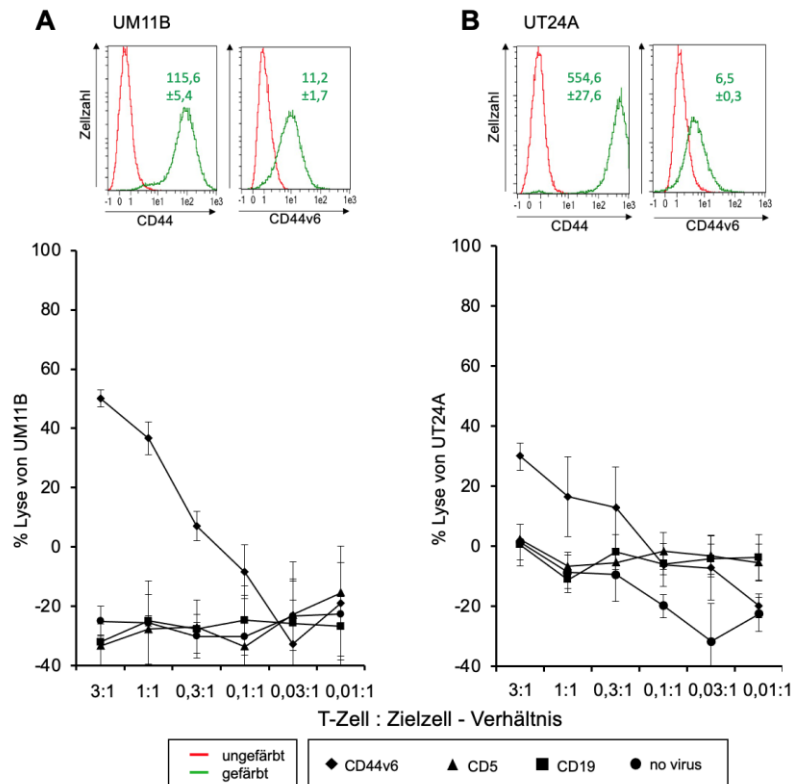


Abbildung 11: Zytotoxizität von CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegen UM11B^{CD44v6⁺⁺}- und UT24A^{CD44v6⁺}-Zellen

Die CD44- und CD44v6-Expression der KHPEK-Zelllinien (**A**) UM11B^{CD44v6⁺⁺} und (**B**) UT24A^{CD44v6⁺} wurde durch Färbung mit den Antikörpern CD44 PE (Klon DB105, Miltenyi) und CD44v6 PE-Vio 770 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Antigenexpression (X-Achse) ist gegen die Zellzahl (Y-Achse) für die ungefärbten Kontrollzellen (rot) und gefärbten Zellen (grün) aufgetragen. Primäre humane T-Zellen wurden mit dem Überstand von lentiviralen Vektoren für CD44v6-, CD19- oder CD5-CAR-Konstrukte inkubiert; drei Tagen nach der Transduktion wurden CAR-positive T-Zellen über das MACS-System zu >90 % selektioniert. Die CAR-T-Zellen sowie untransduzierte T-Zellen (*no-virus*) wurden mit den KHPEK-Zelllinien ko-kultiviert. Nach 16 h wurde die Anzahl lebender Zielzellen mittels eines MTS-Assays bestimmt. Angaben der Zytotoxizitäts-Messung als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Messungen.

Beide Zelllinien, UM11B^{CD44v6⁺⁺} (**Abb. 11A**) und UT24A^{CD44v6⁺} (**Abb. 11B**), konnten von den Negativkontroll-CAR-T-Zellen (*no virus*, CD5 und CD19) nicht lysiert werden, wohingegen die Ko-Kultivierung mit den CD44v6-CAR⁺-T-Zellen zu einer gewissen Eliminierung der KHPEK-Zellen führte. Im Vergleich zur Zelllinie UM14C^{CD44v6⁺⁺⁺} trat bei der Nutzung der CD44v6 mittel- bzw. schwach-exprimierenden Zielzellen eine deutlich schwächere Lyse auf. Während die Zelllinie UM14C^{CD44v6⁺⁺⁺} bei einem 3:1 T-Zell- zu Zielzell-Verhältnis zu 96,1 $\pm$ 7,9 % eliminiert wurde, sank die Zytotoxizität mit fallender Antigenexpression bei den Zelllinien UM11B^{CD44v6⁺⁺} auf 50,1 $\pm$ 9,3 % bzw. bei der Zelllinie UT24A^{CD44v6⁺} auf 29,8 $\pm$ 4,5 % bei gleichem T-Zell- zu Zielzell-Verhältnis. Der Einsatz von geringeren Mengen CD44v6-CAR⁺-T-Zellen (< 0,1:1) führte, wie die CD19-, CD5-CAR- und *no virus*-T-Zellen, zu keiner Lyse der UM11B^{CD44v6⁺⁺}- und UT24A^{CD44v6⁺}-Zellen.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass die Effizienz der Tumorzelllyse mit der Zielantigendichte auf den jeweiligen Tumorzellen korreliert. Je stärker das Zielantigen auf den Tumorzellen exprimiert wird, desto effektiver wurden die Zielzellen eliminiert.

3.2.4 Spezifität der CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegenüber ihrem Zielantigen

Nachdem die Funktionalität der CAR-T-Zellen gegen die Spleißvariante CD44v6 auf KHPEK-Zellen mit unterschiedlich starker Zielantigenexpression gezeigt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die spezifische Bindung der CD44v6-CAR⁺-T-Zellen an den Proteinteil, der aus der Integration des Exon 11 resultiert, bestätigt werden (Kap. 1.3 u. Abb. 2). Dazu wurde die CD44v6 schwach-positive Zelllinie UT24A^{CD44v6+} (MFI: 6,5, **Abb. 8**), deren Zellen aufgrund ihrer niedrigen Zielantigenexpression in nur geringem Maße in dem 3:1 T-Zell- zu Zielzell-Verhältnis (29,8±4,5 %) eliminiert wurden (**Abb. 11B**), mit einem lentiviralen CD44v6-Überexpressionsvektor (puc2CI7CD44v6I2Pcowo (Kap. 2.1.6) transduziert. Diese neue Zelllinie UT24A CD44v6⁺ war durch die sehr hohe konstitutive CD44v6-Überexpression mit einem MFI von 648,2±28,7 gekennzeichnet (**Abb. 12A**). Als Kontrolle diente hier die gleiche Zelllinie, UT24A LV, die mit einem Leervektor (LV) transduziert wurde (puc2CL7I2Pcowo, Kap. 2.1.6), der keine Auswirkungen auf die CD44-/CD44v6-MFI im Vergleich zur parentalen UT24A^{CD44v6+} (CD44 MFI: 561,1±35,8 und CD44v6 MFI: 4,7±0,6) hatte.

Die massive Erhöhung der CD44v6-Expression auf Zellen der Zelllinie UT24A CD44v6⁺ (**Abb. 12A**) führte, im Vergleich zu den parentalen Zellen, zu einer höchst effektiven Lyse der Zielzellen durch die CD44v6-CAR⁺-T-Zellen. Insbesondere im hohen T-Zell- zu Zielzell-Verhältnis von 3:1 konnte eine Lyserate von 95,6±3,2 % durch die CD44v6-CAR⁺-T-Zellen erzielt werden. Selbst bei dem Einsatz von geringsten Mengen CD44v6-CAR⁺-T-Zellen (0,1:1) wurden noch 22,4±14,4 % der Zielzellen eliminiert.

Die Ko-Inkubation der UT24A LV (**Abb. 12B**) mit den CD44v6-CAR⁺-T-Zellen resultierte, verglichen mit den Zytotoxizitätsergebnissen mit der parentalen UT24A^{CD44v6+}, in den hohen T-Zell- zu Zielzell-Verhältnissen (3:1) in einer schwachen Lyse (29,7±5,6 % bzw. 29,8±4,5 %), die ab einem Verhältnis von 0,1:1 nicht mehr detektierbar war (-13,3±10,1% bzw. -19,8±3,9). Der Kurvenverlauf der Kontrollen zeigte keine Lyse der UT24A LV-Zellen und glich somit, wie zu erwarten, dem der Zelllinie UT24A^{CD44v6+} (Wildtyp, **Abb. 11B**) ohne Leervektor.

Ergebnisse

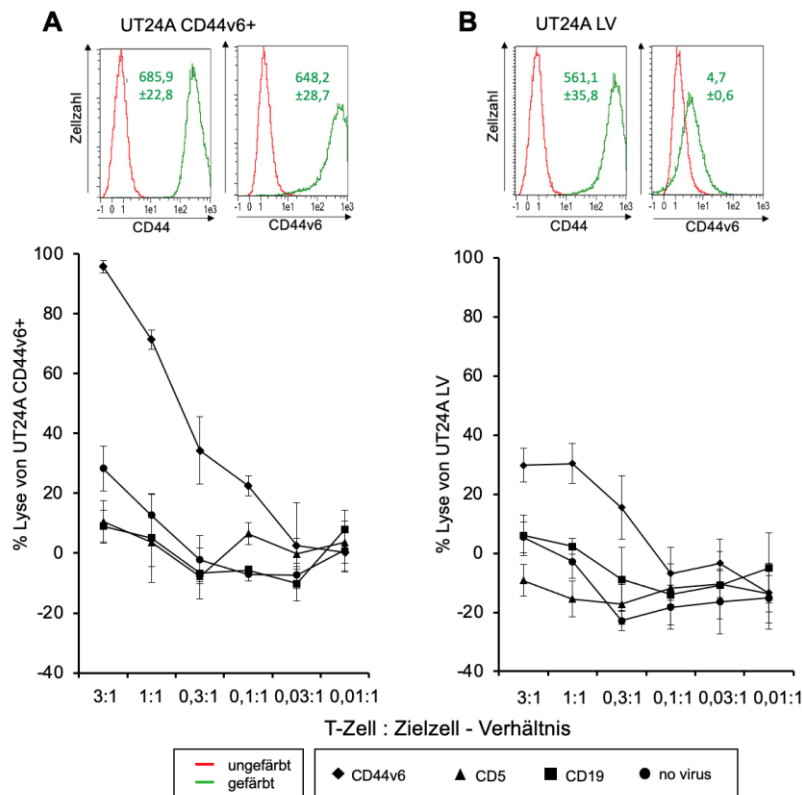


Abbildung 12: Zytotoxizität von CD44v6-CAR⁺-T-Zellen gegen UT24A CD44v6⁺ - und UT24A LV-Zellen

Die CD44- und CD44v6-Expression der KHPEK-Zelllinien **(A)** UT24A CD44v6⁺ und **(B)** UT24A LV wurde durch Färbung mit den Antikörpern CD44 PE und CD44v6 PE-Vio770 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Antigenexpression (X-Achse) ist gegen die Zellzahl (Y-Achse) für die ungefärbten Kontrollzellen (rot) und gefärbten Zellen (grün) aufgetragen. Primäre humane T-Zellen wurden mit dem Überstand von lentiviralen Vektoren für CD44v6-, CD19- oder CD5-CAR-Konstrukte inkubiert; drei Tagen nach der Transduktion wurden CAR-positive T-Zellen über das MACS-System zu >90 % selektioniert. Die CAR-T-Zellen sowie untransduzierte T-Zellen (*no virus*) wurden mit den KHPEK-Zelllinien ko-kultiviert. Nach 16 h wurde die Anzahl lebender Zielzellen mittels eines MTS-Assays bestimmt. Angaben der Zytotoxizitäts-Messung als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei Messungen.

Diese Ergebnisse bestätigen die spezifische Bindung des CD44v6-CARs an sein Zielantigen CD44v6, und zwar genau in der durch Exon 11 kodierten Region. Dahingegen wurden die Proteinteile, die von den konstanten Exons 1-5 und 16-20 von CD44 translatiert und häufig von Normalgewebe überexprimiert werden, nicht erkannt.

4 Diskussion

Mit der Zulassung der ersten beiden autologen CAR-T-Zell-Therapien in 2017 gegen das Zielantigen CD19 zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen wurde ein Durchbruch auf dem Gebiet der Immuntherapie erreicht¹¹⁶. Wichtig ist, dass die großen Therapieerfolge mit CAR-T-Zellen bisher ausschließlich bei B-Zell-Malignomen erzielt wurden, wo sechs CAR-T-Zell-Therapien gegen CD19 oder das B-Zell-Reifungsantigen (BCMA) bereits den Einzug in die klinische Routine gefunden haben²¹¹. Ausschlaggebend für die Erfolge dieser Immuntherapien ist, dass beide Zielantigene sehr stabil auf praktisch allen B-Zell-Malignomen exprimiert sind – wobei CD19 eher bei den unreifen und BCMA bei den reiferen/differenzierteren Formen zu finden ist – und dass Menschen es tolerieren, wenn durch die *on-target off-tumor* Reaktivität der CAR-T-Zellen auch alle normalen CD19- oder BCMA-positiven Zellen für Monate bis Jahre eliminiert werden, solange regelmäßig Immunglobuline substituiert werden²¹².

Dieser Erfolg der CAR-Therapie konnte auf die Behandlung von soliden Tumorentitäten bislang in keiner Weise übertragen werden, obwohl bei vielen Tumoren – wie z. B. auch bei KHPEK – die Rezidivrate innerhalb der ersten fünf Jahre nach Erstdiagnose vergleichsweise hoch ist und effektive Therapieverfahren dringend benötigt werden^{56,60}. Letztlich verantwortlich für die Schwierigkeiten bei der Etablierung der CAR-T-Zell-Therapie für nicht-hämatologische Tumore sind sowohl Eigenschaften der soliden Tumoren selbst als auch vielfältige Besonderheiten des TME¹²⁰.

Dass aber im Bereich der zellulären Immuntherapie großes Potenzial steckt, zeigte sich durch die Einführung von Cetuximab als monoklonaler Antikörper gegen EGFR und Nivolumab sowie Pembrolizumab als Checkpointinhibitoren gegen PD-1 in der Behandlung von KHPEKs^{33,37,38}. Trotzdem reichen die bisher zugelassenen Immuntherapien bei weitem nicht aus, um die 50 %-ige Rezidivrate der KHPEK zu verringern.

4.1 CD44v6 als Zielantigen für die CAR-T-Zell-Therapie von KHPEKs

Bereits in den 1990er Jahren wurde erkannt, dass es Antigene gibt, deren Expression eine Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe erlaubt und die genutzt werden können, um spezifische Therapien in der Krebsbehandlung zu entwickeln²¹³. Differentiell exprimierte Antigene auf Tumorgeweben zu identifizieren ist essentiell, um potenzielle (neue) Angriffsstellen für Immuntherapien zu entwickeln, was bei der Vielzahl bestehender Tumorentitäten und der Heterogenität der Tumore selbst von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg sein kann^{129,244}.

Bei der Auswahl von Tumor-Zielantigenen wird zwischen **tumorspezifischen (TSA) und tumorassoziierten Antigenen (TAA)** unterschieden. TSAs kommen ausschließlich auf Tumoren und nicht auf Normalgewebe vor. In der Regel handelt es sich hierbei um Neo-Antigene, deren Spezifität z. B. in Mutationen oder onkoviralen Prozessen begründet liegt¹³⁴. TAAs werden häufig von Tumorzellen überexprimiert, sind aber auch auf Normalgewebe sowie auf Keimbahnzellen vorhanden¹²⁷. Man unterscheidet bei den TAAs drei Kategorien: **Differenzierungsantigene** befinden sich auf Zelloberflächen und variieren aufgrund von Differenzierungsprozessen im Rahmen der Tumorausbildung²¹⁴. Häufig sind auch **Tumor-Hoden-Antigene** (*engl. cancer testis antigens*) wie beispielsweise *PRAME* oder *NY-ESO-1* nutzbar, für die eine Expression auf KHPEK bekannt ist²¹⁵. Die Tumor-Hoden-Antigene sind zunächst in der Embryogenese exprimiert; ihre Expression wird aber auf reifen Zellen und Geweben meistens durch Methylierungsprozesse abgeschaltet²¹⁶. Bei der am häufigsten vertretenen TAA-Kategorie handelt es sich um **Antigene**, die von Malignomen vermehrt **überexprimiert** werden, während sie auf Normalgewebe deutlich schwächer nachweisbar sind. Zu den überexprimierten Antigenen gehört im Zusammenhang mit KHPEKs auch CD44v6, bei dem es sich um eine der bekannten Isoformen des Proteins CD44 handelt.

Das Oberflächenprotein **CD44v6** kommt auf verschiedenen Tumoren wie KHPEK, aber auch Zervix-, Lungen-, Pankreas-, Haut- und Speicheldrüsenepithelkarzinomen vor. Allerdings wird diese Spleißform des *CD44*-Gens nicht nur auf malignen Zellen, sondern ebenfalls auf gesunden Epithelzellen im Körper exprimiert, also auf Zervix-, Lungen-, Pankreas-, Haut- und Speicheldrüsenepithelien^{162,217–220}. Interessanter Weise lassen sich bei einer Tumorprogression im Sinne einer Metastasierung oder Rezidivausbildung erhöhte CD44v6-Expressionslevel auf den Tumorzellen nachweisen²²¹. Beim kolorektalen Karzinom und beim Mammakarzinom weisen Patienten mit CD44v6-positivem Status beispielsweise ein aggressives Tumorwachstum und ein reduziertes Gesamtüberleben auf^{223,224}. Im Gegensatz dazu führte ein *Knockout* der CD44v6-Expression in diversen Tumorzellen mittels CRISPR/Cas9 in Untersuchungen im Tiermodell zu einer geringeren Metastasierungsausbildung¹⁷⁰.

Ob CD44v6 bei der Entstehung von KHPEK weniger^{196,225} oder vermehrt^{158,226} exprimiert wird, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen in der Literatur. Die Arbeitsgruppe von Salmi *et al.* veröffentlichte 1993, dass die CD44v6-Expression in 30 plattenepithelialen Karzinomen im Zuge der malignen Zelltransformation herunter reguliert wurde²²⁵. Die gleiche Gruppe beschrieb in einer nachfolgenden Publikation, dass die CD44v6-

Expression durch *in vitro*- oder *in vivo*-Wachstum der Plattenepithelkarzinome beeinflusst werden konnte, dass aber das Ausmaß der CD44v6-Expression nicht als universeller Indikator für die Metastasierungseigenschaften von epithelialen Tumoren genutzt werden kann¹⁹⁶. Unklar bleibt in dieser Arbeit, ob die Überexpression von CD44v6 wirklich mit einer Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie assoziiert ist¹⁵⁸. Die Expressionsanalyse von 31 primären KHPEK-Zelllinien in unserem Labor zeigte hingegen bei 48 % der KHPEK-Zelllinien eine CD44v6-Expression von über 60 % und bei 36 % der Zelllinien sogar von über 80 %, was sich mit Daten anderer deckt, die jeweils CD44v6 auf über 90% der untersuchten KHPEK-Zellen fanden^{158,226}. Um den Einfluss der malignen Transformation auf die Expression von CD44v6 besser zu verstehen, haben wir zusätzlich normale (HOK) und dysplastische orale (DOK) Keratinozyten untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass nur die dysplastischen Krebs-Vorläuferzellen zu einem hohen Ausmaß CD44v6-positiv sind, CD44 selber aber auf praktisch allen primären Zellen hoch exprimiert wird (Abb. 9).

Wie in **Abb. 2** schematisch gezeigt, enthält der CD44-Genlocus 10 nicht-variable und 10 variable Exons, die durch unterschiedliche Spleißvorgänge an den variablen Exons verschiedene Proteinvarianten generieren können. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zielantigen CD44v6 enthält das variable Exon 11, das durch eine CD44v6-gerichtete CAR-T-Zell-Therapie spezifisch erkannt wird. Da jedoch, wie in **Tbl. 10** ersichtlich, das variable Exon 11 in sieben **Kombinationsvarianten**, die nach dem Spleißen mehrere variable Exons tragen (CD44v6,7, CD44v6-10, CD44v4-10, CD44v2-10, CD44v4-7, CD44v3-10, CD44v1-10h), zu finden ist, können alle diese Spleißvarianten potentiell von unserem CD44v6-CAR erkannt werden. Varianten mit Exon 11 kommen auf normalen Epithelien, u. a. im Pankreas, Brust und Prostata vor^{162,217–220}. Bánky *et al.* beschrieben 2012 sogar 26 unterschiedliche CD44-Isoformen beim kolorektalen Karzinom, die zum großen Teil dieselben variablen Exons beinhaltet haben²²⁷. Insbesondere die Exons 8 und 11, die bei alleinigem Vorhandensein CD44v3 bzw. CD44v6 ausmachen, kommen häufig überexprimiert auf Malignomen - alleine und in Kombinationen - vor^{155,228}. Zudem gibt es CD44-Kombinationsvarianten mit Exon 11, die in der Embryogenese der Extremitäten und auf intestinalen Stammzellen eine Rolle spielen^{229,230}.

Tabelle 10: Übersichtsdarstellung zum Aufbau und Vorkommen von CD44-Spleißvarianten

Exon																Isoform	Gewebe	Referenz
1-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16-20							
	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10		CD44 Gen						
													CD44s	ubiquitär exprimiert	189			
	v1												CD44v1	v1 = Stoppkodon	231			
		v2											CD44v2	Kolorektales Karzinom	232			
			v3										CD44v3	Epithelien (Brust, Pankreas), KHPEK	157,217,220,233,234			
				v4									CD44v4	KHPEK	157			
					v5								CD44v5	KHPEK	157			
						v6							CD44v6	Epithelien (Zervix, Lunge, Pankreas, Haut), Speicheldrüsen, KHPEK	157,161,162,189,217-220			
							v7						CD44v7	hämatopoetische Progenitorzellen, KHPEK	157,235			
								v9					CD44v9	Epithelien (Zervix, Lunge)	162,218			
										v10		CD44v10	Leukämische und Knochenmark-Zellen, Lymphozyten	236,237				
								v8	v9	v10		CD44v8-10, CD44E	Epithelien (z. B. Brust, Darm, Plattenepithel)	233,238-240				
							v7	v8					CD44v7-8	Epithelien (Pankreas)	241			
						v6	v7						CD44v6,7	Epithelien (Pankreas) der Ratte	242			
							v7	v8	v9	v10		CD44v7-10	Prostata-Adeno-Karzinom	158,243				
						v6	v7	v8	v9	v10		CD44v6-10	apikaler ektodermaler Kamm der Extremität, Epithelien (Pankreas)	217,229				
				v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10		CD44v4-10	apikaler ektodermaler Kamm der Extremität, intestinale Stammzellen	229,230				
		v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10		CD44v2-10	Epithelien (Brust)	244				
				v4	v5	v6	v7						CD44v4-7	Epithelien (Pankreas) der Ratte	242,245,246			
			v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10		CD44v3-10	apikaler ektodermaler Kamm der Extremität	229				
			v3					v8	v9	v10		CD44v3, v8-v10	duktales Mammakarzinom	247				
	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10		CD44v1-10h, CD44v2-10	Keratinozyten	248				

Meine Literaturrecherche verdeutlicht noch einmal, dass Exon 11 in multiplen CD44-Varianten, die von gesundem sowie von malignem Gewebe exprimiert werden, vorkommt. Es könnte somit theoretisch sein, dass gegen CD44v6 gerichtete CAR-T-Zellen nicht nur spezifisch an das CD44v6-Protein, sondern ebenfalls an Exon 11 exprimierende Kombinationsvarianten binden, was in Nebenwirkungen der Therapie in den entsprechenden Organen resultieren kann. Allerdings wurden die Expressionsdaten der Spleißvarianten in den jeweiligen Geweben, Zelltypen und Tumoren praktisch immer auf mRNA-Ebene erstellt, so dass aus diesen Daten nicht klar ableitbar ist, ob und in welchen Organen wirklich Nebenwirkungen zu erwarten sind.

In dieser Arbeit wurde die **Spezifität** unseres CD44v6-CARs für Exon 11 durch die Überexpression von CD44v6 auf der Zelllinie UT24A gezeigt. Der CD44v6-CAR war in der Lage, die CD44v6 überexprimierende Zelllinie (UT24A CD44v6⁺) sehr viel effizienter als die mit dem Kontrollvektor transduzierten UT24A-Zellen (UT24A LV) zu lysieren. In unserer Arbeitsgruppe wurden zusätzlich CRISPR/Cas9-basierte *Knock-Out*-Linien zum Ausschalten der Zielantigene CD44 bzw. spezifisch CD44v6 in den CD44v6 stark-exprimierenden Zelllinien UM11B^{CD44v6⁺⁺} und UM14C^{CD44v6⁺⁺⁺} generiert. CD44v6-CAR⁺-T-Zellen konnten diese CD44⁺/CD44v6⁻ oder CD44⁻/CD44v6⁻ Zellen nicht eliminieren. Erst bei Überexpression einer CD44v6-cDNA in den CD44 komplett negativen Zellen war wieder eine Zytotoxizität der CD44v6-CAR⁺-T-Zellen nachweisbar²⁰². Damit konnten wir also beweisen, dass unser CAR ganz spezifisch Aminosäuresequenzen in Exon 11 erkennt; wir konnten aber nicht differenzieren, ob auf den wildtypischen KHPEK-Zelllinien Exon 11 alleine oder in Kombinationsvarianten exprimiert wird, auch wenn dies die Effektivität des CARs zunächst nicht beeinträchtigt.

Trotz der Spezifität unseres CD44v6-CARs für Sequenzen in Exon 11 besteht durch das Vorkommen von CD44v6 auf unterschiedlichen Geweben die Gefahr von **on-target off-tumor Toxizitäten** bei einer Therapie mit CAR-T-Zellen²⁴⁹. Aus diesem Grund muss die Wahl eines passenden Zielantigens für Malignomzellen nicht nur die spezifische CAR-Bindung sicherstellen, sondern auch zusätzlich die potenziellen *on-target off-tumor* Toxizitäten berücksichtigen, die entstehen, wenn die CAR-T-Zellen das gewünschte Zielprotein/Epitop zwar erkennen, sich dieses jedoch nicht auf Tumorgewebe, sondern Normalgewebe befindet und die Therapie dadurch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet sein könnte²⁵⁰.

Bei CD44v6 als Zielantigen gibt es bereits präklinische Resultate aus Tiermodellen und klinische Daten aus Phase I/II-Studien zur Nutzung von spezifischen monoklonalen Antikörpern beim Menschen. Stroomer *et al.* untersuchten in einer klinischen Studie die Verteilung von Technetium-markierten, hochaffinen CD44v6-gerichteten murinen monoklonalen Antikörpern (**BIWA1**) bei 12 KHPEK-Patienten, bei denen eine primäre Entfernung der Tumoren und eine *Neck Dissection* geplant war²⁵¹. Bei Messungen der Radioaktivität 40 Stunden nach Injektion zeigte sich, dass die Antikörper relativ heterogen vom Tumorgewebe aufgenommen worden waren, wobei die applizierten Dosen von 2, 12 oder 52 mg keine signifikanten Unterschiede erbrachten. Daneben konnten auch minimale Aktivitäten in Mund, Lunge, Milz, Nieren, Knochenmark und Skrotum nachgewiesen werden. Insgesamt wurde die Gabe des Antikörpers sehr gut vertragen – ohne *drug-related adverse events*, Allerdings entwickelten 11 der 12 Patienten Antikörper gegen das murine Immunglobulin.

Deshalb generierte die Gruppe zwei humanisierte Derivate von BIWA1, nämlich den niedrigaffinen BIWA4 und den hochaffinen BIWA8, die sich nur durch zwei Aminosäuren unterscheiden¹⁷². Die Affinität beschreibt hier die Stärke einer Bindung zwischen Antigen und Antikörper, bei multivalenten Bindungen wird die Bindungsstärke als Avidität bezeichnet²⁵². Börjesson *et al.* konjugierten den BIWA4-Antikörper mit (186)Re-Radionukleotid und führten eine Dosiseskalationsstudie an KHPEK-Patienten durch¹⁷¹. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die erste als auch die zweite Anwendung bis zu einer Dosis von 60 mCi/m² gut toleriert wurde, aber neben dem Tumor vor allem die Haut Radioaktivität anreichte und therapeutische Effekte sehr gering bis gar nicht nachweisbar waren. Neutralisierende Antikörper traten nur noch bei zwei der 20 Patienten auf¹⁷¹. Für zwei weitere klinischen Studien aus den Jahren 2006 und 2008^{153,163} wurde BIWA4 an das Toxin Mertansin gekoppelt, um so selektiv auf CD44v6 exprimierende Tumore abzielen und diese abzutöten. Zwar konnte die Therapie den Krankheitsverlauf bei zwei Probanden der einen Studie (*stable disease*) und drei Probanden der anderen Studie (*partial response*) positiv beeinflussen, es kam jedoch zu schweren Nebenwirkungen an der Haut (*on-target off-tumor*) mit Erythemen, makulopapulösem Ausschlag, Blasenbildung und Abschuppung der Haut^{153,163}. Vor allem in Hautbereichen, die mechanischem Stress ausgesetzt sind, war dies zu beobachten. Die Hauttoxizitäten nahmen mit Dosiseskalation zu und traten 3-5 Tage nach der Antikörpergabe auf. Nach 2-3 Wochen war in den meisten Fällen ein Rückgang der Hautveränderungen sichtbar. In einem Fall führte jedoch die Ausbildung einer toxischen epidermalen Nekrolyse zum Versterben des Patienten^{153,163}, woraufhin die Studie und alle Parallelstudien gestoppt werden mussten. Somit ist tatsächlich davon auszugehen, dass die *on-target off-tumor* Reaktivität ein limitierender Faktor für ein systemisches *Targeting* von CD44v6 ist.

Insofern ist es ein interessanter Ansatz, den Casucci *et al.* 2013 zur CD44v6-CAR-T-Zell-Therapie von AML publizierten¹⁷⁰: Ihr CD44v6-CAR-CD28-CD3ζ-Konstrukt basierte auf dem hochaffinen BIWA8-scFv und zeigte *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell eine spezifische Zytotoxizität gegenüber CD44v6-positiven AML-Zelllinien und primären AML-Blasten sowie bei Zelllinien und primären Zellen von Patienten mit MM. Im Mausmodell mit humanisierter Hämatopoese zeigten die Autoren, dass die *off-target* Toxizität der CD44v6-CAR-T-Zellen nur spezifisch gegen Monozyten gerichtet war: Es kam lediglich zu einer reversiblen Monozytopenie¹⁷⁰. Bei der Ko-Inkubation mit primären Keratinozyten *in vitro* zeigten die Autoren deutliche Reaktivität der CAR-T-Zellen (60% Elimination beim T-Zell- zu Zielzell-Verhältnis von 1:1), behaupteten aber, dass die Keratinozyten nicht getötet wurden („*not killed*“) und dass es keine Induktion von

Zytokinen gab¹⁷⁰. Eine klinische Phase I/II-Studie zu CD44v6-CARs für AML und MM wurde 2019 geöffnet und wird im Verlauf sicherlich Klarheit schaffen (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04097301>). Leider sind aber Informationen zu der Studie bisher nicht veröffentlicht worden²⁵³. Zwei weitere Phase II-Multicenterstudien mit CD44v6-CAR-T-Zellen wurden 2020 in China zur Behandlung diverser Tumorentitäten (NCT04427449) und von Brustkrebs (NCT04430595) mit 100 geplanten Studienteilnehmern gestartet²⁵⁴, Ergebnisse stehen auch hier noch aus.

Einen möglichen Ansatz zur Steigerung der tumorspezifischen CAR-Bindung und Verringerung von *on-target off-tumor* Toxizitäten stellt der **Split-CAR-Ansatz** dar. Die T-Zellen tragen hierbei zwei CARs, die sich funktionell ergänzen, indem sie scFvs von zwei monoklonalen Antikörpern besitzen, um zwei Oberflächenproteine unabhängig voneinander binden zu können²⁵⁵. In einem CAR-Konstrukt ist der scFv-Anteil an ein oder zwei kostimulatorische Domänen (z. B. CD28 und 4-1BB) gekoppelt, während der zweite CAR nur den zytoplasmatischen Teil der CD3ζ-Kette trägt, also ein klassischer CAR der ersten Generation ist. Nur bei gleichzeitiger Bindung beider Zielantigene auf den Tumorzellen kommt es zur vollständigen T-Zell-Aktivierung mit T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion sowie Anti-Tumor-Aktivität²⁵⁵.

Aufgrund der vielfältigen Expression von CD44v6 auf malignen Zellen eignet sich dieses Zielantigen bei diversen Entitäten für ein Split-CAR-Modell^{155,228}, wobei allerdings nicht jede Kombination auch sinnvoll ist. Bei KHPEKs ist neben CD44v6 eine hohe Expression von EGFR von ca. 80 % bekannt¹³⁰. Die Nutzung beider Antigene als Split-CAR wäre zwar möglich, allerdings werden sowohl CD44v6 als auch EGFR auf Keratinozyten der Haut und Schleimhaut exprimiert, sodass die Gefahr von Hauttoxizitäten weiterhin bestehen bliebe. Hier ist eine ideale Kombination von zwei Antigenen zu finden. Im besten Fall könnte im Sinne eines personalisierten Therapieansatzes ein Expressionsprofil aus einer Tumorbiopsie erstellt werden, um für den Patienten geeignete Zielantigene auszuwählen. Nach klinischer Etablierung diverser CARs ist dann ein flexibles Baukastenprinzip für CAR-Kombinationen in Abhängigkeit des Tumorexpressionsprofils denkbar.

4.2 CAR-Optimierung zur Therapiekontrolle

Das Auftreten schwerwiegender Toxizitäten nach der Applikation von CAR-T-Zellen kann dazu führen, dass die CAR-T-Zell-Wirkungen im Patienten gehemmt oder sogar ausgeschaltet werden muss. Hierbei kann man Sicherheitsmechanismen anwenden, die bereits bei der massiven Aktivierung der CAR-T-Zellen eingesetzt werden können oder die erst nach der Aktivierung ein rasches Eingreifen zur Inaktivierung der CAR-T-Zellen ermöglichen²⁴⁹.

Eine häufige Nebenwirkung von CAR-T-Zellen bei hämatologischen Malignomen ist die Entwicklung eines **Zytokinfreisetzungssyndroms (Cytokine-release-Syndrom, CRS)**, das nach der Antigenerkennung durch einen CAR und maximale gleichzeitige T-Zell-Aktivierung als *on-target* Toxizität eintreten und mit Symptomen wie Fieber, Fatigue, Übelkeit und Erbrechen, Hautveränderungen, Tachykardie, Dyspnoe, Hypotonie und Delir einhergehen kann²⁵⁶. Bei einem CRS sind auch andere Zellen des Immunsystems, wie z. B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen etc. und andere Organe beteiligt²⁵⁷. Man klassifiziert die Stärke des CRS nach 5 Graden in milde (1), kurze (2), prolongierte (3), lebensbedrohliche (4) und tödliche (5) Verläufe. Die Zytokine, die bei einem Grad 5 CRS „sturmartig“ ausgeschüttet werden, können ein Herz-Kreislaufversagen auslösen²⁵⁷. Morgan *et al.* haben 2010 einen Fall einer Patientin mit metastasiertem Kolonkarzinom veröffentlicht, die 15 min nach dem Erhalt von ErbB-CAR-T-Zellen einen Zytokinsturm mit z. B. Zunahme von IFN- γ , IL-6 und IL-10 erlitt und fünf Tage später verstarb²⁵⁸.

Ein seit langem verbreiteter Ansatz zur Kontrollierbarkeit bei zellulären Therapien mit T-Zellen ist die Integration eines **Suizidgens** in den Vektor^{204,259}. Die meisten dieser Suizidgene kodieren für Enzyme, die aus nicht-toxischen *Prodrugs* toxische Metabolite entstehen lassen, sodass die Suizidgen-positiven Zellen komplett und spezifisch eliminiert werden können²⁶⁰. Die Expression des integrierten Suizidgens darf sich ohne das *Prodrug* nicht negativ auf die T-Zell-Proliferation und -viabilität auswirken^{204,261,262}. Inzwischen sind diverse Suizidgensysteme entwickelt worden²⁶³. Für die *in vivo* Nutzung gut charakterisiert ist die Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-tk) mit Ganciclovir als *Prodrug*¹⁷⁰. In einigen Studien wird dabei über die Immunogenität des viralen Enzyms berichtet, die bei immunkompetenten Patienten zur Lyse der Transgen-positiven Zellen durch das patienteneigene Immunsystem führte^{264,265}. Als alternatives System wurde das induzierbare humane Caspase 9 (iCasp9)/AP1903-System etabliert, das bereits mehrfach in klinischen Studien eingesetzt wurde und bei dem keine Immunogenität bekannt ist²⁶⁶. Durch die *Prodrug* (AP1903)-vermittelte Dimerisierung des FK506-Bindungsproteins fusioniert mit den zytoplasmatischen Signaldomänen des

humanen Caspase 9-Proteins werden Apoptose-Signale über eine mitochondriale Kaskade eingeleitet und der Zell-Suizid sehr effizient ausgelöst²⁶⁷. AP1903 ist ein kleines synthetisches Molekül, das anders als Ganciclovir keine klinische Anwendung hat²⁶⁸. Bei Leukämie-Patienten, bei denen aufgrund einer *Graft versus Host Disease* (GVHD) ein rasches Ausschalten der Spender-T-Zell-Aktivität notwendig war, wurde iCasp9-basiert eine Zelldepletion von 90 % innerhalb von 30 min erreicht, ohne dass weitere systemische Nebenwirkungen festgestellt wurden²⁵⁹. Es gibt zwar keine bestehenden Studien zu CD44v6-CAR-T-Zellen in Verbindung mit iCasp9-basierten Suizidgensystemen, aber für CD19, GD2 und Mesothelin als Zielantigene laufen aktuell klinische Studien zur CAR-T-Zell-Therapie in Kombination mit iCasp9, deren Ergebnisse es abzuwarten gilt^{264,266}. Momentan stellt das iCasp9-System eines der vielversprechendsten standardisierten Suizidgensysteme in Verbindung mit CAR-T-Zell-Therapien dar.

Zwei Arbeiten zu EGFR- und ErbB2-CARs untersuchten die Wirkung von CARs mit reduzierter **Affinität**^{76,77} als potenziellen Sicherheitsmechanismus der CAR-Therapie. Da die als Zielstrukturen genutzten Antigene auf den Tumorzellen praktisch immer überexprimiert sind, kann man niedrigaffine CARs nutzen, die besser zwischen Normal- und Tumorgewebe unterscheiden, sodass *on-target off-tumor* Nebenwirkungen verringert werden können. Bei hoher Expression des Zielantigens auf dem Tumor ist eine Elimination der Tumorzellen durch niedrigaffine CARs eher zu erwarten als eine Toxizität gegenüber normalen Zellen. Es kommt zwar zu weniger toxischen Effekten, aber auch zu einer geringeren Lysewirkung gegenüber dem Tumor²⁷⁰. Zusätzlich ist dadurch die Heterogenität der Zielantigenexpression auf den malignen Zellen in soliden Tumoren problematisch, da Tumorzellen mit geringerer Expression von den T-Zellen nicht mehr eliminiert werden.

Nach einem grundsätzlich ähnlichen Prinzip der doppelten Bindung wie bei den Split-CARs funktioniert das Modell der **Signalinhibition** zur Therapiekontrolle. Hierbei handelt es sich um eine Anpassung der CAR-Therapie, die imstande ist, Toxizitäten zu reduzieren, indem neben dem eigentlichen zweiten Generation-CAR ein **inhibitorischer CAR (iCAR)** auf der gleichen T-Zelle exprimiert wird, der gegen ein Antigen auf Normalgewebe gerichtet ist. Nach Bindung durch den CAR wird ein inhibitorisches Signal induziert, sodass keine T-Zell-Aktivierung stattfindet, auch wenn das aktivierende CAR-Konstrukt das Zielantigen auf den malignen Zellen bindet^{270,271}. Fedorov *et al.* nutzen *in vitro* einen CD19-CAR mit CD3 und CD28 als kostimulatorische Domänen zusammen mit einem inhibitorischen CAR (iCAR) gegen Prostata-spezifisches

Membran-Antigen (PSMA), das sich neben Prostatamalignomen auch auf Leber-, Nieren-, Darm- und Gehirnzellen befindet, und konnten zeigen, dass es lediglich zu einer T-Zell-Aktivierung kam, sofern kein PSMA-tragendes Gewebe gebunden war²⁷². Dieser Ansatz ist in den letzten 10 Jahren nicht wirklich weiter verfolgt worden, da es schwierig ist, für beide CAR-Konstrukte gleichmäßige und aufeinander abgestimmte Expressionslevel zu erreichen.

4.3 Probleme und Lösungen zur Behandlung solider Tumorentitäten

Der Erfolg der CAR-T-Zell-Therapie zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen konnte bislang leider nicht auf solide Tumore übertragen werden, da die Heterogenität der Tumorantigene solider Tumore, die Tumor-Erreichbarkeit und das inhibitorische TME die CAR-Etablierung auf diesem Gebiet vor große Herausforderungen stellen¹²⁰.

Die genetische Instabilität und epigenetische Veränderungen von Tumoren verursachen **Immunevasionsprozesse (Tumor Antigen Escape)**, die bewirken können, dass Antigene an der Tumorzelloberfläche mutationsbedingt verändert werden und/oder nicht mehr auf jeder Tumorzelle auf gleichhohem Expressionslevel vorhanden sind²⁷³. Ein Teil der Tumorzellen wird dann durch die CAR-T-Zellen nicht angegriffen, was die Effektivität der Therapie deutlich reduziert⁸⁸ und im schlimmsten Fall zum Therapieversagen und Rezidiven führen kann. Diese **heterogene Expression** der Zielantigene und das individuelle Antigenprofil sogar innerhalb eines Tumors schränkt die Auswahl der Antigene je nach Tumorentität stark ein¹²¹, da für die Therapie ausgewählte Tumorantigene nicht auf allen Zellen des Tumors exprimiert werden. Wir konnten zeigen, dass CD44v6 zwar auf KHPEK-Zelllinien zu 12 % bis 98 % exprimiert wird, die große Streubreite weist aber bereits auf die Schwierigkeit hin, homogen exprimierte Zielantigene zu finden.

Die Designvariante des **SUPRA-CARs** (*split, universal and programmable* CAR) könnte genutzt werden, um trotz der Heterogenität alle Zellen innerhalb eines Tumors zu lysieren^{274,275}. Der CAR dient hierbei als universales Konstrukt, an das kurze Adapter gekoppelt werden, die separat appliziert werden und mit ihren scFv-Anteilen mehrere ausgewählte Antigene binden. Bei heterogenen Antigenexpressionsprofilen auf Tumoren lassen sich somit mehrere Zielantigene auf einmal durch ein universales CAR-Konstrukt angreifen^{274,275}. Die Halbwertszeit der Adapter im Blut ist mit Stunden bis Tagen vergleichsweise gering, sodass die Therapie einen reversiblen Ansatz darstellt, der eine regelmäßige Applikation der Adapter erfordert und dadurch *per se* einen

Sicherheitsmechanismus beinhaltet²⁷⁶. Gerade im Sinne des personalisierten Therapieansatzes in der CAR-T-Zell-Therapie könnten SUPRA-CARs zukünftig auch bei KHPEK von Bedeutung sein.

Außerdem kann der Antigenheterogenität durch die Nutzung multispezifischer CARs entgegengewirkt werden. Hierzu könnten **Tandem-CARs**, die zwei scFvs beinhalten, verwendet werden. Beide variablen scFvs werden dabei in einem einzelnen CAR-Konstrukt vereint und über einen Peptidlinker verbunden⁸⁸, sodass eine Aktivierung der CAR-T-Zelle schon nach Bindung eines der beiden scFvs erfolgt. Bei einer weiteren CAR-Variante, den **Doppel-CARs**, werden einfach zwei komplette CARs mittels des gleichen Gentransfervektors in die T-Zellen eingebracht²⁷⁷. T-Zellen, die Tandem- oder Doppel-CARs exprimieren, sind durch die Möglichkeit der Kombination hochaffiner scFvs in der Lage, Tumorzellen effektiv zu lysieren, auch wenn diese nur geringe Mengen jedes einzelnen Antigens exprimieren. Allerdings ist hier bei systemischer Anwendung/intravenösen Gaben der CAR-T-Zellen die *on-target off-tumor* Toxizität noch höher einzuschätzen. Für solide Malignome wären deshalb intratumorale Injektionen denkbar, wie dies z. B. mit einem PanErbB-CAR gegen KHPEK-Zellen bereits in einer Phase I/II-Studie durchgeführt wurde²⁷⁸. Obwohl bisher nur Zwischenergebnisse publiziert wurden, ist klar, dass KHPEK für direkte CAR-Injektionen im Allgemeinen gut zugänglich sind und dass selbst bei Injektionen von 10^7 bis zu 10^9 T4 PanErbB-CAR⁺-T-Zellen praktisch keine CAR-T-Zellen in der Peripherie nachweisbar waren, sodass keine *on-target off-tumor* Toxizitäten auftraten²⁷⁸. Versuche der direkten Injektion von mRNA c-MET-CAR⁺-T-Zellen beim Mammakarzinom zeigten ebenso eine CAR-T-Zell-Anreicherung im Tumor ohne systemische Nebenwirkungen der CAR-T-Zell-Gaben²⁷⁹. Auch bei verschiedenen Hirntumoren wurde wiederholte Injektionen von CAR-T-Zellen in das Tumorareal gut und ohne systemische Nebenwirkungen toleriert^{56,280}. Wir favorisieren deshalb die direkte Applikation der CAR-T-Zellen in den Tumor, da so hochaffine CAR-Konstrukte genutzt werden könnten und durch weitere genetische Modifikationen der CAR-T-Zellen zudem ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem komplexen TME gesteigert werden könnte.

Selbst wenn geeignete CAR-Antigene identifiziert würden, die von den CARs in unterschiedlichen Design-Varianten erkannt würden und die CAR-T-Zellen gegen die malignen Zellen reagieren ließen, würden bei soliden Tumoren die Effekte und Einflüsse des **Tumormikroenvironment (TME)** die Aktivität der Immuneffektorzellen behindern¹²⁰. Das TME von solide Malignome bildet ein immunsuppressives Netzwerk von nicht-malignen Zellen (*cancer-associated fibroblasts, myeloid-derived suppressor*

cells, M2-Makrophagen, regulatorische T-Zellen), immunsuppressiven löslichen Faktoren (TGF- β , IL-10, Adenosin, Prostaglandin E2) und Extrazellulärmatrixmolekülen, das die CAR-T-Zell-Invasion, -Funktion und -Persistenz hemmt und ganz wesentlich zu der schwierigen Therapierbarkeit der soliden Tumore beiträgt¹¹⁹. **TGF- β** wird von Tumoren freigesetzt, was die Ansammlung immunsuppressiver Zellen und eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung und -proliferation begünstigt. Zusätzlich entsteht eine metabolisch ungünstige Tumorumgebung mit hohem Laktatspiegel, saurem pH, Hypoxie und oxidativem Stress¹²⁰. Bei soliden Tumoren findet im Stroma eine parakrine Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren statt, die ein Tumorwachstum fördern⁸⁸. Die inhibitorischen Rezeptoren auf den CAR-T-Zellen wie z. B. CTLA-4 oder PD-1 werden durch die Expression von Checkpointinhibitoren auf den Tumorzellen und auch auf den nicht-malignen Zellen im TME gehemmt²⁷¹.

Aspekte des TME können jedoch für die Therapie-Optimierung genutzt werden. Die Kombination von einem Tumorantigen und einem Antigen, das nicht vom Tumor selbst, aber in der Tumorumgebung exprimiert wird, wäre z. B. für ein Split-CAR-Design denkbar und könnte auf Stromabestandteile, VEGF-Rezeptoren (VEGFR) oder das Zellendothel abzielen¹¹⁹. Alternativ könnte über die zusätzliche direkte Injektion von IL-12 in das jeweilige Tumoreareal eine T-Zell-Aktivierung vor Ort erfolgen. IL-12 stimuliert T-Zellen und macht sie gegenüber dem TME resistenter²⁸¹. Bei effektiver Dosierung kann eine Aktivierung der T-Zellen ohne systemische Nebenwirkungen den Therapieerfolg verbessern²⁸². Die Problematik, dass das Eindringen der CAR-T-Zellen in den Tumor (**Trafficking**) durch mechanische Barrieren erschwert ist, kann durch direkte Injektionen umgangen werden^{120,283}. Daneben könnten Enzyme, die die Bestandteile dieser Barrieren zersetzen, beispielsweise Kollagenase, auch das **Trafficking** in den und innerhalb des Tumors verbessern, was im Mausmodell bereits erfolgreich getestet wurde¹²⁰. Auch externe Zusatzverfahren sind denkbar, um die Persistenz im Tumorgebiet zu gewährleisten: Sanz-Ortega *et al.* haben beispielsweise T-Zellen mit magnetischen Nanopartikeln ausgestattet, um diese mithilfe von Magnetfeldern im Tumorgebiet anzureichern²⁸⁴.

4.4 Potenzial von CAR-T-Zellen in Kombinationstherapien

Zwar wäre eine kosteneffiziente CAR-T-Zell-Monotherapie mit bestmöglicher Wirksamkeit wünschenswert, um die CAR-Therapie aber an die Anforderungen solider KHPEK anzupassen, sind aus unterschiedlichen Gründen zukünftig alternative Effektorzellen und Kombinationstherapien sinnvoll.

Die bisher zugelassenen autologen CAR-T-Zell-Therapien sind sehr teure individualisierte Therapien. Die Behandlung mit einer Dosis CAR-T-Zellen der Firma Novartis gegen CD19 betrug initial 475.000 US-Dollar, wobei zwischen 150.000 bis 200.000 US-Dollar zusätzliche Kosten für die ärztliche Betreuung und Behandlung von Komplikationen anfielen²⁸⁵. Bei chemotherapeutisch vorbehandelten Patienten kann es zudem zu einer Dysfunktion der autologen T-Zellen kommen, die die *ex vivo* Herstellung von CAR-T-Zellen erschwert oder sogar unmöglich macht²⁸⁶, sodass **allogene** CAR-Produkte attraktiv wären, die als **off the shelf**-Therapie schnell verfügbar, kostengünstiger produzierbar und bei jedem Patienten anwendbar sind. Allerdings macht die extreme hohe Wahrscheinlichkeit einer GvHD durch die allogenen Effektorzellen es erforderlich, hier einen *Knock-Out* des endogenen TCRs auf den CAR-T-Zellen – z. B. durch CRISPR/Cas9²⁸⁷ – durchzuführen²⁸⁶, so dass die CAR-T-Zellen die fremden HLA-Moleküle nicht erkennen können. Eine praktisch nicht existierende Gefahr einer GvHD ist mit der Nutzung alternativer Immunzellen wie **natürlicher Killerzellen** (NK-Zellen) verbunden, die keiner HLA-Restriktion auf eigene/autologe Zellen unterliegen und trotzdem als professionelle Immuneffektorzellen zytotoxisch wirken²⁸⁸. Für die Herstellung der CAR-NK-Zellen können diese Zellen relativ einfach in großer Anzahl aus dem apharesierten Blut gesunder Spender oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden²⁸⁹. Ein Sicherheitsvorteil liegt auch in der Kurzlebigkeit von NK-Zellen, was zwar zu einer geringeren Expansion und Persistenz der Zellen im Tumor führt, aber auch Toxizitäten minimiert²⁸⁹.

Lokale Injektionen der Effektorzellen in das Tumoreal sind die sicherlich vielversprechendste Applikationsform der Therapie, sowohl bei CAR-T- als auch bei CAR-NK-Zellen. Die gute Erreichbarkeit der KHPEK-Tumorlokalisationen spricht ebenso für die derartige Anwendung, zumal dabei die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Chemotherapie zur Lymphodepletion wegfallen würde.

Die intratumorale CAR-Therapie schließt Kombinationsansätze nicht aus. Bei der Kombination der CAR-T-Zell-Therapie mit **Immun-Checkpointinhibitoren** wird durch die Hemmung immuninhibitorischer Signale die Immunantwort gegenüber den CAR-T-Zellen minimiert und der CAR-Effekt dadurch unterstützt. In einem potenziellen Ansatz könnten CAR-T-Zellen dem Patienten lokal verabreicht werden und zusätzlich Checkpointinhibitoren systemisch appliziert werden, um eine lokale Tumorelimination zu bewirken^{290,291}. Alternativ wäre es möglich, CAR-T-Zellen so zu modifizieren, dass sie selbst vor Ort Checkpointinhibitoren sezernieren, um die intratumorale T-Zell-Persistenz und Wirkung der Effektorzellen zu steigern^{292,293}. Auch ohne die Kombination mit CARs

zeigte die PD-1-Signalinhibition mittels Checkpointinhibitoren in der Vergangenheit ein besseres Gesamtüberleben der Patienten als bei den Standardtherapien²⁹⁴. Hier ist zu prüfen, ob das durch die Wirkung von CARs potenziell weiter steigerbar wäre. Die Effizienz der Immuntherapie mit Checkpointinhibitoren scheint allerdings nicht alleinig von der PD-L1-Expression des Tumors und der infiltrierenden Immunzellen abhängig zu sein, weshalb bei diesen Kombinationsansätzen auch andere Checkpoints (B7-H3, TIGIT, TIM3, LAG3) Beachtung finden und bezüglich der Optimierungsstrategien für die Therapie berücksichtigt werden sollten²⁹⁵.

Um die Immunogenität der Tumoren zu modifizieren, ist die Kombination von CAR-T-Zellen mit **epigenetischen Substanzen** denkbar. An der Entwicklung von Tumoren wie KHPEKs sind Regulationsmechanismen der Epigenetik, also u. a. Modifikationen der DNA und Histone, beteiligt, die mitunter von Histondeacetylasen (HDACs) und DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt werden²⁹⁶. Normalerweise sollten Histonacetylasen und -deacetylasen im Gleichgewicht stehen, um regelrechte DNA-Transkriptionen zu ermöglichen. Beim Ungleichgewicht der Enzyme kann es zu Zellentartungen und Tumorprogression kommen; beispielsweise aufgrund einer HDAC-Überexpression, wie sie bei KHPEK bereits nachgewiesen wurde²⁹⁷. Die Inhibition der HDACs stellt einen möglichen Ansatz zur epigenetischen Regulation dar.

Unterschiedliche DNA-Methylierungen können die Gen-Transkription zusätzlich beeinflussen. Die Hypermethylierung von z. B. *Tumorprotein 53* bei KHPEK bewirkt, dass das Tumorsuppressorgen stillgelegt wird²⁹⁸. Im Gegensatz zu genetischen Mutationen ist der Funktionsverlust der Gene bei epigenetischen Mechanismen aber reversibel und durch das Ausschalten dieser Mechanismen eine regelrechte Transkription wieder erreichbar²⁹⁹. Decitabin ist als DNMT-Inhibitor eine mögliche epigenetische Substanz, die zur Anpassung der Immunogenität von Tumoren bereits getestet wurde.

Mitglieder unserer Arbeitsgruppe publizierten 2021 Daten zur Anwendung von Decitabin bei soliden Blasenkarzinom-Zelllinien in Kombination mit CAR-T-Zellen und beschrieben, dass erstens TAAs auf den Zielzellen hochreguliert, zweitens die Tumorzellapoptose durch Herunterregulation von anti-apoptotischem BCL2L1 und Hochregulation von pro-apoptotischem BID, die zur BCL2-Familie gehören und einen Komplex zur Öffnung der Mitochondrienmembran bilden, begünstigt, und drittens die Toxizität der Effektorzellen über u. a. Chemokinfreisetzen zur T-Zell-Aktivierung gesteigert wurde³⁰⁰. Laufende Studien zur Gabe von Decitabin bei soliden Tumoren werden erste Erkenntnisse liefern, um die direkte Gabe von z. B. Inhibitoren von

Mitgliedern der BCL2-Familie in Kombination mit CAR-T-Zellen bei KHPEK-Patienten zu etablieren.

Insgesamt wird deutlich, dass die **CAR-T-Zell-Therapie als personalisierter Therapieansatz** eine wegweisender Neuerung im Bereich der Immuntherapie von KHPEK sein kann, sofern die Komplexität solider Tumore im Ganzen berücksichtigt wird und eine Kombinationstherapie etabliert wird, die durch die Integration von Sicherheitsmechanismen kontrollierbar, durch Strategien gegen das TME effektiv applizierbar und durch die Kombination mit anderen Ansätzen wie der Checkpoint-Inhibition oder epigenetischen Substanzen möglichst spezifisch angreifen kann, um die dringend notwendige Verbesserung des Überlebens von KHPEK-Patienten zu erreichen. CD44v6 stellt als universell exprimiertes und KHPEK-assoziiertes Antigen eine vielversprechendes Zielantigen für einen CAR für dieses Vorhaben dar.

5 Literaturverzeichnis

1. Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, 92 (2020).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
3. Union for International Cancer Control Public Health. *Locally advanced squamous carcinoma of the head and neck - Executive Summary*. https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/applications/HeadNeck.pdf (2014).
4. Remmert, S., Rottmann, M., Reichenbach, M., Sommer, K. & Friedrich, H.-J. Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otologie* **80**, 27–35 (2001).
5. Pisani, P. *et al.* Metastatic disease in head & neck oncology. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* **40**, (2020).
6. Canning, M. *et al.* Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 52 (2019).
7. Goldson, T. M., Han, Y., Knight, K. B., Weiss, H. L. & Resto, V. A. Clinicopathological predictors of lymphatic metastasis in HNSCC: implications for molecular mechanisms of metastatic disease. *J. Exp. Ther. Oncol.* **8**, 211–21 (2010).
8. Petti, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* **45**, 340–350 (2009).
9. Jin, Y. & Yang, Y. Identification and analysis of genes associated with head and neck squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics methods. *Mol. Genet. Genomic Med.* **7**, (2019).
10. Gillison, M. L. *et al.* Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 709–720 (2000).
11. Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet. Oncol.* **11**, 781–9 (2010).
12. Liu, C., Mann, D., Sinha, U. K. & Kokot, N. C. The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **47**,

- 59 (2018).
13. TNM Classification of Malignant Tumours | UICC. Available at: <https://www.uicc.org/what-we-do/sharing-knowledge/tnm>. (Accessed: 27th June 2023)
14. Matos, L. L. *et al.* External validation of the AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition, in an independent cohort of oral cancer patients. *Oral Oncol.* **71**, 47–53 (2017).
15. Huang, S. *et al.* CD44v6 expression in human skin keratinocytes as a possible mechanism for carcinogenesis associated with chronic arsenic exposure. *Eur. J. Histochem.* **57**, 1–9 (2013).
16. Lydiatt, W. M. *et al.* Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 122–137 (2017).
17. Mattavelli, D. *et al.* The 8th TNM classification for oral squamous cell carcinoma: What is gained, what is lost, and what is missing. *Oral Oncol.* **111**, (2020).
18. Vermorken, J. B. & Specenier, P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol.* **21**, 252–261 (2010).
19. Matta, A. & Ralhan, R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* **1**, 6 (2009).
20. Sacco, A. G. & Cohen, E. E. Current treatment options for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3305–3315 (2015).
21. J.-P. Machiels, C. René Leemans, W. Golusinski, C. Grau, L. Licitra & V. Gregoire, on behalf of the EHNS Executive Board, E. G. C. and E. E. B. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **7**, (2020).
22. Deutsche Gesellschaft für Mund-, K. G. (DGMKG). *Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.* (2019).
23. Onkologie, L. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. 1–156 (2021).
24. *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms.* (2019).

25. Kovács, A. F. Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **33**, 447–53 (2004).
26. Bailey, J. S., Blanchaert, R. H. & Ord, R. A. Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **59**, 1007–1010 (2001).
27. Zelefsky, M. J. *et al.* Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **25**, 17–21 (1993).
28. Hosal, A. S., Carrau, R. L., Johnson, J. T. & Myers, E. N. Selective neck dissection in the management of the clinically node-negative neck. *Laryngoscope* **110**, 2037–40 (2000).
29. de Almeida, J. R. *et al.* Treatment implications of postoperative chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity with minor and major extranodal extension. *Oral Oncol.* **110**, (2020).
30. Rieke, D. T., Klinghammer, K. & Keilholz, U. Targeted Therapy of Head and Neck Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **39**, 780–786 (2016).
31. Ling, D. C., Bakkenist, C. J., Ferris, R. L. & Clump, D. A. Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **28**, 12–16 (2018).
32. Fasano, M. *et al.* Head and neck cancer: the role of anti-EGFR agents in the era of immunotherapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **13**, (2021).
33. Vermorken, J. B. *et al.* Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1116–1127 (2008).
34. Agency, E. M. Erbitux (cetuximab) EPAR summary for the public. *PharmaDeals Rev.* **2004**, (2004).
35. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567–578 (2006).
36. Baysal, H. *et al.* Cetuximab-induced natural killer cell cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines: investigation of the role of cetuximab sensitivity and HPV status. *Br. J. Cancer* **123**, 752–761 (2020).
37. Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1856–1867 (2016).
38. Burtneß, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the

- head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)* **394**, 1915–1928 (2019).
39. Tseng, D., Schultz, L., Pardoll, D. & Mackall, C. Cancer Immunology. in *Abeloff's Clinical Oncology* 84–96 (2019).
40. Cha, J.-H., Chan, L.-C., Li, C.-W., Hsu, J. L. & Hung, M.-C. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol. Cell* **76**, 359–370 (2019).
41. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16 (2018).
42. Mei, Z., Huang, J., Qiao, B. & Lam, A. K. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Sci.* **12**, 16 (2020).
43. Vasiliadou, I. *et al.* Safety and Treatment Outcomes of Nivolumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Retrospective Multicenter Cohort Study. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
44. de Sousa, L. G. & Ferrarotto, R. Pembrolizumab in the first-line treatment of advanced head and neck cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **21**, 1321–1331 (2021).
45. Cramer, J. D., Burtneß, B. & Ferris, R. L. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. *Oral Oncology* **99**, (2019).
46. Ito, T. *et al.* PD-L1 Expression and Survival Rates Using TPS and CPS for Nivolumab-treated Head-and-Neck Cancer. *Anticancer Res.* **42**, 1547–1554 (2022).
47. Cohen, E. E. W. W. *et al.* Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **393**, 156–167 (2019).
48. Psyrri, A. *et al.* Durvalumab with or without tremelimumab versus the EXTREME regimen as first-line treatment for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: KESTREL, a randomized, open-label, phase III study. *Ann. Oncol.* **34**, 262–274 (2023).
49. Sherman, E. *et al.* Safety and efficacy of cobimetinib plus atezolizumab in patients with solid tumors: a phase II, open-label, multicenter, multicohort study. *ESMO Open* **8**, (2023).

50. Botticelli, A. *et al.* Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 in Head and Neck Cancer: A Network Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology* **12**, (2021).
51. Lipson, E. J. & Drake, C. G. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6958–62 (2011).
52. Murphy, K. & Weaver, C. Die T-Zell-vermittelte Immunität. in *Janeway Immunologie* 443–515 (2018).
53. Ferris, R. L. *et al.* Phase I Trial of Cetuximab, Radiotherapy, and Ipilimumab in Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* **28**, 1335–1344 (2022).
54. Haddad, R. I. *et al.* Nivolumab Plus Ipilimumab Versus EXTREME Regimen as First-Line Treatment for Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Final Results of CheckMate 651. *J Clin Oncol* **41**, 2166–2180 (2022).
55. Harrington, K. J. *et al.* Efficacy and Safety of Nivolumab Plus Ipilimumab vs Nivolumab Alone for Treatment of Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Phase 2 CheckMate 714 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **9**, 779–789 (2023).
56. Larson, R. C. & Maus, M. V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 145–161 (2021).
57. Schultz, L. & Mackall, C. L. The future of CAR T-cell therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia in pediatrics and adolescents. *Expert Opin. Biol. Ther.* **23**, 633–640 (2023).
58. Finck, A. V, Blanchard, T., Roselle, C. P., Golinelli, G. & June, C. H. Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond. *Nat Med* **28**, 678–689 (2022).
59. Ogba, N. *et al.* Chimeric antigen receptor T-cell therapy. *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **16**, 1093–1106 (2018).
60. Wang, H.-Q. *et al.* Advances in CAR-T Cell Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Clin. Med.* **12**, 2173 (2023).
61. Hu, C. *et al.* Recent advances and future perspectives of CAR-T cell therapy in head and neck cancer. *Frontiers in Immunology* **14**, (2023).
62. Almeida, L., Lochner, M., Berod, L. & Sparwasser, T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* **28**, 514–524 (2016).

63. Kumari, S., Curado, S., Mayya, V. & Dustin, M. L. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 546–556 (2014).
64. Mariuzza, R. A., Agnihotri, P. & Orban, J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J. Biol. Chem.* **295**, 914–925 (2020).
65. Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 735–747 (2002).
66. Kumar, B. V, Connors, T. J. & Farber, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **48**, 202–213 (2018).
67. Kedzierska, K. & Koutsakos, M. The ABC of Major Histocompatibility Complexes and T Cell Receptors in Health and Disease. *Viral Immunol.* **33**, 160–178 (2020).
68. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
69. Purbhoo, M. A. *et al.* Quantifying and Imaging NY-ESO-1/LAGE-1-Derived Epitopes on Tumor Cells Using High Affinity T Cell Receptors. *J. Immunol.* **176**, 7308–7316 (2006).
70. Ramos, C. A. & Dotti, G. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Engineered Lymphocytes for Cancer Therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 855 (2011).
71. Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F. & Zhang, X. Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research* **5**, (2017).
72. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers* **8**, (2016).
73. Benmebarek, M.-R. *et al.* Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
74. Davila, M. L. *et al.* Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int. J. Hematol.* **99**, 361–71 (2014).
75. Huston, J. S. *et al.* Medical Applications of Single-Chain Antibodies. *Int. Rev. Immunol.* **10**, 195–217 (1993).
76. Liu, X. *et al.* Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res* **75**, (2015).
77. Caruso, H. G. *et al.* Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity.

- Cancer Res.* **75**, 3505–18 (2015).
78. Hudecek, M. *et al.* Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3153–3164 (2013).
 79. James, S. E. *et al.* Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *J. Immunol.* **180**, 7028–38 (2008).
 80. Hombach, A. *et al.* T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther.* **7**, 1067–75 (2000).
 81. Guest, R. D. *et al.* The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J. Immunother.* **28**, 203–11 (2005).
 82. Hombach, A. A. *et al.* T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *J. Immunol.* **178**, 4650–7 (2007).
 83. Hudecek, M. *et al.* The Nonsignaling Extracellular Spacer Domain of Chimeric Antigen Receptors Is Decisive for In Vivo Antitumor Activity. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 125–135 (2014).
 84. Jonnalagadda, M. *et al.* Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol. Ther.* **23**, 757–768 (2015).
 85. Bister, A. *et al.* A novel CD34-derived hinge for rapid and efficient detection and enrichment of CAR T cells. *Mol. Ther. oncolytics* **23**, 534–546 (2021).
 86. Bister, A. *et al.* Optimized NGFR-derived hinges for rapid and efficient enrichment and detection of CAR T cells in vitro and in vivo. *Mol. Ther. oncolytics* **26**, 120–134 (2022).
 87. Casucci, M. *et al.* Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front. Immunol.* **9**, 507 (2018).
 88. Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B. & Brenner, M. K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol. Rev.* **257**, 107–126 (2014).
 89. Stoiber, S. *et al.* Limitations in the design of chimeric antigen receptors for

- cancer therapy. *Cells* **8**, (2019).
90. Jafarzadeh, L., Masoumi, E., Fallah-Mehrjardi, K., Mirzaei, H. R. & Hadjati, J. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
 91. Gross, G., Gorochov, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant. Proc.* **21**, 127–30 (1989).
 92. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 720–4 (1993).
 93. Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 10024–8 (1989).
 94. van der Stegen, S. J. C., Hamieh, M. & Sadelain, M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 499–509 (2015).
 95. Finney, H. M., Akbar, A. N. & Lawson, A. D. G. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J. Immunol.* **172**, 104–13 (2004).
 96. Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I. & Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* **20**, 70–5 (2002).
 97. Hombach, A. A., Heiders, J., Foppe, M., Chmielewski, M. & Abken, H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* **1**, 458–466 (2012).
 98. Xu, Y. *et al.* 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 49 (2019).
 99. Song, D.-G. & Powell, D. J. Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives

- effective CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology* **1**, 547 (2012).
100. Guedan, S. *et al.* Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI insight* **3**, (2018).
101. Seimetz, D., Heller, K. & Richter, J. Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med.* **11**, (2019).
102. Albinger, N., Hartmann, J. & Ullrich, E. *Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. Gene Therapy* **28**, 513–527 (Gene Ther, 2021).
103. George, P. *et al.* Third-generation anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cells incorporating a TLR2 domain for relapsed or refractory B-cell lymphoma: A phase i clinical trial protocol (ENABLE). *BMJ Open* **10**, (2020).
104. Tang, X. Y. *et al.* Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: A non-randomised, open-label phase i trial protocol. *BMJ Open* **6**, (2016).
105. Drent, E. *et al.* Combined CD28 and 4-1BB Costimulation Potentiates Affinity-tuned Chimeric Antigen Receptor-engineered T Cells. *Clin. Cancer Res.* **25**, 4014–4025 (2019).
106. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A. A. & Abken, H. IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. *Cancer Res.* **71**, 5697–5706 (2011).
107. Golumba-Nagy, V., Kuehle, J., Hombach, A. A. & Abken, H. CD28- ζ CAR T Cells Resist TGF- β Repression through IL-2 Signaling, Which Can Be Mimicked by an Engineered IL-7 Autocrine Loop. *Mol. Ther.* **26**, 2218–2230 (2018).
108. Chmielewski, M. & Abken, H. CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bethigh FoxO1low Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep.* **21**, 3205–3219 (2017).
109. Chmielewski, M. & Abken, H. TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation. *Adv. Cell Gene Ther.* **3**, 84 (2020).
110. Liu, Y. *et al.* Armored Inducible Expression of IL-12 Enhances Antitumor Activity of Glypican-3-Targeted Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells in Hepatocellular Carcinoma. *J. Immunol.* **203**, 198–207 (2019).

111. Tokarew, N., Ogonek, J., Endres, S., von Bergwelt-Baildon, M. & Kobold, S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br. J. Cancer* **120**, 26–37 (2019).
112. Kagoya, Y. *et al.* A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat. Med.* **24**, 352–359 (2018).
113. Savoldo, B. *et al.* CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 1822–6 (2011).
114. Labanieh, L. & Mackall, C. L. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature* **614**, 635–648 (2023).
115. Hiltensperger, M. & Krackhardt, A. M. Current and future concepts for the generation and application of genetically engineered CAR-T and TCR-T cells. *Front. Immunol.* **14**, 1–15 (2023).
116. Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., Bondanza, A. & Buchholz, C. J. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1183–1197 (2017).
117. MacKay, M. *et al.* The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 233–244 (2020).
118. Patel, U. *et al.* CAR T cell therapy in solid tumors: A review of current clinical trials. *eJHaem* **3**, 24–31 (2022).
119. Newick, K., Moon, E. & Albelda, S. M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Molecular Therapy - Oncolytics* **3**, (2016).
120. Mirzaei, H. R., Rodriguez, A., Shepphird, J., Brown, C. E. & Badie, B. Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
121. Bagley, S. J. & O'Rourke, D. M. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: Lessons learned and future directions. *Pharmacol. Ther.* **205**, (2020).
122. Yu, X. *et al.* Commentary: Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Updates in Glioblastoma Treatment. *Neurosurgery* **89**, 68–69 (2021).
123. Lamers, C. H. J. *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 20–22 (2006).

124. Till, B. G. *et al.* Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* **112**, 2261–71 (2008).
125. Kershaw, M. H. *et al.* A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6106 (2006).
126. Leko, V. & Rosenberg, S. A. Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell* **38**, 454–472 (2020).
127. Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1503–1520 (2011).
128. Maadi, H., Nami, B., Tong, J., Li, G. & Wang, Z. The effects of trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2. *BMC Cancer* **18**, 238 (2018).
129. Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Lehrb.* **8**, (2006).
130. Rogers, S. J., Harrington, K. J., Rhys-Evans, P., O-Charoenrat, P. & Eccles, S. A. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 47–69 (2005).
131. Papa, S. *et al.* A phase I trial of T4 CAR T-cell immunotherapy in head and neck squamous cancer (HNSCC). *J. Clin. Oncol.* **36**, 3046–3046 (2018).
132. Guigay, J. *et al.* TPEXtreme randomized trial: TPEX versus Extreme regimen in 1st line recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). *J. Clin. Oncol.* **37**, 6002–6002 (2019).
133. Rude Voldborg, B., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. & Poulsen, H. S. *Review Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Annals of Oncology* **8**, (1997).
134. von Witzleben, A., Wang, C., Laban, S., Savelyeva, N. & Ottensmeier, C. H. HNSCC: Tumour Antigens and Their Targeting by Immunotherapy. *Cells* **9**, (2020).
135. Chen, J. *et al.* Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiol Rev* **96**, 1025–1069 (2016).
136. Ho, C. *et al.* Escalating weekly doses of cetuximab and correlation with skin toxicity: A phase I study. *Invest. New Drugs* **29**, 680–687 (2011).

137. Feng, K. *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.* **59**, 468–479 (2016).
138. Zhang, Y. *et al.* Phase I clinical trial of EGFR-specific CAR-T cells generated by the piggyBac transposon system in advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **147**, 3725–3734 (2021).
139. Warta, R. *et al.* Reduced promoter methylation and increased expression of CSPG4 negatively influences survival of HNSCC patients. *Int. J. cancer* **135**, 2727–34 (2014).
140. Ilieva, K. M. *et al.* Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 and Its Potential As an Antibody Immunotherapy Target across Different Tumor Types. *Front. Immunol.* **8**, 1911 (2017).
141. Geldres, C. *et al.* T lymphocytes redirected against the chondroitin sulfate proteoglycan-4 control the growth of multiple solid tumors both in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **20**, 962–71 (2014).
142. Harrer, D. C., Schuler, G., Dörrie, J. & Schaft, N. CSPG4-Specific CAR T Cells for High-Risk Childhood B Cell Precursor Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2764 (2019).
143. Nota, S. P. F. T. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan 4 expression in chondrosarcoma: A potential target for antibody-based immunotherapy. *Front. Oncol.* **12**, 4119 (2022).
144. Harrer, D. C., Dörrie, J. & Schaft, N. CSPG4 as Target for CAR-T-Cell Therapy of Various Tumor Entities-Merits and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
145. Boldrup, L. *et al.* Levels of MUC1 in tumours and serum of patients with different sub-types of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol. Lett.* **20**, 1709–1718 (2020).
146. Chen, W. *et al.* Muc1: Structure, function, and clinic application in epithelial cancers. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, (2021).
147. Mei, Z. *et al.* MUC1 as a target for CAR-T therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* **9**, 640–652 (2020).
148. Posey Jr, A. D. *et al.* Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* **44**, 1444–1454 (2016).
149. Summers, S. E., Salih, V. & Foey, A. D. ErbB- and MUC1-targeted CAR-T cell

- immunotherapy of oral squamous cell carcinoma. *Front. Dent. Med.* **4**, 1–10 (2023).
150. Wilkie, S. *et al.* Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* **32**, 1059–70 (2012).
 151. Andratschke, M. *et al.* Limited suitability of EpCAM for molecular staging of tumor borders in head and neck cancer. *Anticancer Res.* **26**, 153–158 (2006).
 152. Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M. & Baeuerle, P. A. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer and Metastasis Reviews* **39**, 969–987 (2020).
 153. Tijink, B. M. *et al.* A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6064–6072 (2006).
 154. Schmitt, M., Metzger, M., Gradl, D., Davidson, G. & Orian-Rousseau, V. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ.* **22**, 677–689 (2015).
 155. Martegani, M. P., Del Prete, F., Gasbarri, A., Natali, P. G. & Bartolazzi, A. Structural variability of CD44v molecules and reliability of immunodetection of CD44 isoforms using mAbs specific for CD44 variant exon products. *Am. J. Pathol.* **154**, 291–300 (1999).
 156. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
 157. Spiegelberg, D., Kuku, G., Selvaraju, R. & Nestor, M. Characterization of CD44 variant expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Tumor Biol.* **35**, 2053–2062 (2014).
 158. Spiegelberg, D. & Nilvebrant, J. CD44v6-targeted imaging of head and neck squamous cell carcinoma: Antibody-based approaches. *Contrast Media Mol. Imaging* **2017**, (2017).
 159. Athanassiou-Papaefthymiou, M. *et al.* Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **27**, 337–349 (2014).
 160. Matzke, A. Funktion der extrazellulären Domäne von CD44 v6 als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren. 130 (2006).

161. Mack, B. & Gires, O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One* **3**, (2008).
162. Fonseca, I., Moura Nunes, J. F. F. & Soares, J. Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol.* **114**, 483–8 (2000).
163. Riechelmann, H. *et al.* Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **44**, 823–829 (2008).
164. Afify, A., Durbin-Johnson, B., Viridi, A. & Jess, H. The expression of CD44v6 in colon: from normal to malignant. *Ann. Diagn. Pathol.* **20**, 19–23 (2016).
165. Zhang, H.-F., Hu, P. & Fang, S.-Q. Understanding the role of CD44V6 in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **14**, 1989–1992 (2017).
166. Hu, B. *et al.* Meta-analysis of prognostic and clinical significance of CD44v6 in esophageal cancer. *Medicine (United States)* **94**, (2015).
167. Omara-Opyene, A. L., Qiu, J., Shah, G. V & Iczkowski, K. A. Prostate cancer invasion is influenced more by expression of a CD44 isoform including variant 9 than by Muc18. *Lab. Investig.* **84**, 894–907 (2004).
168. Afify, A., McNiel, M. A., Braggins, J., Bailey, H. & Paulino, A. F. Expression of CD44s, CD44v6, and hyaluronan across the spectrum of normal-hyperplasia-carcinoma in breast. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* **16**, 121–7 (2008).
169. Bellerby, R. *et al.* Overexpression of Specific CD44 Isoforms Is Associated with Aggressive Cell Features in Acquired Endocrine Resistance. *Front. Oncol.* **6**, 145 (2016).
170. Casucci, M. *et al.* CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* **122**, 3461–3472 (2013).
171. Börjesson, P. K. E. *et al.* Phase I therapy study with ¹⁸⁶Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (Bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. in *Clinical Cancer Research* **9**, (2003).
172. Verel, I. *et al.* Tumor targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44V6 in nude mice bearing head-and-neck cancer xenografts. *Int. J. cancer* **99**, 396–402 (2002).
173. Mochizuki, H., Schwartz, J. P., Tanaka, K., Brady, R. O. & Reiser, J. High-titer

- human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* **72**, 8873–83 (1998).
174. Pietschmann, T. *et al.* Foamy Virus Capsids Require the Cognate Envelope Protein for Particle Export. *J. Virol.* **73**, 2613–2621 (1999).
 175. DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379–87 (1987).
 176. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8392 (1993).
 177. Kaykas, A. & Moon, R. T. Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. in *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* **8**, 2004–2007 (2006).
 178. Chang, S. E., Foster, S., Betts, D. & Marnock, W. E. DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *Int. J. Cancer* **52**, 896–902 (1992).
 179. Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* **2**, 315–319 (2002).
 180. Carey, T. E. *et al.* Antibodies to human squamous cell carcinoma. *Otolaryngol. Neck Surg.* **91**, 482–491 (1983).
 181. Krause, C. J. *et al.* Human squamous cell carcinoma. Establishment and characterization of new permanent cell lines. *Arch. Otolaryngol.* **107**, 703–10 (1981).
 182. Brenner, J. C. *et al.* Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck* **32**, 417 (2010).
 183. Pekkola-Heino, K., Servomaa, K., And, A. K. & Grénman, R. Increased Radiosensitivity is Associated with p53 Mutations in Cell Lines Derived from Oral Cavity Carcinoma. *Acta Otolaryngol.* **116**, 341–344 (1996).
 184. Grénman, R. *et al.* In vitro radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **67**, 2741–2747 (1991).
 185. Chong, Z. X., Yeap, S. K. & Ho, W. Y. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ* **9**, (2021).
 186. Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. & Elsasser, H.-P. Intracellular

- route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J. Control. Release* **82**, 441–54 (2002).
187. Cornetta, K. & Anderson, W. F. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J. Virol. Methods* **23**, 187–94 (1989).
188. Nowak-Terpiłowska, A., Śledziński, P. & Zeyland, J. Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **54**, 1–7 (2021).
189. Jho, E. *et al.* Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1172–83 (2002).
190. Tang, L. *et al.* CD44v6 chimeric antigen receptor T cell specificity towards AML with FLT3 or DNMT3A mutations. *Clin. Transl. Med.* **12**, (2022).
191. Syrjä, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann. Oncol.* **21**, 243–245 (2010).
192. Klinakis, A. & Rampias, T. TP53 mutational landscape of metastatic head and neck cancer reveals patterns of mutation selection. *EBioMedicine* **58**, (2020).
193. Balló, H. *et al.* Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res.* **19**, 3827–3836 (1999).
194. Hauser, U. *et al.* Reliable detection of p53 aberrations in squamous cell carcinomas of the head and neck requires transcript analysis of the entire coding region. *Head Neck* **24**, 868–873 (2002).
195. Carey, T. E. *Head and Neck Tumor Cell Lines in: Atlas of Human Tumor Cell Lines.* (Academic Press, 1994).
196. Soukka, T. *et al.* Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res.* **57**, 2281–2289 (1997).
197. Johansson, N. *et al.* Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am. J. Pathol.* **151**, 499–508 (1997).
198. Lin, C. J. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* **29**, 163–88 (2007).
199. Lansford, C. D. *et al.* Head and Neck Cancers. in *Human Cell Culture* 185–255 (Kluwer Academic Publishers, 1999).

200. Bradford, C. R. *et al.* Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **104**, 303–10 (1991).
201. Tang, A. L. *et al.* UM-SCC-104: a new human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head Neck* **34**, 1480–91 (2012).
202. Haist, C. *et al.* CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol.* **116**, (2021).
203. Gutjahr, J. C. *et al.* Microenvironment-induced CD44v6 promotes early disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **131**, 1337–1349 (2018).
204. Roellecke, K. *et al.* Optimized human CYP4B1 in combination with the alkylator prodrug 4-ipomeanol serves as a novel suicide gene system for adoptive T-cell therapies. *Gene Ther.* **23**, 615–626 (2016).
205. Voisinne, G., Gonzalez de Peredo, A. & Roncagalli, R. CD5, an Undercover Regulator of TCR Signaling. *Front. Immunol.* **9**, 2900 (2018).
206. Feldman, R. *et al.* Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **38**, 1625–1638 (2016).
207. Tabbekh, M., Mokrani-Hammani, M., Bismuth, G. & Mami-Chouaib, F. T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
208. Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H. & Brenner, M. K. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood* **126**, 983–92 (2015).
209. Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* **243**, 167–90 (2000).
210. Kiesgen, S., Messinger, J. C., Chintala, N. K., Tano, Z. & Adusumilli, P. S. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **16**, 1331–1342 (2021).
211. Halim, L. & Maher, J. CAR T-cell immunotherapy of B-cell malignancy: the story so far. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy* **8**, 1–17 (2020).
212. Cappell, K. M. & Kochenderfer, J. N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **20**, 359–371 (2023).
213. Pardoll, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev.*

- Immunol.* **21**, 807–39 (2003).
214. Poorebrahim, M. *et al.* Genetically modified immune cells targeting tumor antigens. *Pharmacology and Therapeutics* **214**, (2020).
 215. Atanackovic, D. *et al.* Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1218–25 (2006).
 216. Jakobsen, M. K. & Gjerstorff, M. F. CAR T-Cell Cancer Therapy Targeting Surface Cancer/Testis Antigens. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
 217. Roca, X. *et al.* CD44 Isoform Expression Follows Two Alternative Splicing Pathways in Breast Tissue. *Am. J. Pathol.* **153**, 183–190 (1998).
 218. Shimabukuro, K. *et al.* The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **64**, 26–34 (1997).
 219. Kasper, M. *et al.* Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 648–656 (1995).
 220. Gansauge, F. *et al.* Differential Expression of CD44 Splice Variants in Human Pancreatic Adenocarcinoma and in Normal Pancreas. *Cancer Res.* **55**, 5499–5503 (1995).
 221. Zhao, H. *et al.* Prognostic significance of Survivin and CD44v6 in laryngeal cancer surgical margins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1051–1058 (2008).
 222. Yanamoto, S. *et al.* Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: Effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence. *Int. J. Oncol.* **44**, 1153–1162 (2014).
 223. Mulder, J. W. *et al.* Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet (London, England)* **344**, 1470–2 (1994).
 224. Kaufmann, M. *et al.* CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet (London, England)* **345**, 615–9 (1995).
 225. Salmi, M. *et al.* Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J. Cell Biol.* **122**, 431–42 (1993).
 226. Odenthal, J. *et al.* Targeting CD44v6 for fluorescence-guided surgery in head and neck squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **8**, (2018).

227. Bánky, B. *et al.* Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol. Cancer* **11**, 83 (2012).
228. Azevedo, R. *et al.* CD44 glycoprotein in cancer: A molecular conundrum hampering clinical applications. *Clin. Proteomics* **15**, 1–5 (2018).
229. Herold-Mende, C. *et al.* Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J. Pathol.* **179**, 66–73 (1996).
230. Kuhnert, F. *et al.* Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 266–71 (2004).
231. Alexandra Solis, M. *et al.* Hyaluronan Regulates Cell Behavior: A Potential Niche Matrix for Stem Cells. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 11 (2012).
232. Ozawa, M. *et al.* Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **111**, 365–74 (2014).
233. Zeilstra, J. *et al.* Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. *Oncogene* **33**, 665–70 (2014).
234. Franzmann, E. J., Weed, D. T., Civantos, F. J., Goodwin, W. J. & Bourguignon, L. Y. A novel CD44 v3 isoform is involved in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **124**, 426–32 (2001).
235. Christ, O., Günthert, U., Haas, R. & Zöller, M. Importance of CD44v7 isoforms for homing and seeding of hematopoietic progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 343–352 (2001).
236. Erb, U., Megaptche, A. P., Gu, X., Büchler, M. W. & Zöller, M. CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells. *J. Hematol. Oncol.* **7**, 29 (2014).
237. Zoeller, M. CD44v10 in Hematopoiesis and Stem Cell Mobilization. *Leuk. Lymphoma* **38**, 463–480 (2000).
238. Mackay, C. R. *et al.* Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J. Cell Biol.* **124**, 71–82 (1994).
239. Bloor, B. K., Jelvagharan, M., White, K. N. & Odell, E. W. Characterization of CD44 splicing patterns in normal keratinocytes, dysplastic and squamous carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **18**, 1053–9 (2001).
240. Rail, C. J. N. & Rustgi, A. K. CD44 Isoform Expression in Primary and Metastatic

- Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **55**, 1831–1835 (1995).
241. Imam, H., Eriksson, B. & Öberg, K. Expression of CD44 variant isoforms and association to the benign form of endocrine pancreatic tumours. *Ann. Oncol.* **11**, 295–300 (2000).
 242. Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P. & Ponta, H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* **16**, 3074–86 (2002).
 243. Iczkowski, K. A., Bai, S. & Pantazis, C. G. Prostate cancer overexpresses CD44 variants 7-9 at the messenger RNA and protein level. *Anticancer Res.* **23**, 3129–40 (2003).
 244. Inoue, K. & Fry, E. A. Aberrant splicing of estrogen receptor, HER2, and CD44 genes in breast cancer. *Genet. Epigenetics* **1**, 19–32 (2015).
 245. Taniguchi, H., Suzuki, Y. & Natori, Y. The Evolving Landscape of Cancer Stem Cells and Ways to Overcome Cancer Heterogeneity. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 246. Günthert, U. *et al.* A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**, 13–24 (1991).
 247. Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., Zhu, D. & Chen, Y. W. Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**, 269–87 (1999).
 248. J Wielenga, K H Heider, G J Offerhaus, G R Adolf, F M van den Berg, H Ponta, P Herrlich, S. T. P. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* **53**, 4754–4756 (1993).
 249. Wang, Z., Wu, Z., Liu, Y. & Han, W. New development in CAR-T cell therapy. *Journal of Hematology and Oncology* **10**, (2017).
 250. Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J. & Curran, K. J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics* **3**, (2016).
 251. Stroemer, J. W. G. *et al.* Safety and biodistribution of 99mtechnetium-labeled anti-CD44v6 monoclonal antibody BIWA 1 in head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3046–3055 (2000).
 252. Greenman, R. *et al.* Shaping Functional Avidity of CAR T Cells: Affinity, Avidity, and Antigen Density That Regulate Response. *Mol. Cancer Ther.* **20**, 872–884 (2021).

253. Stornaiuolo, A. *et al.* Characterization and functional analysis of CD44v6.CAR T cells endowed with a new low-affinity nerve growth factor receptor-based spacer. *Hum. Gene Ther.* **32**, 744–760 (2021).
254. Maher, J. & Davies, D. M. CAR-Based Immunotherapy of Solid Tumours—A Survey of the Emerging Targets. *Cancers (Basel)*. **15**, 1–30 (2023).
255. Kloss, C. C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. & Sadelain, M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 71–75 (2013).
256. Lee, D. W. *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* **124**, 188–195 (2014).
257. Shimabukuro-Vornhagen, A. *et al.* Cytokine release syndrome. *J. Immunother. cancer* **6**, 56 (2018).
258. Morgan, R. A. *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* **18**, 843–51 (2010).
259. Gargett, T. & Brown, M. P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a ‘safety switch’ to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T-cells. *Front. Pharmacol.* **5**, 235 (2014).
260. Sheikh, S., Ernst, D. & Keating, A. Prodrugs and prodrug-activated systems in gene therapy. *Mol. Ther.* **29**, 1716–1728 (2021).
261. Wiek, C. *et al.* Identification of amino acid determinants in CYP4B1 for optimal catalytic processing of 4-ipomeanol. *Biochem. J.* **465**, 103–114 (2014).
262. Roellecke, K. *et al.* Ligand characterization of CYP4B1 isoforms modified for high-level expression in Escherichia coli and HepG2 cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **30**, 207–218 (2017).
263. Brandt, L. J. B., Barnkob, M. B., Michaels, Y. S., Heiselberg, J. & Barington, T. Emerging Approaches for Regulation and Control of CAR T Cells: A Mini Review. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
264. Kalinin, R. S. *et al.* Molecular Approaches to Safe and Controlled Engineered T-cell Therapy. *Acta Naturae* **10**, 16–23 (2018).
265. Berger, C., Flowers, M. E., Warren, E. H. & Riddell, S. R. Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **107**, 2294–302 (2006).

266. Caulier, B., Enserink, J. M. & Wälchli, S. Pharmacologic Control of CAR T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
267. Di Stasi, A. *et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1673–83 (2011).
268. Zhou, X. *et al.* Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood* **123**, 3895–905 (2014).
269. Lynn, R. C. *et al.* High-affinity FR β -specific CAR T cells eradicate AML and normal myeloid lineage without HSC toxicity. *Leukemia* **30**, 1355–64 (2016).
270. Casucci, M., Hawkins, R. E., Dotti, G. & Bondanza, A. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 123–130 (2015).
271. Srivastava, S. & Riddell, S. R. Engineering CAR-T Cells: Design Concepts. *Trends Immunol.* **36**, 494–502 (2015).
272. Fedorov, V. D., Themeli, M. & Sadelain, M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci. Transl. Med.* **5**, 215 (2013).
273. Majzner, R. G. & Mackall, C. L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* **8**, 1219–1226 (2018).
274. Cho, J. H., Collins, J. J. & Wong, W. W. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* **173**, 1426–1438 (2018).
275. Chen, Y. Y. Increasing T Cell Versatility with SUPRA CARs. *Cell* **173**, 1316–1317 (2018).
276. Bachmann, M. The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells. *Immunol. Lett.* **211**, 13–22 (2019).
277. Xie, B., Li, Z., Zhou, J. & Wang, W. Current Status and Perspectives of Dual-Targeting Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Treatment of Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).
278. Larcombe-Young, D., Papa, S. & Maher, J. PanErbB-targeted CAR T-cell immunotherapy of head and neck cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **20**, 965–970 (2020).
279. Tchou, J. *et al.* Safety and Efficacy of Intratumoral Injections of Chimeric Antigen

- Receptor (CAR) T Cells in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 1152–1161 (2017).
280. Asghar, N. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR T-Cell) Therapy for Primary and Secondary Central Nervous System Lymphoma: A Systematic Review of Literature. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* **23**, 15–21 (2023).
281. Agliardi, G. *et al.* Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma. *Nat. Commun.* **12**, 444 (2021).
282. Alwan, L. M. *et al.* Comparison of acute toxicity and mortality after two different dosing regimens of high-dose interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *Target. Oncol.* **9**, 63–71 (2014).
283. Heyman, B. & Yang, Y. Chimeric antigen receptor T cell therapy for solid tumors: Current status, obstacles and future strategies. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–21 (2019).
284. Sanz-Ortega, L. *et al.* T cells loaded with magnetic nanoparticles are retained in peripheral lymph nodes by the application of a magnetic field. *J. Nanobiotechnology* **17**, 14 (2019).
285. Chabannon, C. *et al.* CAR-T cells: the narrow path between hope and bankruptcy? *Bone Marrow Transplant.* **52**, 1588–1589 (2017).
286. Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S. A., Mufti, G. & Poirot, L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* **19**, 185–199 (2020).
287. Eyquem, J. *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* **543**, 113–117 (2017).
288. Xie, G. *et al.* CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* **59**, (2020).
289. Marofi, F. *et al.* Renaissance of armored immune effector cells, CAR-NK cells, brings the higher hope for successful cancer therapy. *Stem Cell Research and Therapy* **12**, (2021).
290. Ghanizada, M., Jakobsen, K. K., Grønhøj, C. & von Buchwald, C. The effects of checkpoint inhibition on head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol.* **90**, 67–73 (2019).
291. Yoon, D., Osborn, M., Tolar, J. & Kim, C. Incorporation of Immune Checkpoint

- Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 340 (2018).
292. Xu, J. *et al.* Combination therapy: A feasibility strategy for CAR-T cell therapy in the treatment of solid tumors. *Oncol. Lett.* **16**, 2063–2070 (2018).
 293. Hosseinkhani, N. *et al.* Immune Checkpoints and CAR-T Cells: The Pioneers in Future Cancer Therapies? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 294. Patel, J. J., Levy, D. A., Nguyen, S. A., Knochelmann, H. M. & Day, T. A. Impact of PD-L1 expression and human papillomavirus status in anti-PD1/PDL1 immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma-Systematic review and meta-analysis. *Head Neck* **42**, 774–786 (2020).
 295. Tang, T. *et al.* Advantages of targeting the tumor immune microenvironment over blocking immune checkpoint in cancer immunotherapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 72 (2021).
 296. Le, J. Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J. Stem Cells* **6**, 511 (2014).
 297. Castilho, R. M., Squarize, C. H. & Almeida, L. O. Epigenetic modifications and head and neck cancer: Implications for tumor progression and resistance to therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, (2017).
 298. Gaździcka, J., Gołębek, K., Strzelczyk, J. K. & Ostrowska, Z. Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. *Biochemical Genetics* **58**, 213–244 (2020).
 299. Saldaña-Meyer, R. & Recillas-Targa, F. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* **6**, 1068–1077 (2011).
 300. Grunewald, C. M. *et al.* Epigenetic Priming of Bladder Cancer Cells With Decitabine Increases Cytotoxicity of Human EGFR and CD44v6 CAR Engineered T-Cells. *Front. Immunol.* **12**, 1–15 (2021).

6 Anhang

6.1 Auflistung der Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau und Entwicklung der CAR-Generationen _____	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung von CD44 und den varianten Isoformen CD44s und CD44v6 als Oberflächenproteine und auf Exonebene _____	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines SIN lentiviralen Vektors _____	21
Abbildung 4: Ficoll-Zentrifugation zur Auftrennung von Blutbestandteilen _____	26
Abbildung 5: Klonierungsstrategie für die CD44v6- und CD44s-Expressionsplasmide _____	32
Abbildung 6: CD44- bzw. CD44v6-Expression auf HEK293T-Zellen nach Transduktion _____	33
Abbildung 7: CD44 und CD44v6 Expression auf KHPEK-Zelllinien, HOK, DOK und HeLa.P3 _____	35
Abbildung 8: Expressionsniveau von CD44v6 in ausgewählten KHPEK-Zelllinien _____	37
Abbildung 9: Expression der CAR-Konstrukte auf primären T-Zellen _____	39
Abbildung 10: Zytotoxizität von CD44v6-CAR ⁺ -T-Zellen gegen UM14C-Zellen via FACS- und MTS-basierter Assaymethode _____	41
Abbildung 11: Zytotoxizität von CD44v6-CAR ⁺ -T-Zellen gegen UM11B ^{CD44v6++} - und UT24A ^{CD44v6+} -Zellen _____	43
Abbildung 12: Zytotoxizität von CD44v6-CAR ⁺ -T-Zellen gegen UT24A CD44v6+ - und UT24A LV-Zellen _____	45

6.2 Auflistung der Tabellen

Tabelle 1: Medium, Puffer und Lösungen _____	18
Tabelle 2: Antibiotika _____	19
Tabelle 3: Kits, Enzyme und Längenstandard _____	19
Tabelle 4: Oligonukleotide _____	20
Tabelle 5: Zelllinien _____	22
Tabelle 6: Antikörper _____	22
Tabelle 7: Transfektions-Ansatz _____	27
Tabelle 8: Übersicht der untersuchten primären KHPEK-Zelllinien _____	34
Tabelle 9: Klonierungsstrategie für puc2CL21BFPT2ACD44v6c6 _____	38
Tabelle 10: Übersichtsdarstellung zum Aufbau und Vorkommen von CD44-Spleißvarianten _	49