

Bispezifische Antikörper zur Behandlung solider Tumore und der Einfluss von Thrombozyten auf ihre Wirksamkeit

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Martina Svenja Lutz
aus Kirchheim unter Teck

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

12.05.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut R. Salih

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
2.1	Immunsystem.....	7
2.1.1	Angeborene Immunität	7
2.1.2	Adaptive Immunität.....	8
2.1.3	T-Zellen.....	9
2.2	Tumorimmunologie	10
2.3	Immuntherapie von Tumorerkrankungen.....	11
2.4	Antikörper	13
2.4.1	Struktur von Antikörpern.....	13
2.4.2	Effektormechanismen von IgG Antikörpern	15
2.4.3	Antikörperbasierte Immuntherapie von Tumorerkrankungen	16
2.4.4	Bispezifische Antikörper	18
2.5	B7-H3 als tumorassoziiertes Antigen	20
2.6	Gastrointestinale Tumore	20
2.6.1	Kolorektales Karzinom.....	21
2.6.2	Leberkarzinom	21
2.6.3	Pankreaskarzinom.....	22
2.6.4	Magenkarzinom.....	23
2.7	Thrombozyten	24
3	Zielsetzung der Arbeit	26
3.1	Entwicklung und Optimierung eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers im IgGsc-Format.....	26
3.2	Evaluation des bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers zur Behandlung von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen	26
3.3	Der Einfluss von Thrombozyten auf die Antitumor-Wirksamkeit von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern.....	27
4	Zusammenfassung der Ergebnisse	28
4.1	Entwicklung und Optimierung eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers im IgGsc-Format.....	28
4.2	Evaluation des bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers zur Behandlung von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen	31
4.3	Der Einfluss von Thrombozyten auf die Antitumor-Wirksamkeit von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern.....	32
5	Diskussion	36
6	Abkürzungsverzeichnis	43
7	Literaturverzeichnis	45
8	Eigene Publikationen	59
9	Eigenanteil	61

10	Danksagung.....	63
11	Anhang.....	64

1 Zusammenfassung

T-Zell-basierte Immuntherapien haben die Behandlung von Tumorerkrankungen revolutioniert. Neben Ansätzen, welche die Aktivität von Antigen-spezifischen T-Zellen verstärken, haben auch Ansätze zur Induktion einer MHC-unabhängigen T-Zell-Antwort großes Interesse geweckt. Zu Letzteren gehören unter anderem bispezifische Antikörper, welche nach Bindung an ihr Zielantigen, den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex mit ihrem Effektorteil stimulieren. Trotz ihres unbestrittenen Erfolgs bei der Behandlung hämatologischer Erkrankungen ist ihre Wirksamkeit bei soliden Tumoren stark limitiert. Insbesondere bei gastrointestinalen Tumoren wie kolorektalen, Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen, die nach wie vor durch hohe Rückfallquoten und eine schlechte klinische Prognose gekennzeichnet sind, fehlen effektive immuntherapeutische Behandlungsoptionen. Die Gründe für die eingeschränkte Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern in soliden Tumoren ist noch nicht vollständig geklärt, aber die unzureichende Migration von T-Zellen in den Tumor scheint hierbei ein Hauptfaktor zu sein. B7-H3 wird bei verschiedenen Tumorarten, darunter auch gastrointestinale Tumore, sowohl auf Tumorzellen als auch auf Tumorgefäßen überexprimiert. Dies ermöglicht eine duale zielgerichtete Therapie gegen B7-H3 und könnte die Migration von Effektorzellen in den Tumor verbessern.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines optimierten bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers (CC-3) zur Behandlung von kolorektalen Karzinomen beschrieben. Beim Vergleich unterschiedlicher B7-H3 Antikörperklone in unserem bispezifischen Antikörperformat zeigte sich, dass bei Targeting eines membrannahen B7-H3-Epitops (Klon 7C4) eine deutlich höhere T-Zell-Aktivität induziert wird als mit einem distal-bindenden Antikörperklon (8H8). Untersuchungen zum Einfluss der CD3-Affinität auf die Effektivität der bispezifischen Konstrukte zeigten, dass die Verwendung des membrannah-bindenden Klons 7C4 eine etwa 100-fache Reduzierung der CD3-Affinität ermöglicht, ohne die Wirksamkeit des Konstrukts zu verringern. Umfassende funktionelle Analysen zeigten die Überlegenheit unseres finalen Konstruktes CC-3 in Hinblick auf Tumorzellyse sowie T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Gedächtnisbildung, während die unerwünschte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch die verringerte CD3-Affinität reduziert wurde. Die Effektivität von CC-3 konnte zudem unter Verwendung drei unterschiedlicher Mausmodelle *in vivo* bestätigt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde CC-3 bei Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen präklinisch charakterisiert. Expressions- und Bindungsanalysen bestätigten die potenzielle Eignung von CC-3 als Therapeutikum für diese

Erkrankungsentitäten. Die anschließende funktionelle Charakterisierung zeigte, dass CC-3 auch in diesen Entitäten trotz seiner verringerten CD3-Affinität eine starke T-Zell-Reaktivität in Hinblick auf Aktivierung, Degranulation sowie Sekretion des Effektormoleküls Perforin auslöste, was in einer ausgeprägten Tumorzelllyse resultierte. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass CC-3 die Proliferation von T-Zellen stimuliert.

Neben der eingeschränkten Wirksamkeit in soliden Tumoren wird die Effizienz bispezifischer Antikörper generell durch verschiedene Mechanismen der Tumor-Immunevasion beeinträchtigt. Es ist bekannt, dass Thrombozyten die Invasion, Metastasierung und Immunevasion eines Tumors fördern. Darüber hinaus wird eine hohe Thrombozytenzahl und die Expression verschiedener Oberflächenmarker mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium sowie einer schlechteren Prognose assoziiert. Der Einfluss von Thrombozyten auf die Wirksamkeit von Immuntherapien insbesondere mit bispezifischen Antikörpern war jedoch weitgehend ungeklärt. Daher wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, ob und inwiefern Thrombozyten einen Einfluss auf die Behandlung mit bispezifischen Antikörpern haben. Im Rahmen einer multizentrischen Phase-I-Studie (NCT04104607) zeigten Prostatakarzinom-Patienten, welche mit unserem bispezifischen PSMAxCD3 Antikörper behandelt wurden, eine behandlungsbedingte Thrombozytenaktivierung und vorübergehende Thrombozytopenie. *In vitro* Analysen zeigten, dass die Antikörper-induzierte T-Zell-Reaktivität durch aktivierte Thrombozyten signifikant reduziert wird. Dieser Effekt war nicht auf den PSMAxCD3 Antikörper beschränkt, sondern auch mit anderen CD3 Antikörperkonstrukten zu beobachten, wie beispielsweise dem bereits zugelassenen CD19xCD3 Antikörper Blinatumomab. Die Reduktion der durch bispezifische Antikörper vermittelten T-Zell-Reaktivität konnte durch eine pharmakologische Thrombozytenhemmung und insbesondere Blockierung der TGF- β -Achse verhindert werden.

Zusammengefasst bilden die in den ersten beiden Teilen beschriebenen präklinischen Untersuchungen mit dem optimierten B7-H3xCD3 Antikörper CC-3 eine vielversprechende Grundlage für dessen weitere klinische Entwicklung. Aktuell wird CC-3 nach Richtlinien der *Good Manufacturing Practice* (GMP) produziert, um die Testung in einer klinischen Studie zu ermöglichen. Die Ergebnisse des dritten Teils zeigen, dass Thrombozyten die therapeutische Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern beeinträchtigen können, und dass eine Modulation der Thrombozytenfunktion den Behandlungserfolg verbessern könnte.

2 Einleitung

2.1 Immunsystem

Der Begriff Immunsystem leitet sich aus dem lateinischen *immunis* („rein“, „frei“, „unberührt“) her.¹ Er umfasst alle Organellen, Zellen und Proteine, die eine Rolle bei der Eliminierung entarteter körpereigener Zellen spielen sowie höheren Organismen Schutz vor Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten bieten. Eine der essentiellsten Voraussetzungen einer funktionierenden Immunabwehr ist die Fähigkeit, körperfremde von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Um den Organismus wirksam zu schützen, muss das Immunsystem vier Hauptaufgaben erfüllen: I. immunologische Erkennung, II. immunologische Effektorfunktionen, III. Immunregulation und IV. immunologisches Gedächtnis. Wie bei anderen Vertebraten lassen sich die verschiedenen Erkennungs- und Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems grob in zelluläre und humorale Komponenten gliedern. Innerhalb dieser kann weiter zwischen angeborener und adaptiver Immunität unterschieden werden. Dem humoralen Immunsystem lassen sich verschiedene lösliche Faktoren wie Zytokine, Lysozym, Komplementfaktoren oder Antikörper zuordnen. Das zelluläre Immunsystem umfasst die Leukozyten, welche wie alle Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Pluripotente Stammzellen differenzieren im Laufe dieses Prozesses entweder zu myeloischen oder lymphatischen Vorläuferzellen aus. Myeloische Vorläuferzellen differenzieren sich weiter zu Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC) oder Mastzellen aus. Lymphatische Vorläuferzellen können weiter in T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen ausdifferenzieren.²⁻⁶

2.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität ist der erste Verteidigungsmechanismus des Organismus, welcher innerhalb weniger Minuten wirken kann, und darüber hinaus die Initiierung und Steuerung der adaptiven Immunantwort maßgeblich beeinflusst.^{4,7}

Die ersten schützenden Barrieren werden durch anatomische und physiologische Strukturen, wie Oberflächenepithelien, gebildet. Die humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems umfassen antimikrobielle Substanzen (Lysozym) oder Proteine des Komplementsystems.^{7,8} Im aktivierten Zustand sind letztere in der Lage, fremde Zellen entweder direkt anzugreifen, oder sie mittels Opsonisierung zur erleichterten Phagozytose zu markieren.⁹ Zytokine werden ebenfalls der humoralen angeborenen Immunität zugeordnet und dienen hauptsächlich der Rekrutierung und

Aktivierung zellulärer Immunkomponenten.¹⁰ Zu den zellulären Komponenten zählen Phagozyten (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, DC) und NK-Zellen.^{8, 10} Die Aktivität von NK-Zellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gesteuert, welche Liganden auf Zielzellen erkennen. Im aktivierten Zustand vermitteln NK-Zellen zwei bedeutende Effektorfunktionen: I. die Lyse von Zielzellen und II. die Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ).¹⁷ Die Zytotoxizität wird durch die Freisetzung von membranschädigendem Perforin und proteolytischen Granzymen aus zytotoxischen Granula ermöglicht.¹⁸ Die Apoptose von Zielzellen kann jedoch auch über von NK-Zellen exprimierte Todesliganden der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie, wie zum Beispiel *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und FAS-Ligand (FasL) erfolgen, welche mit den entsprechenden Todesrezeptoren auf Tumorzellen interagieren.¹⁹⁻²¹

Phagozyten werden wesentlich über invariante, keimbahncodierte Mustererkennungsrezeptoren (PPR, *pattern recognition receptors*) wie die *toll-like receptors* (TLR) aktiviert.²²⁻²⁵ Erkennen die PPR konservierte Struktur motive auf pathogenen Mikroorganismen (pathogen-assoziierte molekulare Muster, PAMP) wird es den Phagozyten möglich, diese Mikroorganismen aufzunehmen, sie enzymatisch zu verdauen, sowie eine Entzündungsreaktion durch Freisetzung immunmodulatorischer Zytokine auszulösen, unter anderem, um weitere Immunzellen anzulocken.^{23, 26} DC nehmen hierbei als Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) eine besondere Stellung im Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität ein. Nach der Phagozytose prozessieren sie Antigene, welche daraufhin zusammen mit kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentiert werden, und Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren.^{4, 27}

2.1.2 Adaptive Immunität

Die adaptive Immunabwehr findet verzögert zur angeborenen Immunabwehr statt. Allerdings ist sie, aufgrund ihres praktisch unbegrenzten Repertoires an verschiedenen Antigenrezeptoren, deutlich spezifischer. Durch die somatische Rekombination keimbahnkodierter Gensegmente wird eine Vielzahl an B-Zell-Rezeptoren (BCR), T-Zell-Rezeptoren (TCR) und löslichen Immunglobulinen bereits vor dem Kontakt mit einem infektiösen Erreger gebildet. Eine weitere Besonderheit der adaptiven Immunabwehr ist die Fähigkeit, eine andauernde Immunität des Organismus gegenüber wiederholten Infektionen mit einem gleichen Pathogen auszubilden. Diese Form der Immunität wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet und ermöglicht eine schnellere Aktivierung antigenspezifischer Immunzellen.

Die Komponenten der adaptiven Immunantwort werden ebenfalls in zellulär und humoral untergegliedert. Die zelluläre adaptive Immunantwort umfasst T-Zellen und B-Zellen. B-Zellen besitzen die Fähigkeit, freie Antigene über ihren BCR aufzunehmen, und diese in prozessierter Form über MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Helferzellen zu präsentieren, welche die B-Zellen stimulieren. Im aktivierten Zustand differenzieren B-Zellen entweder zu Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen aus. Plasmazellen produzieren dann antigenspezifische Antikörper für die humorale Immunabwehr.

2.1.3 T-Zellen

T-Zellen spielen eine tragende Rolle in der adaptiven Abwehr. Sie entwickeln sich im Thymus und migrieren über das Blut in sekundäre lymphatische Organe. Reife T-Zellen, welche noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigenepitop hatten, werden als naive T-Zellen bezeichnet.⁷ Bei der adaptiven Immunantwort erkennen naive T-Zellen mit ihren TCR Antigene, welche in Form von Peptiden auf MHC-Molekülen gebunden sind und differenzieren anschließend zu T-Effektorzellen. Der TCR besteht aus der TCR α - und der TCR β -Kette. Jede Kette des α : β -Heterodimers besteht aus einer variablen Region, einer konstanten Domäne und einem kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich und ist über eine Disulfidbrücke mit der anderen Kette verbunden.²⁸ Zusammen mit dem Adapterprotein CD3 und zwei ζ -Polypeptidketten wird der TCR-Komplex gebildet, welcher nach Aktivierung eine nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade auslöst.^{29, 30} Dieser Mechanismus wird unter anderem durch die Auxiliärproteine CD4 und CD8 unterstützt.³¹ Entsprechend der Expression dieser Co-Rezeptoren und ihrer damit verbundenen Funktion werden T-Effektorzellen in zwei Klassen eingeteilt: CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Peptide und können in entarteten oder virusinfizierten Zellen durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen, oder durch die Expression des Fas-Liganden, Apoptose induzieren. CD4⁺ T-Helferzellen erkennen auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierte Peptide und können anschließend in verschiedene Subpopulationen differenzieren, welche unterschiedliche immunologische Funktionen ausüben. Die wichtigsten Untergruppen sind T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} und T_{FH}, die ihre Zielzellen aktivieren, sowie regulatorische T-Zellen, welche T-Zell-Effektorantworten hemmen, und für eine Gegenregulation sorgen.^{7, 32, 33} Der erste Kontakt von naiven T-Zellen mit ihrem Antigen, die darauffolgende Aktivierung und klonale Expansion wird als *Priming* bezeichnet. Die Interaktion zwischen TCR und Peptid:MHC-Komplexen stellt hierbei das primäre Signal dar, welches jedoch nur zu einer kurzzeitigen Aktivierung der T-Zelle führt. Für eine vollständige Aktivierung ist die Erkennung kostimulierender Moleküle als zweites Signal notwendig. Fehlt dieses zweite Signal, fallen T-Zellen in einen

inaktiven Zustand, welcher als Anergie bezeichnet wird.^{34, 35} Eine wichtige Rolle spielen hierbei beispielsweise die auf APC exprimierten Liganden CD80 und CD86, welche durch den konstitutiv auf T-Zellen exprimierten Rezeptor der B7-Familie CD28 gebunden werden.^{36, 37} Vertreter der TNF-Familie, wie beispielsweise OX-40 spielen ebenfalls eine wichtige kostimulatorische Rolle.^{38, 39} Im Gegensatz zu CD28 werden sie allerdings erst nach einem bereits erfolgten primären Signal auf aktivierten T-Zellen hochreguliert. Zytokine wie das zu Beginn einer Infektion von Makrophagen ausgeschüttete TNF, bilden das dritte wichtige Signal. TNF fördert die Migration und Aktivierung von Lymphozyten und das daraufhin gebildete IL-12 induziert die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen sowie Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, welche daraufhin das autokrin wirkende IL-2 bilden.^{40, 41} Die Sekretion von IL-2 führt zur verstärkten Proliferation sowie zur Bildung von IFN- γ und TNF.^{42, 43} Wird eine naive T-Zelle mittels aller drei Signale aktiviert, führt dies zur klonalen Expansion sowie einer Differenzierung zu Effektorzellen. Während einer Immunantwort bilden sich auch zentrale Gedächtniszellen (*central memory cells*), welche sich eher in lymphatischen Organen aufhalten und bei erneutem Kontakt mit ihrem Antigen als Effektor-Gedächtniszellen (*effector memory cells*) wieder in das periphere Gewebe wandern und dort zytotoxisch wirken können.^{35, 44} In den vergangenen Jahren wurden viele weitere T-Zell-Regulatoren (Checkpoint-Moleküle) entdeckt. Besondere Aufmerksamkeit erlangte hierbei das von aktivierten T-Zellen exprimierte PD1 (*programmed cell death protein 1*), welches an der Hemmung der T-Zellantwort beteiligt ist, und eine überschießende Immunantwort verhindert.⁴⁵

2.2 Tumorimmunologie

Paul Ehrlich postulierte bereits 1909 die Erkennung und Eliminierung maligner Zellen durch die „Schutzvorrichtungen des Organismus“.⁴⁶ Allerdings war damals wenig über die Komponenten und Funktion des Immunsystems bekannt, sodass die Gültigkeit dieser These schwer zu beurteilen war.⁴⁷ Etwa 50 Jahre später führten Thomas und Burnet auf Grundlage neuer Erkenntnisse, wie dem Nachweis der Existenz von Tumorantigenen, das Konzept der Immunüberwachung ein. Dieses Konzept besagt, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen zu identifizieren und daraufhin zu eliminieren.⁴⁸⁻⁵⁴

Obwohl das Immunsystem in der Lage ist, einzelne Tumorzellen zu eliminieren, zeigt die Entwicklung klinisch manifestierter Tumore, dass Tumorzellen in der Lage sind, sich dieser Überwachung zu entziehen. Die Theorie der Immunüberwachung von Tumoren wurde durch das Konzept des *Immunoediting* in den letzten Jahren weiter ausgebaut.⁵⁵⁻⁵⁷ Dieses Konzept beschreibt den dynamischen Prozess, in welchem das Immunsystem das Wachstum eines Tumors durch chronische Entzündungen, Immunselektion schlecht

immunogener Varianten und Unterdrückung einer Immunantwort fördern kann, und somit das Fortschreiten der Krankheit ermöglicht.⁴⁷ Dieser komplexe Vorgang lässt sich in drei Phasen gliedern: I. Eliminierung, II. Equilibrium und III. Evasion. Die Eliminierungsphase stellt eine Aktualisierung des Immunüberwachungskonzepts dar, bei welcher das angeborene und das adaptive Immunsystem zusammenarbeiten, um die Entwicklung eines Tumors zu erkennen und ihn zu eliminieren, bevor er klinisch sichtbar wird. Ist es Tumorzellvarianten möglich, die Eliminierungsphase zu überleben, treten sie in die Equilibriumsphase ein. Während dieser Phase verhindert das adaptive Immunsystem die Anreicherung weiterer Tumorzellen und hält die verbleibenden in einem funktionellen Ruhezustand, wodurch das Wachstum okkulten Tumore verhindert wird. Es wird davon ausgegangen, dass die Equilibriumsphase die längste Phase des *Immunoediting* darstellt, und sich als zweiter stabiler Endpunkt über die Lebenszeit des Patienten erstrecken kann. In der anschließenden Evasionsphase treten Tumorzellvarianten, die die Fähigkeit erlangt haben, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen, als klinisch nachweisbare Tumore auf. Grund für den Übergang in diese Phase ist, neben anderen Faktoren, die Selektion reduziert immunogener Varianten während der Equilibriumsphase. Veränderungen der Tumorzellen können, zum Beispiel durch den Verlust von Tumorantigenen, zu einer verminderten Erkennung durch das Immunsystem führen.^{8, 57, 58} Zusätzlich kommt es auf Tumorzellen häufig zu einer erhöhten Expression immunregulatorischer Proteine. Besonders hervorzuheben ist hierbei PDL1, Ligand des T-Zell inhibierenden Rezeptors PD1.⁵⁹ Auch erhöhte Resistenz gegenüber zytotoxischen Effektorfunktionen, wie beispielsweise durch Induktion antiapoptotischer Mechanismen, kann das Wachstum von Tumoren fördern. Ein weiterer Evasionsmechanismus ist die Generierung eines immunsuppressiven Zustands der Tumormikroumgebung, unter anderem durch Produktion immunsuppressiver Zytokine wie dem *Transforming growth factor β* (TGF-β), IL-10 und der Rekrutierung von regulatorischen Immunzellen.⁶⁰⁻⁶²

Neben anderen Immunzellpopulationen wird insbesondere T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Eliminierung von Tumorzellen, sowie der Aufrechterhaltung der Equilibriumsphase zugeschrieben.^{57, 63, 64} Viele therapeutische Strategien zielen mittlerweile darauf ab, die Limitationen der natürlichen Immunantwort zu überwinden und eine ausreichende Antitumor-Reaktion des Immunsystems auszulösen. Diese Therapiekonzepte werden unter dem Begriff Krebsimmuntherapie zusammengefasst.

2.3 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Das National Cancer Institute definiert eine Immuntherapie als systemische Therapie, welche das Immunsystem stimuliert oder inhibiert, um Tumorerkrankungen oder

Infektionen entgegen zu wirken. Immuntherapien haben die Behandlung von Tumorerkrankungen in den letzten Jahren revolutioniert. Im Gegensatz zu Chemo- und Strahlentherapien, die auch gesundes Gewebe angreifen, sollen bei einer Immuntherapie Tumorzellen gezielter bekämpft werden.^{6, 8} Man unterscheidet hierbei drei verschiedene immuntherapeutische Ansätze: passive Immuntherapien, welche per se eine intrinsische antineoplastische Aktivität besitzen; aktive Immuntherapien, die ihre volle Wirkung über die Aktivierung des Wirtsimmunsystems entfalten; und adoptive Zelltransfers.

Bei einer aktiven Vakzinierung wird eine adaptive Immunantwort durch die Applikation von Tumorantigenen induziert. In den Anfängen wurden hierfür Zelllysate autologer oder allogener Tumorzellen injiziert, während heutzutage eine Vielzahl an Plattformen für die Antigengabe, wie beispielsweise synthetische Peptide, Viren, DC oder DNA/RNA, eingesetzt werden.⁸ Das erste durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene therapeutische Tumorzellvakzin ist Sipuleucel-T (Provenge®, wurde inzwischen vom Markt genommen), welches für die Behandlung eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms eingesetzt wird. Es handelt sich hierbei um eine zelluläre Immuntherapie, bei welcher patienteneigene PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) mit einem rekombinanten Protein, bestehend aus dem prostataspezifischen Antigen PAP (prostataspezifische saure Phosphatase) und dem Adjuvans GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), für 48 h inkubiert und anschließend dem Patienten wieder infundiert werden.⁶⁵

Beim adoptiven Zelltransfer werden dem Patienten gegen den Tumor gerichtete Immunzellen verabreicht. Neben autologen tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und T-Zellen mit verändertem T-Zell-Rezeptor haben insbesondere CAR- (*chimeric antigen receptor*) T-Zellen große Aufmerksamkeit erregt.⁶⁶ Bei dieser Methode wird für einen membranständigen Rezeptor kodierende DNA mittels Transfektion in autologe T-Zellen des Patienten eingebracht. Der membranständige Rezeptor setzt sich aus der Tumorantigen-spezifischen Domäne eines Antikörpers sowie T-Zell stimulierenden und häufig auch kostimulierenden Signaldomänen zusammen.^{67, 68} In den Patienten reinfundiert, erkennen CAR-T-Zellen Tumorantigene MHC-unabhängig und können daraufhin mit Proliferation, zytotoxischer Aktivität und Zytokinsekretion reagieren. Im August 2018 wurden die ersten beiden CAR-T-Zell-Therapeutika in Europa für die Behandlung hämatologischer Erkrankungen zugelassen, und zeigen bei den Patienten eine signifikante therapeutische Wirkung.^{69, 70}

Ein weiterer therapeutischer Ansatz, welcher sich in den letzten Jahren sehr erfolgreich in der Tumorimmuntherapie etabliert hat, ist der Einsatz von Antikörpern. Bereits 1997

wurde Rituximab als erster therapeutischer Antikörper zur Behandlung von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen.⁷¹

2.4 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind eine wichtige Komponente der humoralen Immunabwehr. Auf der Oberfläche von B-Zellen in membrangebundener Form exprimiert, stellen sie einen Teil des B-Zell-Rezeptors (BCR) dar. Des Weiteren werden Antikörper von Plasmazellen als lösliche Proteine produziert und sezerniert. Durch die Bindung von Antigenen können sie Krankheitserreger, wie Viren und Bakterien, neutralisieren und zelluläre Komponenten des Immunsystems dabei unterstützen, diese anzugreifen. Antikörper können gegen eine Vielzahl von chemischen Strukturen, wie beispielsweise (Glyko-)Proteine und Polysaccharide, gebildet werden.⁷ Wie bereits 1900 von Paul Ehrlich postuliert, beruht die Bindung zwischen Antikörper und Antigen auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.⁷² Hierbei wird eine bestimmte Region des Antigens (Epitop) durch die Antigenbindestellen des Antikörpers (Paratop) erkannt.^{8, 72} Auf die Strukturen von Antikörpern wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

2.4.1 Struktur von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine, die aus vier kovalent verbundenen Polypeptidketten zusammengesetzt sind, die entsprechend ihres Molekulargewichts als leichte (25 kDa) oder schwere (50 kDa) Ketten bezeichnet werden. Die schweren Ketten sind kovalent über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die leichten Ketten sind über jeweils eine Disulfidbrücke an eine schwere Kette geknüpft, wodurch die antikörpertypische Y-Form entsteht (Abbildung 1).⁷³ Die C_H1- und C_H2-Domäne sind bei IgG Antikörpern mittels einer flexiblen Gelenkregion verbunden. Diese bewegliche Struktur kann, durch proteolytische Spaltung mit Hilfe des Enzyms Papain, in zwei identische, antigenbindende Fragmente (Fab, *fragment antigen binding*) sowie das Fc-Fragment (Fc, *fragment crystallizable*) gespalten werden.^{74, 75}

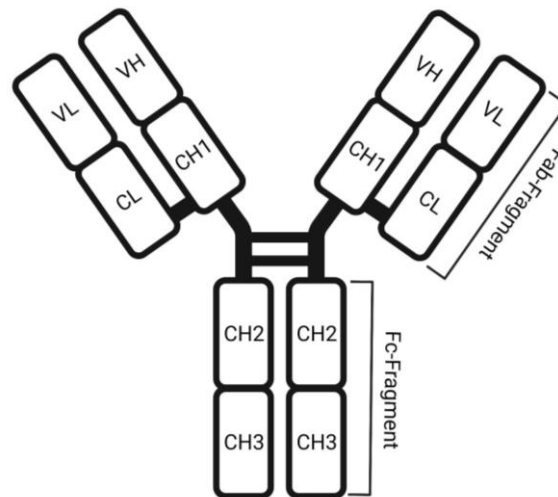


Abbildung 1. Aufbau eines humanen IgG1 Antikörpers. V_H: variables Fragment der schweren Kette, V_L: variables Fragment der leichten Kette, C_H: konstantes Fragment der schweren Kette, C_L: konstantes Fragment der leichten Kette, Fab: *fragment antigen binding*, Fc: *fragment crystallizable*. Erstellt mit BioRender.com.

Die leichte Kette kann in eine konstante (C_L) und eine N-terminale variable (V_L) Domäne unterteilt werden. Die schwere Kette eines IgG1 Antikörpers setzt sich aus drei relativ konservierten (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) Domänen sowie, analog zur leichten Kette, einer N-terminalen variablen (V_H) Domäne zusammen. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette enthalten drei hypervariable Regionen (CDR1-3, *complementarity determining region*). Die CDRs sind von Gerüstregionen (*framework*-Regionen) umgeben, welche die räumliche Konformation der variablen Domäne festlegt. Die zusammengelagerten Domänen V_H und V_L, beziehungsweise die Kombination der entsprechenden CDRs, bilden zusammen das Paratop.^{7, 8, 76} Die Sequenzvielfalt der CDRs und die damit einhergehende enorme Anzahl möglicher Antigen-spezifitäten entsteht durch die somatische Rekombination. Hierbei werden bestimmte Gensegmente (V_H: V,D,J; V_L: V,J), welche zudem in mehreren Kopien vorliegen, zufällig zusammengefügt und somit eine enorme Anzahl unterschiedlicher Kombinationen generiert.⁷⁷⁻⁷⁹ Durch das Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden an den Verbindungsstellen neu angeordneter Gensegmente entsteht zudem eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungsstellen.⁸⁰ Die Kombination verschiedener V_H- und V_L-Domänen erhöht die Vielfalt zusätzlich, wodurch das Immunsystem in der Lage ist ca. 10¹¹ verschiedene Antigene zu erkennen. Das Spezifitätenrepertoire wird während der Affinitätsreifung durch das Auftreten von Punktmutationen innerhalb der rekombinierten VDJ-Gene weiter vergrößert. Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet.^{8, 76, 81}

Während leichte Ketten lediglich in zwei Subklassen (λ und κ) eingeteilt werden und keinen Einfluss auf die Funktion eines Antikörpers haben, bestimmt die Art der schweren Kette den Isotyp und damit die Funktion eines Antikörpers. Man unterscheidet die Klassen γ , δ , α , μ oder ϵ , welche die Zugehörigkeit eines Antikörpers zu einer der fünf Isotypklassen IgG, IgD, IgA, IgM oder IgE definieren. Diese Isotypen grenzen sich untereinander nicht nur hinsichtlich ihrer Struktur ab, sondern auch in ihrer Verteilung im Körper sowie ihrer funktionellen Eigenschaften. IgG- und IgM-Moleküle befinden sich hauptsächlich im Blut, wobei IgG-Moleküle im Gegensatz zu den großen, pentameren IgM-Molekülen auch aus dem Blutgefäßsystem hinaus und in extravaskuläres Gewebe hinein diffundieren können. Aufgrund dieser Eigenschaft, ihrer vergleichsweise langen Serumhalbwertszeit und ihrem breiten Spektrum an Effektormechanismen wird für therapeutische Antikörper bevorzugt der IgG-Isotyp verwendet.^{8, 76, 82}

2.4.2 Effektormechanismen von IgG Antikörpern

Antikörper haben natürlicherweise die Funktion, den Organismus vor Pathogenen zu schützen. Hierbei können sie sowohl direkte, als auch indirekte Effektorfunktionen ausführen.⁸³

Direkte Wirkmechanismen werden in erster Linie durch die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen vermittelt und sind somit Fc-Teil- sowie Isotyp-unabhängig. Binden antagonistische Antikörper an ihr Antigen, können Rezeptor-Ligand-Interaktionen blockiert werden, wohingegen die Bindung agonistischer Antikörper eine Signaltransduktion stimulieren kann.^{8, 76}

Indirekte Wirkmechanismen werden durch den Fc-Teil vermittelt. Bindet ein Antikörper sein auf der Zielzelle liegendes Antigen, können über den Fc-Teil Effektormoleküle oder Effektorzellen zur entsprechenden Zielzelle rekrutiert werden. Die Komplement-vermittelte Zytotoxizität ist ein zellunabhängiger Prozess und wird induziert, indem sich der Komplementfaktor C1q an den Fc-Teil mindestens zweier, auf der Zielzelloberfläche immobilisiert vorliegender IgG-Moleküle lagert. Dies führt zur Bildung eines Membran-Angriff-Komplexes (MAC, *membrane-attack complex*), was die Lyse der entsprechenden Zielzelle auslöst.^{8, 76, 83}

Ein weiterer Fc-Teil vermittelter Mechanismus ist die Aktivierung und Rekrutierung immunologischer Effektorzellen. Dies wird durch die Interaktion des Fc-Teils mit den auf Effektorzellen exprimierten IgG-spezifischen Fc-Rezeptoren (Fc γ R) ausgelöst. Die Fc γ R Familie wird in drei Hauptklassen (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) eingeteilt, die weitere Subtypen umfassen. Bei Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc und Fc γ RIIIa handelt es sich um aktivierende Rezeptoren, während Fc γ RIIb inhibitorisch wirkt. Fc γ R werden mit Ausnahme von $\alpha\beta$ -T-

Zellen von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die meisten Zellen exprimieren sowohl aktivierende als auch inhibierende Fc γ -Rezeptoren. Die einzigen Ausnahmen bilden B-Zellen, welche nur den inhibierenden Fc γ RIIb tragen, und NK-Zellen, welche den aktivierenden Fc γ RIIIa (und bei 30% der Bevölkerung auch den Fc γ RIIc) exprimieren.^{8, 76, 84, 85} Unter anderem aufgrund der Eigenschaft, nur den aktivierenden Fc γ R zu exprimieren, gelten NK-Zellen als die wichtigsten Effektorzellen der Antikörper-vermittelten Lyse (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) im Menschen. Durch die Bindung immobilisierter IgG-Moleküle kommt es zur Kreuzvernetzung des Fc γ RIIIa, wodurch die NK-Zelle zytotoxische Effektormoleküle, wie Perforin und Granzym B, ausschüttet, was zur Zielzellyse führt.^{8, 86} Neben NK-Zellen können auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, Natürliche Killer-T-Zellen (NKT), Monozyten und Makrophagen ADCC vermitteln.⁸⁷ Des Weiteren können Makrophagen, Monozyten und Granulozyten (insbesondere Neutrophile) durch Antikörper opsonisierte Zielzellen über ihren Fc γ RIIa erkennen und phagozytieren. Dieser Mechanismus wird als Antikörper-vermittelte zelluläre Phagozytose bezeichnet.^{88, 89}

2.4.3 Antikörperbasierte Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Bereits Paul Ehrlich postulierte Antikörper als perfekte *magic bullets* (zu Deutsch: Zauberkugeln) für die zielgerichtete Behandlung von Krankheiten. Der Grundstein für die Herstellung und Verwendung therapeutischer Antikörper wurde 1975 durch die von Köhler und Milstein eingeführte Hybridomtechnologie, und der damit einhergehenden Möglichkeit, monoklonale Antikörper mit definierter Spezifität herzustellen, gelegt.^{35, 90} Der erste auf diesem Weg hergestellte und zugelassene Antikörper war ein muriner CD3 Antikörper (Muromonab-CD3) zur Prävention von Transplantatabstoßungen.⁹¹ Es folgte eine ganze Generation klinisch eingesetzter muriner monoklonaler Antikörper, allerdings war ihre Wirksamkeit, aufgrund ihrer schwachen Kreuzreaktivität mit menschlichen Fc-Rezeptoren, nur gering.^{8, 92} Des Weiteren reagierte das humane Immunsystem mit der Bildung spezifischer Antimaus-Antikörper (HAMA, *Human-Anti-Mouse Antibodies*), wodurch die Wirksamkeit der murinen monoklonalen Antikörper verringert wurde.⁸

Die Etablierung neuer Technologien, wie beispielsweise die rekombinante DNA-Technologie, ermöglichten es zunehmend, murine Antikörperteile durch humane zu ersetzen. Zunächst wurden chimäre Antikörper mit humanem Fc-Fragment produziert.⁹³ Ein sehr bekanntes Beispiel für einen chimären Antikörper ist der CD20 Antikörper Rituximab, welcher große Erfolge bei der Behandlung maligner B-Zelllymphome erzielt.⁹⁴ Weitere molekularbiologische Entwicklungen ermöglichten es, die CDRs muriner Antikörper in ein humanes Antikörpergerüst einzubetten, und so humanisierte Antikörper

zu generieren.⁹⁵ Diese Antikörper sind im Vergleich zu chimären Antikörpern weniger immunogen, jedoch besteht die Gefahr einer Verringerung der Antigenaffinität durch Beeinträchtigung der Antigenbindestelle.⁸ Neuere Technologien ermöglichen mittlerweile die Generierung vollständig humaner Antikörper. Hierzu gehören die Immunisierung transgener Mäuse, bei denen die Genloci, welche für die schwere und leichte Kette kodieren, gegen humane Homologe ausgetauscht wurden, sowie die Phagen-Display Technologie.^{96, 97}

Der Großteil immuntherapeutischer Antitumor-Antikörper lässt sich in zwei Hauptklassen einteilen: I. Konstrukte, die gegen Moleküle auf Immunzellen gerichtet sind, um eine durch den Tumor induzierte Immunsuppression zu überwinden, sowie II. Konstrukte, die gegen tumorassoziierte Antigene (TAA) gerichtet sind, um Tumorzellen gezielt durch Immunzellen zerstören zu lassen.^{8, 98, 99}

Bekanntere Beispiele der ersten genannten Klasse sind gegen PD1/PD-L1 oder CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) gerichtete Checkpoint-Inhibitoren, wie Ipilimumab oder Pembrolizumab. Checkpoint-Inhibitoren verbesserten die Behandlungsmöglichkeit vieler Tumorerkrankungen, wie dem metastasierten Melanom und Lungenkarzinom, erheblich. Ein limitierender Faktor ist jedoch, dass oft nur spezifische und/oder kleine Patientengruppen davon profitieren.¹⁰⁰ Des Weiteren fallen auch Antikörper, die gegen stimulierende Checkpoint-Moleküle, wie 4-1BB oder OX40, gerichtet sind, in diese Klasse.^{101, 102}

Eine Untergruppe der zweiten aufgeführten Klasse sind klassische monospezifische Antitumor-Antikörper, wie der bereits erwähnte Antikörper Rituximab. Weitere bekannte Beispiele dieser Klasse sind der gegen Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2 (HER2) gerichtete Antikörper Trastuzumab, der für die Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs eingesetzt wird, sowie der gegen *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtete Antikörper Cetuximab, welcher für die Behandlung von metastasierten Darmtumoren und Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt wird. Da das Fc-Fragment wesentlich zur Effektorfunktion dieser Antikörperklasse beiträgt, zielen verschiedene Ansätze darauf ab, die Wechselwirkung mit Fc-Rezeptoren zu optimieren. Ein häufig gewählter Ansatz ist der gezielte Austausch von Aminosäuren, um eine erhöhte Affinität des Fc-Fragments zu aktivierenden Fc γ -Rezeptoren zu erreichen. Der Firma Xencor gelang es durch zwei Aminosäuresubstitutionen (S239D/I332E) die ADCC bzw. ADCP um das 100-fache zu steigern.¹⁰³ Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung der Affinität ist die Glykosylierungsoptimierung. Ein Beispiel hierfür ist der glykooptimierte CD20 Antikörper Obinutuzumab, welcher, verglichen mit Rituximab, verbesserte Ergebnisse bei der Behandlung von CLL-Patienten erzielen konnte.¹⁰⁴ Darüber zielen weitere Ansätze, wie

beispielsweise Immunkonjugate, darauf ab, die Wirksamkeit von Antikörpern zu erhöhen. Immunkonjugate sind Antikörper, welche mit immunstimulierenden Zytokinen, Radionukleotiden oder zytotoxischen Wirkstoffen ausgestattet werden. Antikörper, an welche zytotoxische Wirkstoffe gekoppelt sind, werden auch als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC, *Antibody-drug-conjugate*) bezeichnet. Ein Beispiel für diese Untergruppe ist das CD22 bindende ADC Inotuzumab Ozogamicin, welches zur Behandlung der akut lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-ALL) zugelassen ist.^{8, 105} Limitierend für die Effektivität von immuntherapeutisch wirksamen Antitumor-Antikörpern ist häufig die Anzahl von Effektorzellen sowie die mangelhafte Interaktion dieser Zellen mit den Antikörpern.^{106, 107} Ein potenziell effektiverer Ansatz welcher auch die Mobilisierung von T-Zellen als potentesten Komponenten des Immunsystems ermöglicht, ist die Generierung bispezifischer Antikörper.

2.4.4 Bispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper sind in der Lage, gleichzeitig an ein TAA und ein immunstimulatorisches Antigen zu binden, und somit Effektorzellen direkt am Tumor zu aktivieren. Ein großer Vorteil hierbei ist, dass bispezifische Antikörper für die Aktivierung fast jeder Effektorzellpopulation genutzt werden können. NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen können durch die Bindung an CD16 und neutrophile Granulozyten über die Bindung an CD64 rekrutiert und aktiviert werden.⁸³ Besonders hervorzuheben ist, dass T-Zellen, welche aufgrund fehlender Fc-Rezeptoren nicht von den bereits beschriebenen monospezifischen Antitumor-Antikörper aktiviert werden können, von bispezifischen Antikörpern, über die Bindung an CD3, rekrutiert und aktiviert werden können.^{108, 109} T-Zellen stellen, aufgrund ihrer Fähigkeit zur starken Proliferation sowie ihrem hohen zytotoxischen Potenzial, die potenteste Klasse immunologischer Effektorzellen dar. Die simultane Bindung bispezifischer Antikörper an ihr TAA und den CD3-Rezeptor führt zu einer Quervernetzung des Rezeptors und damit zur Aktivierung der T-Zelle. Die Bindung von CD3 ermöglicht demnach eine MHC-unabhängige Auslösung von T-Zell-Effektormechanismen.¹¹⁰ Der erste zugelassene T-Zell stimulierende bispezifische Antikörper war der EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) und CD3 bindende Antikörper Catumaxomab, welcher 2009 für die Behandlung von malignem Aszites zugelassen wurde.¹¹¹ Da Catumaxomab ein intaktes Fc-Fragment besitzt, aktiviert er zusätzlich über die Bindung an FcγRI und FcγRIIIa dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. Der bispezifische Antitumor-Antikörper Blinatumomab, welcher CD3 und CD19 bindet, wurde 2014 für die Behandlung von ALL zugelassen.¹¹² Blinatumomab ist ein sogenannter *bispecific T-cell engager* (BiTE) und besteht aus zwei *single chain*

fragment variable (scFv)-Fragmenten. Hierbei handelt es sich um eine kleinste antigenbindende Einheit, bei welcher die V_H - und V_L -Domänen über einen Peptidlinker verbunden sind.¹¹³ Im Jahr 2022 wurde ein zweites bispezifisches Molekül namens Tebentafusp zur Behandlung von Aderhautmelanomen zugelassen. Tebentafusp ist ein sogenanntes *Immune mobilizing monoclonal T-cell receptors against cancer* (ImmTAC)-Molekül, welches aus einem löslichen, HLA-A*02:01 spezifischen TCR und einer anti-CD3-scFv-Effektordomäne besteht.¹¹⁴

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Antikörperformate generiert, die sich in Größe, Pharmakokinetik, Halbwertszeit, Tumorpenetration sowie der Anzahl der Antigenbindestellen unterscheiden (Abbildung 2).⁸³ Die Wahl des Formats hat eine wichtige Bedeutung für den Therapieerfolg eines therapeutischen Antikörpers. So zeichnen sich BiTE-Formate aufgrund ihrer geringen Größe (circa 60 kDa) durch eine gute Gewebepenetration und einen verbesserten Zugang zum Antigen aus. Jedoch hat dieses Format aufgrund des fehlenden Fc-Fragments eine deutlich verringerte Serumhalbwertszeit, weswegen hier häufig Dauerinfusionen notwendig sind.¹¹⁵ Neben der Wahl des richtigen Antikörperformats ist die Auswahl des Tumorantigens von enormer Bedeutung für den therapeutischen Erfolg.

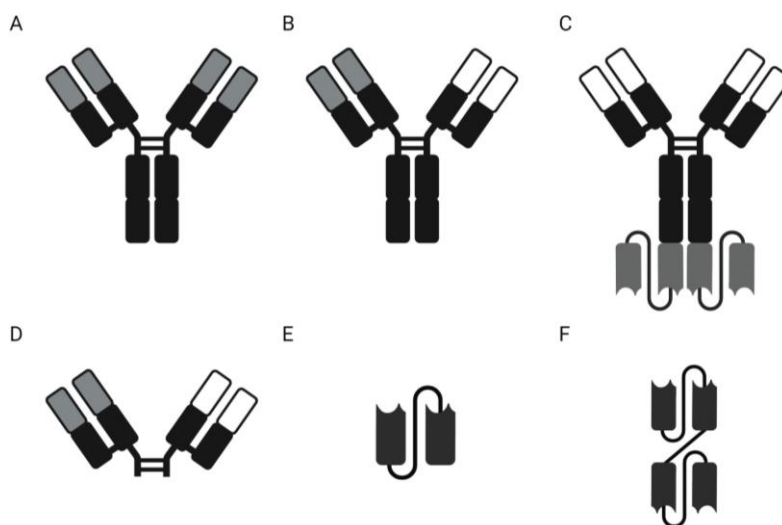


Abbildung 2. Aufbau verschiedener bispezifischer Antikörperformate.

A: Monospezifischer IgG Antikörper. B: Bispezifischer IgG Antikörper (Quadroma). C: bispezifischer IgGsc-Antikörper. D: chemisch konjugiertes und bispezifisches $F(ab')_2$ -Fragment. E: scFv . F: BiTE. Erstellt mit BioRender.com.

2.5 B7-H3 als tumorassoziertes Antigen

B7-H3 (B7 Homolog 3), auch bekannt als CD276, ist ein Mitglied der B7-Molekülfamilie. Es kann entweder als Transmembranprotein oder als lösliche Isoform vorliegen. In seiner membrangebundenen Form ist B7-H3 ein Typ-I-Transmembranprotein, welches aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne besteht. Im Menschen besteht die extrazelluläre Domäne, aufgrund einer Exonduplikation, aus zwei identischen Paaren, welche jeweils eine variable Immunglobulindomäne und eine konstante Domäne umfassen.^{116, 117} Während B7-H3-mRNA in den meisten gesunden Geweben exprimiert ist, wird das B7-H3-Protein, aufgrund posttranskriptionaler Regulation durch miRNAs, nur in sehr begrenztem Umfang exprimiert.^{118, 119} Der Rezeptor von B7-H3 ist unbekannt und die immunregulatorische Rolle von B7-H3 wird noch diskutiert. Ursprünglich wurde B7-H3 als notwendig für die Kostimulation von T-Zellen angesehen.¹²⁰⁻¹²² Dennoch gibt es Anzeichen, dass B7-H3 eine inhibierende Rolle in der adaptiven Immunabwehr spielt. So konnte gezeigt werden, dass B7-H3 sowohl die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch die Zytokinfreisetzung verringert.¹²³⁻¹²⁵ Die Rolle von B7-H3 in der Tumorentstehung ist ebenso umstritten.¹²⁶⁻¹²⁹ Jedoch wurde die Expression von B7-H3 auf einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen. Hierzu gehören unter anderem Lungenkarzinome, Ovarialkarzinome und gastrointestinale Tumore, wie kolorektale Karzinome, Leberkarzinome, Pankreaskarzinome sowie Magenkarzinome.¹³⁰⁻¹³⁵ Die Expression von B7-H3 auf Tumorgewebe wird des Weiteren mit einem aggressiven Krankheitsverlauf sowie einer schlechten Krankheitsprognose in Verbindung gebracht.^{132, 133, 136} Darüber hinaus wird B7-H3 nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf dem Gefäßsystem von Tumoren exprimiert.¹³⁷ Somit könnte die Verwendung von B7-H3 als immuntherapeutisches Zielantigen den Zugang von Immunzellen zum Tumor erleichtern, was die Attraktivität dieses Moleküls als Zielantigen für solide Tumorentitäten, wie gastrointestinale Tumore, weiter unterstreicht.

2.6 Gastrointestinale Tumore

Maligne Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts gehören zu den häufigsten Tumorentitäten und machen weltweit 26% aller Tumorerkrankungen sowie 35% aller tumorbedingten Todesfälle aus. Da sich diese Arbeit unter anderem mit einem bispezifischen Antikörper für die Behandlung von kolorektalem Karzinom sowie Leber-, Pankreas- und Magenkarzinom befasst, werden diese Entitäten sowie hierfür zugelassene Therapiemöglichkeiten nachfolgend näher behandelt.

2.6.1 Kolorektales Karzinom

Der Begriff kolorektales Karzinom umfasst Tumore des Dickdarms (Kolon) und des Mastdarms (Rektum). Bei Frauen ist es die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Tumorerkrankung, wobei Männer in absoluten Zahlen häufiger betroffen sind.¹³⁸ Zu den Risikofaktoren gehören, neben genetischen Ursachen, Faktoren wie zunehmendes Alter, Übergewicht, Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung, Rauchen sowie entzündliche Darmerkrankungen.¹³⁹ Das Fortschreiten der Erkrankung wird in die Stadien 0 bis IV nach TNM-Richtlinien entsprechend der Tumorgöße (T), dem Befall von Lymphknoten (N) und dem Vorliegen von Metastasen (M) eingeteilt.¹⁴⁰ Für Patienten mit einem lokalen kolorektalen Karzinom sind die Überlebensraten mit 70-90% sehr hoch. Die Prognose für Patienten mit metastasierender Erkrankung ist jedoch mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ~12,5% immer noch sehr schlecht.^{8, 141, 142} Die Therapie umfasst klassischerweise die Entfernung des malignen Gewebes, Strahlentherapie sowie systemische Behandlung mit Chemotherapeutika, wie Fluoropyrimidine, Oxaliplatin oder Capecitabine. Metastasierende kolorektale Karzinome werden zudem mit Kinaseinhibitoren, wie Regorafenib (Multikinaseinhibitor) und Vemurafenib (BRAF-Inhibitor), und Immuntherapeutika behandelt. Zu Letzteren gehören der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtete Antikörper Bevacizumab, die gegen EGFR gerichteten Antikörper Cetuximab und Panitumumab sowie die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab, Pembrolizumab und Ipilimumab.^{8, 139, 142} Mit Ausnahme von Bevacizumab kommt jedoch nur ein geringer Anteil an Patienten für diese immuntherapeutischen Ansätze in Frage. So sind Checkpoint-Inhibitoren nur für Patienten mit metastasierenden kolorektalen Karzinomen zugelassen, welche eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-H, *High Microsatellite Instability*) oder Defekte der homologen DNS-Reparatur (dMMR, *Mismatch Repair Deficiency*) aufweisen. EGFR Antikörper werden nur bei Patienten ohne RAS (*rat sarcoma*) -Mutationen angewandt.^{8, 143, 144} Aufgrund dessen besteht ein dringender Bedarf an neuen immuntherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten.

2.6.2 Leberkarzinom

Trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren verursacht das Leberkarzinom immer noch sehr hohe Sterbezahlen.¹⁴⁵ In den meisten Fällen leiden Patienten bereits im Voraus an einer chronischen Lebererkrankung (CLD, *Chronic Liver Disease*), die in der Regel bereits das Stadium der Leberzirrhose erreicht hat. Weltweit ist das Hepatitis-B-Virus nach wie vor die häufigste Ursache für eine CLD, gefolgt von alkoholischen Lebererkrankungen sowie nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen.¹⁴⁶ Da die bereits

bestehende CLD den klinischen Zustand von Leberkarzinompatienten stark mitbestimmt, ist die TNM-Skala nicht ausreichend, um eine bestehende Erkrankung in Stadien einzuteilen, und Prognosen zu stellen. Derzeit wird vorwiegend die Barcelona-Klassifikation (BCLC, *Barcelona Clinic Liver Cancer*) genutzt, welche sowohl die Leberfunktion als auch den Allgemeinzustand des Patienten (ECOG-Status, Eastern Cooperative Oncology Group) miteinbezieht.¹⁴⁷ Chirurgische Eingriffe, wie die Resektion, Transplantation und in einigen Fällen die Ablation, sind aktuell die einzigen kurativen Behandlungsmöglichkeiten, jedoch sind diese Ansätze in fortgeschrittenen Stadien nicht möglich.^{146, 148} Die Kinaseinhibitoren Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib und Cabozantinib verzeichnen nur begrenzte Erfolge.¹⁴⁹⁻¹⁵³ Bislang sind der VEGFR2 bindende Antikörper Ramucirumab sowie Bevacizumab, in Kombination mit dem PD-L1 Antikörper Atezolizumab, die einzigen zugelassenen antikörperbasierten Therapien. Allerdings ist die Behandlung mit Ramucirumab auf Patienten mit sehr hohen Konzentrationen des Tumormarkers Alpha-Fetoprotein beschränkt.¹⁵⁴ Die Kombinationstherapie mit Bevacizumab und Atezolizumab zeigt, verglichen mit Sorafenib, eine grössere Wirksamkeit und wird derzeit als bevorzugte Erstlinientherapie bei nicht operablen Leberkarzinomen empfohlen, dennoch sind die Therapieerfolge immer noch sehr limitiert.¹⁵⁰

2.6.3 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine hoch aggressive Entität mit sehr schlechter Gesamtprognose und Mortalitätsraten, die nahezu den Inzidenzraten entsprechen. Man unterscheidet zwischen exokrinen Tumoren, welche 93% aller Pankreaskarzinome ausmachen, und neuroendokrinen Tumoren. Die häufigste Form ist das duktales Adenokarzinom, welches in den Gängen der Bauchspeicheldrüse entsteht.¹⁵⁵ Die genauen Ursachen sind nicht aufgeklärt, aber es scheinen Geschlecht und Alter mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms assoziiert zu sein.^{156, 157} Darüber hinaus erhöhen Faktoren, wie Rauchen, Fettleibigkeit, Diabetes oder berufliche Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Genmutation, die zu einem Pankreaskarzinom führen kann.¹⁵⁸ Die Mehrheit der Patienten wird erst diagnostiziert, wenn ihre Erkrankung bereits lokal fortgeschritten oder metastasiert ist. Dies ist durch das Fehlen spezifischer Frühsymptome sowie dem Mangel an Früherkennungstests begründet. Die Diagnose basiert hauptsächlich auf Bildgebung, was durch die anatomische Lage des Pankreas erschwert ist.¹⁵⁵ Die einzige potenziell kurative Behandlungsoption ist die chirurgische Resektion, wofür allerdings weniger als 20% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose qualifizieren.¹⁵⁹ Bei Patienten mit einer

fortgeschrittenen Erkrankung wird in der Regel eine systemische Chemotherapie (FOLFIRINOX oder eine Kombination aus Gemcitabin mit Nab-Paclitaxel) als Erstlinientherapie eingesetzt, mit Ansprechraten von lediglich 32%.^{155, 160-162} Zielgerichtete Therapien konnten die Behandlungsmöglichkeiten bis jetzt auch nur geringfügig verbessern. Die Kombination aus Gemcitabin mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib erzielte eine leichte Verbesserung der Überlebensdauer in einem nicht vorselektierten Patientenkollektiv.¹⁶³ Checkpoint-Inhibitoren zeigten bis jetzt nur bei Patienten mit Mikrosatelliteninstabilität einen klinischen Nutzen, und der PARP-Inhibitor Olaparib ist nur für Patienten mit BRCA-Mutation zugelassen.^{164, 165} Dies unterstreicht den dringenden Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten.

2.6.4 Magenkarzinom

Magenkarzinome stellen weltweit die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache dar, wobei Männer etwa doppelt so häufig erkranken wie Frauen.^{166, 167} In den meisten Fällen treten Magenkarzinome in den distalen Regionen des Magens auf, lediglich 18% entstehen in der Kardia. Während kardiale Magenkarzinome mit gastroösophagealem Reflux und Adipositas in Verbindung gebracht werden, sind 90% der nicht-kardialen Karzinome auf eine *Helicobacter pylori*-Infektion zurückzuführen. In beiden anatomischen Unterbereichen stellen Rauchen, starker Alkoholkonsum sowie der Verzehr gepökelter Lebensmittel zusätzliche Risikofaktoren dar.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Die Diagnose wird nach einer endoskopischen Biopsie anhand histologischer Befunde gestellt. Das Stadium der Erkrankung wird anschließend mittels CT, endoskopischem Ultraschall, PET sowie Laparoskopie festgestellt und anhand der TNM-Skala klassifiziert.¹⁷¹ In frühen Stadien stellt die kurative Resektion mit oder ohne perioperative Chemotherapie die Standardbehandlung dar. Die Standardtherapie von inoperablen oder metastasierten Magenkarzinomen sind Chemotherapien und Trastuzumab für HER2 positive Tumore. Darüber hinaus sind Ramucirumab und Nivolumab als Zweitlinientherapie für fortgeschrittene Magenkarzinome zugelassen, wobei die Ansprechrate von Nivolumab nur sehr gering ist.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Eine Behandlung mit Pembrolizumab ist lediglich für Patienten mit MSI-H, dMMR oder hoher Tumormutationslast (TMB-H, *high tumor mutational burden*) oder in Kombination mit Trastuzumab für HER2-positive Tumore zugelassen.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

Obwohl immuntherapeutische Strategien, wie Checkpoint-Inhibitoren und bispezifische Antikörper, bemerkenswerte Wirksamkeiten in der Behandlung von Tumorerkrankungen erreichen können, sind langfristige Remissionen, sowohl in den beschriebenen gastrointestinalen Entitäten als auch in den meisten anderen Tumorentitäten, nach wie

vor selten. Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, wurden verschiedene Evasionsmechanismen identifiziert, durch die Tumorzellen einer effektiven Immunantwort entkommen können. Neben den bereits genannten Mechanismen können auch Thrombozyten die Umgehung einer Antitumor-Immunantwort fördern, indem sie die Funktion von Immunzellen beeinträchtigen.

2.7 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose Zellfragmente und stellen einen wichtigen Bestandteil der Hämostase dar. Sie entstehen aus Megakaryozyten, welche wiederum, unter Regulation des Wachstumsfaktors Thrombopoetin, aus der myeloischen Reihe der Hämatopoese hervorgehen.^{178, 179} Reife Megakaryozyten bilden pseudopodienartige zytoplasmatische Ausläufer, sogenannte Proplättchen, woraufhin es in den Sinusoiden des Knochenmarks zur Freisetzung von größeren Zellfragmenten kommt.^{178, 180-182} Durch Scherstress entstehen aus diesen Zellfragmenten schließlich Thrombozyten. Täglich entstehen insgesamt circa 10^{11} Thrombozyten, wobei ein Megakaryozyt 1000-3000 hervorbringt. Nach 7 bis 10 Tagen werden Thrombozyten in der Leber oder Milz abgebaut, wodurch im Blut eines gesunden Erwachsenen gewöhnlich 150.000 bis 400.000 Thrombozyten pro Mikroliter Blut vorhanden sind.^{178, 180, 182, 183} Thrombozyten sind, obwohl sie keinen Zellkern besitzen, bedingt zur Proteinbiosynthese fähig, was darauf zurück zu führen ist, dass während ihrer Entwicklung Ribosome und RNA in ihr Zellinneres gelangen.¹⁸⁴ Neben ihrer Funktion in der Hämostase hat sich zunehmend herausgestellt, dass Thrombozyten auch in weiteren physiologischen Prozessen, wie der Angiogenese, Wundheilung und Immunmodulation, eine regulatorische Funktion einnehmen.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Darüber hinaus haben zahlreiche Studien gezeigt, dass tumorassoziierte Thrombozytosen mit schlechten klinischen Prognosen und einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium assoziiert sind.¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ Thrombozyten vermitteln ihre Funktion über ein breites Spektrum an Oberflächenmolekülen sowie durch in Granula gespeicherte lösliche Faktoren, welche nach Aktivierung ausgeschüttet werden.¹⁷⁸ Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie beispielsweise TLR, Integrine und kostimulatorische Moleküle, über die sie PAMP erkennen und mit Leukozyten interagieren können. Zudem sind Thrombozyten die Hauptquelle für lösliches CD40L im Plasma. In einer Studie mit CD40L defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Wildtyp-Thrombozyten virusspezifische IgG-Titer erhöhen konnte.¹⁹¹⁻¹⁹³ In ihren Granula speichern Thrombozyten neben proinflammatorischen Faktoren, wie beispielsweise *C-X-C motif ligand* (CXCL) oder *CC-chemokine ligand 2* (CCL2), auch immunsupprimierende Faktoren, wie beispielsweise VEGF und TGF- β .¹⁷⁸ TGF- β wirkt insbesondere auf T-Zellen inhibierend,

indem es die T-Zell-Aktivierung durch Hemmung der TCR-Signalübertragung verhindert.¹⁹⁴ Des Weiteren unterdrückt TGF- β Transkriptionsfaktoren, wie T-bet (*T-box expressed in T cells*) und GATA-3, die für die Differenzierung von T-Helfer-1-beziehungsweise T-Helfer-2-Zellen entscheidend sind.^{195, 196} Eine weitere Studie berichtet eine, von Thrombozyten über die GARP-TGF- β -Achse ausgelöste, Hemmung der T-Zell-Immunität.¹⁹⁷

3 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren konnten immuntherapeutische Strategien, insbesondere durch die Mobilisierung von T-Zellen gegen Tumorzellen, bemerkenswerte Erfolge in der Onkologie erzielen. Checkpoint-Inhibitoren sind zu einer tragenden Säule in der Behandlung vieler solider Tumorarten geworden.^{45, 198} CAR-T-Zellen erreichen eine hohe Wirksamkeit bei der Behandlung lymphatischer Tumore.^{199, 200} Auch bispezifische Antikörper, welche den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex auf T-Zellen stimulieren, konnten die Behandlung hämatologischer Erkrankungen deutlich verbessern.¹¹² Langfristige Remissionen sind jedoch nach wie vor selten, und viele Patienten sprechen nicht auf die Behandlung an.^{201, 202} Hinzu kommt, dass sowohl CAR-T-Zellen als auch bispezifische Antikörper bei soliden Tumorerkrankungen bisher nur unzureichend wirksam sind.^{203, 204}

3.1 Entwicklung und Optimierung eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers im IgGsc-Format

Das zur B7-Familie gehörige Protein B7-H3 (CD276) erfährt aufgrund seiner recht spezifischen Expression auf einer Vielzahl von Tumorzellen und Tumorgefäßen, erhebliches Interesse als Zielantigen für immuntherapeutische Ansätze.^{117, 120, 137} Auf der Grundlage früherer Arbeiten, einschließlich der Entwicklung und klinischen Testung bispezifischer Antikörper mit FLT3xCD3-²⁰⁵ und PSMAxCD3-^{206, 207} Spezifität (NCT05143996, NCT04104607 und NCT04496674), beabsichtigten wir die Entwicklung eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers im bereits etablierten IgGsc-Format. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung verschiedener bispezifischer Antikörper mit unterschiedlichen B7-H3- und CD3-Bindungseigenschaften sowie deren präklinische Testung im kolorektalen Karzinom beschrieben.

3.2 Evaluation des bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers zur Behandlung von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen

Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltrakts gehören zu den häufigsten Tumorentitäten und machen 26% der weltweiten Krebsinzidenz und 35% aller tumorbedingten Todesfälle aus.²⁰⁸ Trotz therapeutischer Verbesserungen in den letzten Jahrzehnten, unter anderem durch die Einführung von immuntherapeutischen Ansätzen, wie beispielsweise gegen HER2 oder VEGF gerichteten Antikörpern, unterstreichen die hohen Rückfallraten und die schlechten Prognosen den hohen Bedarf an neuen therapeutischen Strategien.^{150, 177} Abgesehen von kolorektalen Karzinomen exprimieren auch Pankreas-, Leber- und Magenkarzinome B7-H3 auf der Zelloberfläche. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit

untersuchten wir präklinisch die therapeutische Effektivität des im ersten Teil als Leitkandidat ausgewählten B7-H3xCD3 Antikörper in Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen.

3.3 Der Einfluss von Thrombozyten auf die Antitumor-Wirksamkeit von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern

In zahlreichen Studien wurde berichtet, dass eine erhöhte Thrombozytenzahl und die Expression bestimmter Thrombozytenoberflächenmarker mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium sowie einer schlechten Prognose assoziieren.^{187, 189, 190} Thrombozyten können das Wachstum und die Immunevasion von Tumoren durch verschiedene Faktoren, unter anderem durch die Beeinträchtigung von T-Zellen, fördern.^{197, 209} Allerdings fehlten bislang Studien, die den Einfluss von Thrombozyten auf Immuntherapien und speziell auf T-Zell stimulierende Ansätze untersuchen. Im Rahmen einer multizentrischen Phase-I-Studie (NCT04104607) stellten wir zunächst fest, dass Patienten, die mit einem bispezifischen Antikörper behandelt wurden, eine behandlungsassoziierte Thrombozytenaktivierung und vorübergehende Abnahme der Thrombozytenzahl aufwiesen. Auf Basis dieser Beobachtung wurde im dritten Teil der vorliegenden Arbeit der Grund für die Thrombozytenaktivierung sowie der Einfluss auf die therapeutische Effektivität von bispezifischen Antikörpern untersucht.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse der drei Forschungsartikel, die dieser kumulativen Dissertation zu Grunde liegen, zusammenfassend beschrieben. Die drei Forschungsartikel sind im Anhang beigefügt.²¹⁰

4.1 Entwicklung und Optimierung eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers im IgGsc-Format

In der vorliegenden Arbeit wurde ein optimierter bispezifischer B7-H3xCD3 Antikörper (CC-3) entwickelt und präklinisch charakterisiert.

Unter Verwendung konventioneller Hybridomtechnologie wurde eine Auswahl monoklonaler B7-H3 Antikörper generiert, von welchen vier monoklonale IgG1 Antikörper biochemisch charakterisiert wurden. Untersuchungen der Bindungseigenschaften belegten, dass die Klone 8H8, 11A7 und 8D9, mit EC50-Werten im subnanomolaren Bereich, hochaffin an B7-H3 binden, während der Klon 7C4 10- bis 100-fach höhere EC50-Werte aufwies. Da sich die Proteinsequenz von humanem und murinem B7-H3 nur in wenigen Aminosäuren unterscheidet, wurden für die Charakterisierung der Epitope verschiedene Mutanten eines B7-H3-Fc-Fusionsproteins generiert, bei denen eine oder zwei Aminosäuren durch die entsprechenden murinen Aminosäuren ersetzt wurden. Anschließend wurde die Bindung der Klone an diese mutierten Fusionsproteine mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) gemessen. Die Analysen zeigten, dass alle monoklonalen Antikörper unterschiedliche Epitope des B7-H3-Moleküls binden, wobei 7C4 in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran bindet, während die Klone 8H8, 11A7 und 8D9 an membranferne Molekülregionen binden.

Da die Bindungskinetik sowie das Epitop eines Antikörpers seine Funktionalität maßgebend beeinflussen, und sich die Klone 7C4 und 8H8 in dieser Hinsicht stark unterscheiden, wurden diese Klone für die Herstellung T-Zell-aktivierender bispezifischer Antikörper ausgewählt. Zunächst wurden die variablen Domänen der Klone sequenziert und in das zuvor etablierte bispezifische IgGsc-Format kloniert.²⁰⁶ Für die CD3-bindende Domäne des Antikörpers verwendeten wir einerseits die scSequenz des humanisierten Klons UCHT1, welche in unseren PSMAxCD3^{206, 207} und FLT3xCD3²⁰⁵ Konstrukten enthalten ist und eine hohe Affinität gegenüber CD3 aufweist (CD3^{high}). Zudem verwendeten wir eine veränderte UCHT1-Sequenz, die vier Mutationen im CDR-H2 sowie eine Mutation im FR-H3 trägt, wodurch die Affinität zu CD3 verringert wird (CD3^{low}). Nach biochemischer Charakterisierung der vier resultierenden bispezifischen Antikörper, wurde das Bindungsverhalten der Konstrukte an B7-H3 und CD3 untersucht.

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass die zwei 7C4 enthaltenden Konstrukte mit einer etwa 4 bis 10-fach geringeren Affinität an B7-H3 exprimierende Tumorzellen binden als 8H8 enthaltende Konstrukte. Dies steht im Einklang mit den deutlich niedrigeren K_a -Werten der 7C4-Konstrukte, während die K_d -Werte der Konstrukte ähnlich waren. Die Konstrukte mit der CD3high Variante (UCHT-1) banden CD3 mit EC50-Werten zwischen 30 und 60 nM, während die CD3low Konstrukte nur in sehr hohen Konzentrationen banden, ohne dabei eine Sättigung zu erreichen. Untersuchungen mittels Bio-Layer-Interferometrie ergaben, dass die Bindungsaffinität der CD3low-Varianten etwa um den Faktor 100 schwächer war.

Um zu analysieren, ob und inwiefern die Affinität zu B7-H3 und/oder die Epitop-Bindestelle die T-Zell stimulierende Effektivität der bispezifischen Antikörper beeinflusst, untersuchten wir die Aktivierung von T-Zellen in Kultur mit B7-H3 exprimierenden kolorektalen Karzinomzellen. Durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass beide 7C4-Konstrukte sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen bereits ab einer Konzentration von 40 pM maximal aktivierten, während bei den beiden 8H8-Konstrukten 200 pM erforderlich waren. Isotypkontrollen mit irrelevanter Zielspezifität (CTR_xCD3low und CTR_xCD3high) zeigten keine nennenswerte Wirkung, was die zielgerichtete Aktivität aller Konstrukte bestätigte.

Untersuchungen der zytolytischen Aktivität mittels durchflusszytometrischer Messungen nach 72 h Inkubation sowie mittels eines Echtzeit-Messverfahrens über fünf Tage zeigten ebenfalls eine Überlegenheit beider 7C4-Konstrukte gegenüber den 8H8-Konstrukten, bei welchen höhere Konzentrationen für eine vergleichbare Zielzellyse notwendig waren. Analysen der Zytokinproduktion mittels Multiplex-ELISA sowie der T-Zellproliferation mittels 3H-Thymidin-Aufnahme nach 3-6 Tagen zeigten, dass beide 8H8-Konstrukte T-Zellen selbst in hohen Konzentrationen deutlich schwächer stimulierten als die 7C4-Konstrukte. Zusammengefasst zeigte sich, dass die 7C4 enthaltenden bispezifischen Antikörper, welche an ein membrannahes B7-H3-Epitop binden, trotz ihrer deutlich geringeren Bindungsaffinität eine deutlich höhere Aktivität aufwiesen.

Beim direkten Vergleich der Funktionalität der CD3high und -low Antikörpervarianten, stellte sich überraschenderweise heraus, dass trotz der etwa 100-fach reduzierten CD3-Affinität, der Unterschied zwischen den beiden 7C4-Konstrukten hinsichtlich der induzierten T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Tumorzellyse sehr gering war. Zwischen den Konstrukten 8H8_xCD3high und 8H8_xCD3low wurde ein moderater Unterschied hinsichtlich der Zielzellyse festgestellt. Die 7C4_xCD3low Variante war sowohl dem 8H8_xCD3high als auch dem 8H8_xCD3low Konstrukt hinsichtlich ihrer Effektivität

überlegen. Im Gegensatz dazu lösten beide CD3low Konstrukte eine wesentlich geringere Zytokinausschüttung als die CD3high Konstrukte aus.

Um die Rolle der CD3-Affinität auch anhand von Konstrukten, die eine andere Antigenpezifität aufweisen, zu untersuchen, wurden CD3high und CD3low Varianten des bereits publizierten PSMAxCD3 Antikörpers CC-1²⁰⁶ generiert. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten^{211, 212} löste die PSMAxCD3low Variante eine deutlich geringere T-Zell-Aktivierung sowie Zytokinproduktion aus und bewirkte keine messbare Tumorzelllyse. Somit wurde im Fall der PSMAxCD3 Antikörper, im Gegensatz zum 7C4xCD3low Antikörper, die erwartete Auswirkung einer CD3-Affinitätsschwächung beobachtet. Zusammengefasst führte die CD3-Affinitätsschwächung des 7C4xCD3low Konstrukts zu keiner Wirksamkeitsverminderung in Bezug auf T-Zell-Aktivierung, -Proliferation und Tumorzelllyse, während die Stärke der Zytokinfreisetzung reduziert wurde.

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse beschränkten sich die nachfolgenden Experimente auf Konstrukte, die den funktionell überlegenen B7-H3 Klon 7C4 enthielten. Dabei wurde untersucht, ob die Affinität zu CD3 die Induktion von T-Gedächtniszellen, für welche beschrieben ist, dass sie die wichtigste Zellpopulation in Hinblick auf Therapieerfolg darstellen, beeinflusst.^{213, 214} Beide 7C4xCD3 Konstrukte induzierten die Expansion von Effektor- und zentralen T-Gedächtniszellen. Die CD3-Affinität hatte einen signifikanten Einfluss auf die Expansion von T-Gedächtniszellen, wobei die CD3low Variante signifikant mehr Effektor- und zentrale T-Gedächtniszellen induzierte. Wir wählten daher 7C4xCD3low als Leitkandidat CC-3 für die weitere Evaluierung in *in vivo* Modellen aus.

Pharmakokinetische Analysen von CC-3 bestätigten die erwartete verlängerte Halbwertszeit in C57BL/6-Mäusen, welche vergleichbar mit der Halbwertszeit der im selben Format vorliegenden Schwestermoleküle CC-1 und CLN-049/CC-2 war. Untersuchungen der IFN- γ Serumspiegel immunkompromittierter NOD scid gamma (NSG)-Mäuse, welche mit humanen PBMCs adoptiv transferiert worden waren, zeigten in den CC-3 behandelten Gruppen keine unerwünschte antigenunspezifische T-Zell-Aktivierung.

Anschließend wurde die Effektivität von CC-3 in drei verschiedenen NSG-Mausmodellen untersucht. Die NSG Mäuse wurden für alle Versuche adoptiv mit humanen PBMCs transferiert. Für das zuerst durchgeführte Lungenmetastasenmodell wurden HT-29 Zellen, welche mit einem Luciferasereporter transfiziert wurden, intravenös injiziert, gefolgt von PBMCs und CC-3. Durchflusszytometrische Analysen der in der Lunge lokalisierten T-Zellen und Tumorzellen zeigten eine ausgeprägte dosisabhängige T-Zell-Aktivierung

sowie eine deutlich reduzierte Tumorlast in den behandelten Tieren. Als nächstes wurde die Wirksamkeit anhand eines Flankentumormodells bewertet. Hierfür wurden ebenfalls mit einem Luciferasereporter transfizierte HT-29 Zellen verwendet. Messungen mittels Biolumineszenz-Bildgebung zeigten, dass CC-3 die Entwicklung von Flankentumoren wirksam verhinderte, während die Tumore der unbehandelten Tiere unbeeinträchtigt wuchsen. Abschließend untersuchten wir die Wirksamkeit von CC-3 gegen etablierte Flankentumore mit einem Durchmesser von circa 5 mm. Bei Mäusen, welche dreimal wöchentlich mit einer relativ geringen Dosis CC-3 (2 µg) und humanen PBMCs behandelt wurden, kam es zu einer vollständigen und langanhaltenden Tumorregression. Zusammengefasst belegen diese Daten die gewünschte lange Halbwertszeit, ein gutes Sicherheitsprofil sowie eine starke Wirksamkeit von CC-3 *in vivo* und ermöglichen somit die weitere Entwicklung sowie Testung von CC-3 im Rahmen einer klinischen Studie.

4.2 Evaluation des bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers zur Behandlung von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der im vorangehenden Abschnitt als Leitkandidat ausgewählte B7-H3xCD3 Antikörper CC-3 für die Behandlung von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomen getestet.

Im ersten Schritt wurde die Expression von B7-H3 mRNA in Adenokarzinomen des Pankreas, in Leberkarzinomen und Magenkarzinomen unter der Verwendung von TCGA-Datensätzen untersucht. Die höchste mRNA Expression wurde bei Adenokarzinomen des Pankreas beobachtet, gefolgt von Magenkarzinomen und Leberkarzinomen. Als nächstes wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß B7-H3 in diesen Entitäten auf der Tumorzelloberfläche exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde der monoklonale B7-H3 Antikörperklon 7C4 verwendet. Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine hohe Expression von B7-H3 in allen getesteten Zelllinien. Untersuchungen des Bindungsverhalten von CC-3 an Pankreas-, Leber-, und Magenkarzinomzelllinien ergaben EC50-Werte zwischen 4,6 und 19,7 nM, während keine unspezifische Bindung an B7-H3 negative Zellen beobachtet wurde.

Als nächstes wurde untersucht, ob CC-3 eine T-Zell-Reaktivität gegen Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomzellen auslöst. Durchflusszytometrische Analyse der CD69-Expression ergab eine maximale Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ab einer CC3-Konzentration von 1 nM. Die Analyse der T-Zell-Degranulation (CD107a Expression) bestätigte, dass CC-3 die T-Zellen bereits bei einer Dosis von 1 nM stark stimuliert. Bei Verwendung der Isotypkontrolle MOPCxCD3 oder B7-H3 negativen Zielzellen wurden keine Effekte beobachtet, was die Zielantigen-restringierte Wirkung von CC-3 bestätigt.

Die Analyse von Kulturüberständen mittels Multiplex-ELISA zeigte einen signifikanten und Zielzell-restringierten Anstieg von sekretiertem IL-2 sowie IFN- γ . Um die Fähigkeit von CC-3, T-Zell-Reaktivität gegen Zielzellen auszulösen weitergehend zu testen, wurden Perforin-positive Zellen angefärbt und mittels Immunfluoreszenzaufnahmen quantifiziert. Hierbei wurde eine signifikant höhere Anzahl Perforin-positiver Effektorzellen nach Behandlung mit CC-3 festgestellt, während mit der Isotypkontrolle kein Effekt beobachtet wurde.

Da die Proliferation von T-Zellen eine wichtige Voraussetzung in der Bekämpfung einer hohen Tumorlast darstellt, wurden im nächsten Schritt PBMCs mit einem Zellfarbstoff markiert und die Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie ihre Zellfarbstoffintensität mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Behandlung mit CC-3 löste in allen Fällen eine starke T-Zellproliferation sowie signifikante Erhöhung der T-Zellanzahl aus. Da insbesondere T-Gedächtniszellen die wichtigste Subpopulation für den therapeutischen Erfolg darstellen, wurde als nächstes untersucht, welche T-Zell-Populationen sich unter CC-3 Behandlung vermehrte. Hierbei wurde festgestellt, dass hauptsächlich die Expansion von Effektor-T-Gedächtniszellen und zentralen T-Gedächtniszellen ausgelöst wurde.

Abschließend wurde analysiert, inwiefern CC-3 die Lyse von Pankreas-, Leber- und Magenkarzinomzellen induziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine signifikante Zytotoxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien, während die Isotypkontrolle keine unerwünschte Wirkung zeigte. Analysen mit B7-H3 negativen Zellen bestätigten weiterhin die zielantigenspezifische Wirksamkeit von CC-3. Langzeitanalysen mittels eines Echtzeit-Messverfahrens bestätigten weiterhin die zytotoxische Wirksamkeit von CC-3 über längere Zeiträume, was darauf hindeutet, dass CC-3 eine anhaltende therapeutische Effektivität gegenüber Pankreas-, Leber und Magenkarzinomen hervorrufen kann.

4.3 Der Einfluss von Thrombozyten auf die Antitumor-Wirksamkeit von T-Zell-rekrutierenden bispezifischen Antikörpern

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Thrombozyten auf die therapeutische Effektivität von bispezifischen Antikörpern untersucht.

Obwohl mehrere Arbeiten bereits zeigten, dass Thrombozyten innerhalb der Tumorumgebung dem Tumor dazu verhelfen können, einer Antitumor-Immunreaktion zu entgehen^{197, 215, 216}, war ihr Einfluss auf Immuntherapien weitgehend unbekannt. Beim Monitoring von Prostatakarzinompatienten, welche im Rahmen unserer klinischen Studie mit dem bispezifischen PSMAxCD3 Antikörper CC-1^{206, 207} behandelt wurden,

beobachteten wir bei allen Studienteilnehmern einen behandlungsbedingten temporären Rückgang der Thrombozytenzahl. Die Thrombozytenzahl stand dabei in umgekehrter Beziehung zum Serumspiegel des löslichen IL-2-Rezeptors, was auf einen Zusammenhang mit der durch CC-1 induzierten T-Zell-Aktivierung hinwies. Die Behandlung mit CC-1 führte zudem zur Hochregulation des Aktivierungsmarkers P-Selektin (CD62P) auf der Thrombozytenoberfläche. Da wir auch beobachteten, dass sich die Thrombozytenzahl und die Thrombozytenaktivierung (CD62P-Expression) gegenläufig verhielten, stellten wir die Hypothese auf, dass die durch bispezifische Antikörper induzierte Interaktion zwischen Tumorzellen und T-Zellen die Aktivierung von Thrombozyten verursachte, was zu einem Rückgang der Thrombozytenanzahl führt.

Nachdem wir ausschließen konnten, dass CC-1 alleine eine Aktivierung oder Aggregation von Thrombozyten auslöst, etablierten wir ein Kokultursystem mit PSMA-exprimierenden Prostatakarzinomzellen (LNCaP), PBMCs und Thrombozyten, um die Interaktion der drei Komponenten in An- oder Abwesenheit von CC-1 nachzuziehen. Die Anwesenheit von CC-1 führte auch innerhalb der Kokultur, wie in den Patienten beobachtet, zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten.

Da die Thrombozytenaktivierung in den Proben, in denen Thrombozyten mit aktivierten T-Zellen inkubiert wurden, am ausgeprägtesten war und Tumorzellen sowie unstimulierte PBMCs nur eine moderate Aktivierung auslösten, stellten wir die Hypothese auf, dass stimulierte T-Zellen die Aktivierung von Thrombozyten auslösen. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten, nach denen T-Zellen Thrombozyten über die CD40-CD40L-Achse stimulieren können²¹⁷, beobachteten wir die Hochregulation von CD40L auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen sowie eine Verringerung der Thrombozytenaktivierung durch Blockierung der CD40-CD40L-Interaktion.

Um den Einfluss von Thrombozyten auf die CC-1-induzierte T-Zell-Reaktivität weiter zu charakterisieren, kultivierten wir LNCaP-Zellen mit PBMCs und Thrombozyten unter der Verwendung verschiedener Thrombozytenzahlen. Die CC-1 vermittelte Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sank mit steigender Thrombozytenzahl. Um auszuschließen, dass dieser Effekt ausschließlich aufgrund der Verwendung von PSMA als Zielantigen und/oder spezifisch mit den eingesetzten Tumorzellen auftrat, erweiterten wir unsere Untersuchung auf Sarkomzellen, die wir mit bereits in der Vergangenheit generierten bispezifischen NKG2DxCD3 Fusionsproteinen²¹⁸ behandelten, sowie B-ALL Zellen, welche wir mit Blinatumomab (CD19xCD3) behandelten. Die inhibierende Wirkung von Thrombozyten auf die CD3-vermittelte T-Zell-Aktivierung erwies sich als unabhängig vom Format des verwendeten bispezifischen Konstrukts, der Tumorentität sowie vom Zielantigen. Es wurde zudem ausgeschlossen, dass die Konstrukte in Abwesenheit von

Immuneffektorzellen die Aktivierung oder Aggregation der Thrombozyten auslösten. Zudem konnten wir feststellen, dass auch mit Blinatumomab behandelte B-ALL Patienten eine behandlungsassoziierte Abnahme der Thrombozytenzahl aufweisen, was die Beobachtung bestätigte, dass Thrombozyten die T-Zell-Aktivierung unabhängig von der Tumorentität, dem verwendeten Antikörperkonstrukt oder Zielantigen beeinflussen können. Weitere Analysen in unserem Kokultursystem mit CC-1 und LNCaP-Zellen zeigten eine Verringerung der durch Behandlung mit bispezifischen Antikörpern induzierten Degranulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (CD107a Expression) durch Thrombozyten.

Als nächstes untersuchten wir, inwiefern sich die durch Thrombozyten vermittelte Verminderung der T-Zell-Aktivierung und -Degranulation auf die Tumorzelllyse auswirkt. Hierfür quantifizierten wir die Anzahl Perforin sezernierender Immuneffektorzellen in unbehandelten und CC-1 behandelten Proben und stellten fest, dass in CC-1 behandelten Proben signifikant mehr Perforin-positive Zellen detektierbar waren, wobei dieser Effekt durch die Anwesenheit von Thrombozyten signifikant reduziert wurde. Dies spiegelte sich auch in einer durch Thrombozyten signifikant verringerten Zielzellyse wieder. Da die Aktivierung von Thrombozyten zur Sekretion immunmodulatorischer Faktoren führt^{197, 216}, untersuchten wir als Nächstes, ob eine Inhibition der Thrombozytenaktivierung mittels gerinnungshemmender Medikamente die T-Zell-hemmende Wirkung der Thrombozyten verhindern würde. Analysen der CC-1-induzierten T-Zellaktivierung zeigten, dass das Antikoagulans Dabigatran die inhibierende Wirkung der Thrombozyten wirksam aufheben konnte, während Indomethacin keinen relevanten Effekt erzielte. Als nächstes verglichen wir den Einfluss von Thrombozyten selbst mit Überständen aktivierter Thrombozyten (PR, *Platelet Release*) und stellten fest, dass die Aktivierung der T-Zellen in beiden Fällen gleichermaßen verringert wurde. Dies deutete darauf hin, dass aktivierte Thrombozyten lösliche Faktoren freisetzen, welche die durch bispezifische Antikörper induzierte T-Zell-Reaktivität beeinträchtigen, was auch durch bereits veröffentlichte Daten unterstützt wird.^{197, 219} Weitere Versuche zeigten, dass PR die Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse stark reduzierte. Um zu entschlüsseln, welcher lösliche Faktor die inhibierende Wirkung vermittelt, wurde eine Auswahl wichtiger immunmodulatorischer Zytokine im PR quantifiziert. Von allen getesteten Zytokinen war TGF- β 1 am stärksten erhöht, und wurde zudem während der Thrombozytenaktivierung moduliert.

Um zu bestätigen, dass spezifisch von Thrombozyten freigesetztes TGF- β die Wirksamkeit von T-Zell-aktivierenden Therapeutika untergräbt, untersuchten wir, ob die beobachteten Effekte durch die Blockade von TGF- β aufgehoben werden können. In den durchgeführten Zytotoxizitätsanalysen zeigte sich, dass der inhibierende Effekt des

Releasates durch die Inkubation mit TGF- β -blockierenden Reagenzien vollständig aufgehoben werden konnte.

Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass aktivierte T-Zellen Thrombozyten aktivieren, welche wiederum, durch die Freisetzung von TGF- β , die T-Zellaktivierung inhibieren. Somit ergibt sich ein negativer Kreislauf, welcher die therapeutische Effektivität von bispezifischen Antikörpern beeinflussen kann.

5 Diskussion

Immuntherapeutische Konzepte, und die damit einhergehende Möglichkeit eine spezifische Antitumor-Immunreaktion gegen maligne Zellen zu induzieren, revolutionierten in den letzten Jahren die Behandlung vieler Tumorerkrankungen. Prominente Beispiele sind monoklonale Antikörper wie Trastuzumab und Rituximab, die mittlerweile routinemäßig zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs und B-Zell-Malignomen eingesetzt werden.^{220, 221} In den letzten Jahren sind insbesondere T-Zell-basierte Immuntherapien stark in den Fokus gerückt, welche derzeit, trotz ihres unbestrittenen Erfolgs, bei soliden Tumoren unter einigen Einschränkungen leiden. Funktional sind bispezifische Antikörper eng verwandt mit CAR-T-Zellen, jedoch haben bispezifische Antikörper den Vorteil, dass es sich hierbei um „Medikamente von der Stange“ handelt, während die aufwändige Erzeugung von CAR-T-Zellen einerseits mehr Kosten verursacht und andererseits die Behandlung der Patienten verzögert. Beide Ansätze sind, trotz großer therapeutischer Erfolge in der Behandlung hämatologischer Malignome, bei soliden Tumoren bisher nicht umfassend wirksam. Die Gründe sind noch nicht vollständig geklärt, aber der eingeschränkte Zugang von Immuneffektorzellen zu soliden Tumoren scheint hierbei von wesentlicher Bedeutung zu sein.^{222, 223} Daher scheint es entscheidend, eine proinflammatorische Tumorumgebung zu schaffen, um den Zugang von Effektorzellen zu verbessern. Dass T-Zellen Tumore nur dann vernichten können, wenn eine entzündungsfördernde Tumormikroumgebung die Extravasation von T-Zellen erleichtert, wird durch bereits vorliegende Daten nahegelegt.^{224, 225} Demnach könnte die Wahl eines tumorassoziierten Antigens, welches nicht nur auf Tumorzellen selbst, sondern auch auf der Neovaskulatur des Tumors exprimiert wird („*dual-targeting*“), den therapeutischen Erfolg von T-Zell-basierten Immuntherapien in soliden Tumoren steigern. Das zur B7 Familie zugehörige Protein B7-H3/CD276 hat aufgrund seiner Beteiligung an zahlreichen Tumorfunktionen, wie Zellproliferation, Metastasierung, Chemoresistenz und Tumorzellstoffwechsel, erhebliches Interesse geweckt. Darüber hinaus wird eine hohe Expression von B7-H3 auf Tumorgewebe mit einem schlechten klinischen Verlauf und Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht²²⁶⁻²²⁸. Mehrere Studien geben zudem erste Hinweise darauf, dass B7-H3 positive Tumorzellfraktionen vermehrt Tumorstammzellen enthalten könnten²²⁹⁻²³¹. B7-H3 scheint insbesondere auch die Entwicklung gastrointestinaler Tumore zu beeinflussen. So fördert B7-H3 die Angiogenese in kolorektalen Karzinomen durch die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs.²³² Zudem wurde gezeigt, dass lösliches B7-H3 die Invasion und Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen über den TLR4/NF-κB-Signalweg begünstigt²³³ und dass die

Hemmung von B7-H3 zur verminderten Metastasenbildung in Mausmodellen führt¹³⁴. Für Magenkarzinome wurde gezeigt, dass B7-H3 die Migration und Invasion von Tumorzellen begünstigt.¹³⁵ Andere Arbeiten berichteten, dass B7-H3 die epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) von Leberkarzinomzellen fördert.²³⁴ Darüber hinaus moduliert B7-H3 auch Immunreaktionen, wobei die bisher verfügbaren Daten zur funktionellen Rolle zumindest teilweise widersprüchlich sind.^{128, 235, 236} Ursprünglich wurde B7-H3 als kostimulatorisches Molekül betrachtet, da gezeigt wurde, dass es die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Gegenwart eines CD3 Antikörpers verstärkt.¹²⁰ Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten mehrere andere Studien, dass B7-H3 eine eher hemmende Wirkung vermittelt, indem es die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie die Produktion von IL-2 und IFN- γ durch die Unterdrückung von NF- κ B und Aktivatorprotein-1 vermittelten Signalwegen verringert.^{123, 125} Darüber hinaus wurde gezeigt, dass B7-H3 während der Entstehung, Entwicklung und Metastasierung von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses die Evasion vor der Immunüberwachung ermöglicht, was darauf hindeutet, dass die durch B7-H3 gebildete immunsuppressive Mikroumgebung die Tumorzellen dabei unterstützt, sich der Vernichtung durch Immunzellen zu entziehen.²³⁷ Aufgrund dieser Eigenschaften und der breiten, aber dennoch relativ spezifischen Expression auf Tumorzellen sowie auf den Tumorgefäßen und der Mikroumgebung des Tumors in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten, gilt B7-H3 in der antikörperbasierten Immuntherapie als attraktives Zielantigen.^{119, 124, 131, 238} Die Eignung von B7-H3 als therapeutisches Antigen, mit welchem sowohl Tumorzellen als auch Gefäße angegriffen werden, wird auch durch Ergebnisse mit B7-H3-ADC untermauert, die zeigen, dass etablierte Tumore in Mäusen nur dann vernichtet werden, wenn das ADC mit einem Wirkstoff kombiniert wird, der sowohl gegen Tumorzellen als auch gegen das Tumorgefäßsystem wirkt.¹¹⁹

Die Expression von B7-H3 auf Darmtumoren wurde bereits in mehreren Studien belegt.^{117, 239, 240} Darüber hinaus ist B7-H3 als negativer prognostischer Faktor für Patienten mit kolorektalem Karzinom beschrieben.²⁴⁰ Bisher sind nur wenige immuntherapeutische Ansätze für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen zugelassen, und diese sind oftmals nur in ausgewählten Patientenkollektiven wirksam.^{8, 139, 142-144} In aktuellen präklinischen sowie frühen klinischen Testungen neuer bispezifischer Antikörper und CAR-T-Zellen zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren inklusive Darmtumoren sind EGFR und CEA weit verbreitete Zielantigene, welche allerdings nach aktuellem Stand nicht dafür geeignet sind, sowohl auf Tumorzellen als auch auf Tumorgefäße abzielen.^{222, 241, 242} Der Mangel an immuntherapeutischen Behandlungsoptionen in kolorektalen Karzinomen sowie die Rationale, die Effektivität von bispezifischen

Antikörpern in soliden Tumoren durch die Verwendung eines Zielantigens, welches sowohl auf Tumorzellen als auch auf Tumorgefäßen exprimiert ist zu steigern, veranlassten uns zur Annahme, dass ein bispezifischer B7-H3xCD3 Antikörper eine vielversprechende immuntherapeutische Strategie darstellen könnte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Entwicklung des optimierten bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers CC-3 und dessen präklinische Charakterisierung für die Anwendung in kolorektalen Karzinomen berichtet. Zunächst wurden mehrere B7-H3 Antikörper generiert und umfassend mittels Durchflusszytometrie, Bindungskinetik und Epitopkartierung charakterisiert, um die optimalen Tumorantigenbinder für die Herstellung bispezifischer Antikörper zu identifizieren. Umfassende funktionelle Charakterisierungen ergaben, dass bispezifische Antikörper, die das vom Antikörperklon 8H8 erkannte distale B7-H3-Epitop binden, trotz ihrer höheren Affinität zu B7-H3 weniger wirksam sind als bispezifische Antikörper, die den Klon 7C4 enthalten, welcher an ein membrannahe Epitop bindet. Diese Ergebnisse bestätigen die inzwischen etablierte Feststellung, dass die Membrannähe des von bispezifischen Antikörpern erkannten Zielepitops ein wichtiger Faktor für deren Funktion ist.^{129, 243-245} Im Fall der hier beschriebenen B7-H3 bindenden bispezifischen Antikörper scheint die membran nahe Bindung den Einfluss der Affinität in Hinblick auf die Aktivität zu überwiegen.

Neben der Membrannähe des Zielepitops und der Affinität des Tumorantigenbinders hat auch die CD3-Affinität einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit und Potenz sowie insbesondere die Sicherheit bispezifischer Antikörper.^{212, 245, 246} Aufgrund dessen könnte die Anpassung der CD3-Affinität dazu führen, dass die Wirksamkeit bispezifischer Antikörper bis zu einem gewissen Grad von der Zytokinfreisetzung entkoppelt wird.^{247, 248} Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass eine etwa 100-fache Senkung der CD3-Bindungsaffinität die Zytokinfreisetzung des 7C4xCD3 Konstrukts verringerte, während die Wirksamkeit nicht beeinträchtigt wurde. Konstrukte, die 8H8 als B7-H3-Binder enthalten, waren weniger widerstandsfähig gegenüber einer Abschwächung der CD3-Affinität, aber wiederum widerstandsfähiger als ein PSMAxCD3 Konstrukt, welches PSMA an einem membranfernen Epitop bindet.²⁰⁶ In Anbetracht dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass bispezifische Antikörper, welche proximale Epitope binden, im Allgemeinen weniger empfindlich auf eine Abschwächung der CD3-Affinität reagieren als solche, die distale Epitope binden. Im Einklang mit diesen Überlegungen zeigen Studien, welche die Auswirkung der CD3 und/oder HER2-Affinität in HER2xCD3 Konstrukten untersuchten ebenfalls, dass die CD3-Bindungsaffinität nur eine geringe Auswirkung auf die Antitumor-Aktivität hat.^{245, 249} Dies könnte weitreichende Folgen haben, da eine abgeschwächte CD3-Affinität und damit abgeschwächte Zytokinfreisetzung potenzielle

dosislimitierende Nebenwirkungen bei der klinischen Anwendung verringern könnte, ohne die Antitumor-Aktivität zu verringern. Andererseits kann die Induktion immunstimulierender Zytokine auch zur therapeutischen Wirksamkeit beitragen, weswegen weitere Analysen, unter anderem in aussagekräftigen Mausmodellen, erforderlich sind, um zu klären, inwieweit immunregulierende Zytokine zur Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern im Allgemeinen und CC-3 im Speziellen beitragen oder entbehrlich sind.

Wie bereits beschrieben wurde eine Expression von B7-H3 nicht nur für kolorektale Karzinome, sondern auch in weiteren gastrointestinalen Tumoren berichtet und mit einer erhöhten Aggressivität der Erkrankung in Verbindung gebracht.^{134, 135, 233, 234} Insgesamt ist die Behandlung von gastrointestinalen Tumoren, wie Pankreas-, Magen- und Leberkarzinomen nach wie vor schwierig, und immuntherapeutische Ansätze sind nur begrenzt wirksam. Mehrere *small molecule inhibitors* wurden von der FDA für die Behandlung von Pankreas-, Magen- und Leberkarzinomen zugelassen, aber auch der Nutzen dieser Therapien ist eher gering.^{163, 250-253} Antikörperbasierte Ansätze, die auf die Angiogenese (z. B. Ramucirumab) oder auf onkogene Signalwege (z.B. EGF Cetuximab oder HER2 Trastuzumab) abzielen, zeigen ebenfalls nur einen begrenzten Nutzen. Die Wirksamkeit T-Zell-basierter Immuntherapien, insbesondere Checkpoint-Inhibitoren, welche die Behandlung von beispielsweise Lungen- und Hautkarzinomen revolutionierten, ist auf eine Minderheit der Patienten mit gastrointestinalen Tumoren beschränkt und das Ansprechen ist in den meisten Fällen nur von kurzer Dauer.^{154, 254-257} Daher sind neue therapeutische Konzepte für Pankreas-, Magen- und Leberkarzinome dringend erforderlich. Aufgrund dessen weiteten wir die präklinische Testung von CC-3 auf Magen-, Leber- und Pankreaskarzinome aus. Durchflusszytometrische Analysen ergaben eine hohe B7-H3-Expression auf allen getesteten Zelllinien und bestätigten die Bindung von CC-3 an Magen-, Leber- und Pankreaskarzinomzellen. Anschließende funktionelle Charakterisierungen zeigten, dass CC-3 auch in diesen Entitäten eine potente T-Zell-Aktivierung und -Degranulation sowie die Sekretion der „Antitumor-Zytokine“ IFN- γ und IL-2 sowie potente Lyse der Tumorzellen auslöst. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass CC-3 potent die Proliferation von T-Zellen induziert, was eine entscheidende Voraussetzung für die Behandlung von Patienten mit hoher Tumorlasten ist. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass CC-3 hauptsächlich die Proliferation von T-Gedächtniszellen auslöst, die als entscheidend für den Therapieerfolg gelten.^{213, 214}

Das zunehmende Interesse an B7-H3 als Zielmolekül für antikörperbasierte Immuntherapien spiegelt sich in einer Reihe klinischer Studien wieder, in welchen

verschiedenste auf B7-H3 abzielende Strategien untersucht werden, wie ADC (MGC018; DS7300a), Fc-optimierte Antikörper (MGA271, Enoblituzumab; DS-5573a: klinische Studie abgeschlossen) und radioaktiv markierte Antikörper (^{131}I -8H9; ^{177}Lu -DPTA Omburtamab). Auch gegen B7-H3 gerichtete CAR-T-Zellen werden aktuell in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem Leberkarzinomen und fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen klinisch getestet (NCT04897321, NCT05211557, NCT05341492, NCT04483778, NCT05323201, NCT05241392, NCT05474378, NCT03198052, NCT04185038, NCT05366179, NCT04670068, NCT05143151). Die klinische Testung des gegen B7-H3 gerichteten bispezifischen Antikörpers MGD009 (NCT026285351) musste aufgrund eines vorübergehenden Anstiegs der Leberenzyme in behandelten Patienten ausgesetzt werden, was im Einklang mit Berichten steht, die eine geringe Expression von B7-H3 in gesundem Lebergewebe dokumentieren.^{117, 234} Die Studie konnte jedoch nach einer Sicherheitsbewertung wieder aufgenommen werden (NCT02628535). MGD009 ist ein sogenanntes DART (*dual-affinity re-targeting antibody*), welches aus zwei scFv-Fragmenten besteht. Es ist bekannt, dass scFv-Fragmente zur Aggregation neigen und in bispezifische Antikörper eingebaut eine zielantigenunspezifische T-Zellaktivierung sowie Freisetzung von Zytokinen bewirken können.²⁵⁸ Allerdings sind keine detaillierten Informationen über MGD009 verfügbar, weswegen ein direkter Vergleich mit CC-3 nicht möglich ist. Abgesehen von der Expression auf Lebergewebe wurden auch begrenzte Mengen B7-H3 auf Endothelzellen im Magen-Darm-Trakt, ruhenden Fibroblasten, Osteoblasten und auf APC beobachtet.^{116, 120, 259, 260} Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit entsprechender „*On-Target-Off-Tumor*“-Toxizitäten, welche bei der klinischen Prüfung von CC-3 sorgfältig überwacht werden müssen. Ebenso müssen potenzielle Auswirkungen einer Blockade der B7-H3 Funktion auf die Immunität näher untersucht werden.

In jedem Fall bilden die in unseren beiden Arbeiten beschriebenen präklinischen Daten eine solide Grundlage für die weitere klinische Entwicklung von CC-3. Aktuell wird CC-3 GMP-konform produziert, um die Evaluierung im Rahmen einer klinischen „*First-in-Human*“-Studie in Patienten mit kolorektalem Karzinom zu ermöglichen, welche im Jahr 2023 beginnen wird.

Wie bereits beschrieben, hat die Tumormikroumgebung einen erheblichen Einfluss auf den Erfolg von immuntherapeutischen Behandlungen. Es wurden bereits mehrere immunsuppressive Zellen, einschließlich tumorassoziierter Fibroblasten, regulatorischer T-Zellen und myeloider Suppressorzellen beschrieben, welche insbesondere bei soliden Tumoren die Antitumor-Immunität unterdrücken können.^{203, 261-263} Obwohl bereits gezeigt wurde, dass auch Thrombozyten die Immunevasion von Tumoren begünstigen

können^{197, 215}, wurde ihre Relevanz im Zusammenhang mit Immuntherapien bisher kaum untersucht. Entsprechend wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht, ob und inwiefern Thrombozyten die Wirksamkeit von bispezifischen Antikörpern beeinflussen.

Im Rahmen einer klinischen Studie beobachteten wir, dass die Behandlung mit unserem PSMAxCD3 Antikörper CC-1 zu signifikanter Aktivierung der Thrombozyten sowie zu einem vorübergehenden Rückgang der Gesamtplättchenanzahl in den Patienten führte. Aufgrund der Tatsache, dass wir in ALL Patienten, welche mit Blinatumomab behandelt wurden, ähnliche Effekte beobachteten, stellten wir die Hypothese auf, dass Thrombozyten einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Wirksamkeit von T-Zell aktivierenden bispezifischen Antikörpern haben könnten. Diese Annahme wird durch Studien gestützt, welche zeigten, dass Thrombozyten die Antitumor-Reaktivität von NK-Zellen stark beeinträchtigen.^{216, 264, 265} Ebenfalls steht dies im Einklang mit einer weiteren Arbeit, welche eine durch Thrombozyten eingeschränkte T-Zell-Immunität bei adoptivem T-Zell-Transfer beschrieb.¹⁹⁷

In präklinischen Untersuchungen konnten wir beobachten, dass die durch bispezifische Antikörper vermittelte Tumor-Immunzell-Interaktion tatsächlich Thrombozytenaktivierung auslöst. Die von bispezifischen Antikörpern induzierte T-Zell-Aktivierung ging mit einer Hochregulation von CD40L auf T-Zellen einher (vorwiegend auf CD4⁺ T-Zellen), und die Thrombozytenaktivierung konnte durch eine Blockade der CD40-CD40L-Interaktion teilweise verhindert werden. Dies steht im Einklang mit veröffentlichten Daten, dass T-Zellen Thrombozyten über die CD40-CD40L-Achse stimulieren.²⁶⁶ Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Hemmung der durch bispezifische Antikörper induzierten T-Zell-Reaktivität durch Thrombozyten nicht vom Format des verwendeten bispezifischen Konstrukts (IgGsc, BFP oder BiTE), der Tumorentität (Prostatakarzinom, Sarkom oder ALL) oder Zielantigen (PSMA, NKG2DL oder CD19) abhängt, sondern in allen Fällen zu beobachten ist. Dies deutet darauf hin, dass die immunmodulierende Wirkung der Thrombozyten ein allgemeiner Evasionsmechanismus eines Tumors bei Behandlung mit T-Zell-aktivierenden Antikörpern sein könnte, was auch durch die Feststellung gestützt wird, dass lösliche Faktoren, die von aktivierten Thrombozyten sekretiert werden, die durch bispezifische Antikörper induzierte Zytotoxizität wirksam unterbinden. Diese Beobachtung stimmt mit bereits für adoptiv transferierte T-Zellen und Checkpoint-Inhibitoren berichteten Beobachtungen überein.^{197, 219}

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der reversible Thrombininhibitor Dabigatran die hemmende Wirkung der Thrombozyten aufheben konnte, während Indomethacin keine Wirkung zeigte. Dies wird durch Daten erklärt, die zeigen, dass Dabigatran die von Thrombin induzierte GARP-Spaltung blockiert und die damit einhergehende Freisetzung

von aktivem TGF- β blockieren kann²¹⁹ und stimmt mit unseren Ergebnissen überein, die eine wichtige Rolle der TGF- β Achse für die beobachteten Effekte belegen. In Anbetracht der Tatsache, dass eine pharmakologische Hemmung von Thrombozyten die Wirksamkeit der bispezifischen Antikörper wiederherstellt, unterstreichen unsere Daten nicht nur die Rolle von Thrombozyten auf Immuntherapien im Allgemeinen und bispezifische Antikörper im Speziellen, sondern deuten auch darauf hin, dass die Blockierung der Thrombozytenaktivierung mit bereits klinisch verfügbaren Medikamenten oder die Neutralisierung von TGF- β die Wirksamkeit von T-Zell-aktivierenden bispezifischen Antikörpern erhöhen könnte. In Anbetracht der Tatsache, dass CAR-T-Zellen einen ähnlichen Zytotoxizität induzierenden Mechanismus nutzen, ist eine von Thrombozyten vermittelte Hemmung der CAR-T-Zell-Reaktivität ebenfalls wahrscheinlich, was durch entsprechende Untersuchungen geklärt werden könnte.

Zusammengefasst liefern unsere Daten Hinweise auf einen von Thrombozyten angetriebenen inhibitorischen Kreislauf, welcher zytotoxische Effekte von T-Zellen gegen Tumorzellen untergräbt. Auf diesem Weg wird dem Tumor die Immunevasion während der Behandlung mit T-Zell aktivierenden Strategien erleichtert.

Diese kumulative Arbeit konnte zusammengefasst nicht nur wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf die Bedeutung des Antigen- sowie CD3-Epitops eines bispezifischen B7-H3xCD3 Antikörpers für die effektive Behandlung solider Tumore liefern, sondern darüberhinaus die Bedeutung von Thrombozyten im Kontext der Behandlungseffektivität unterstreichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen-presenting cell
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BiTE	<i>Bispecific T cell engager</i>
bsAb	<i>bispecific antibody</i> , bispezifischer Antikörper
B7-H3	B7 Homolog 3
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C _H	<i>Constant heavy</i>
C _L	<i>Constant light</i>
CLD	Chronische Lebererkrankung
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DART	<i>Dual-affinity re-targeting antibody</i>
dMMR	<i>Mismatch Repair Deficiency</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecule pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
EGFR	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale-zu-mesenchymale Transition
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcR	Fc Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HAMA	Human-Anti-Maus-Antikörper
HC	<i>Heavy chain</i>
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
ImmTac	<i>Immune mobilising monoclonal T-cell receptors against cancer</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
LC	<i>Light chain</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MSI-H	Mikrosatelliten-Instabilität
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSG	NOD scid gamma
PAMP	Pathogen-associated molecule pattern
PAP	Prostataspezifische saure Phosphatase
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PR	<i>Platelet Releasate</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
TAA	Tumorassoziertes Antigen
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIL	Tumorerfiltrierender Lymphozyt
TMB-H	<i>High tumor mutational burden</i>
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
V _H	<i>Variable heavy</i>
V _L	<i>Variable light</i>

7 Literaturverzeichnis

1. Schmiedel BJ. Expression, Funktion und therapeutische Modulation von RANKL in der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Neoplasien durch Natürliche Killerzellen. Dissertation Universität Tübingen 2011.
2. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol* 2006; 24:287-320.
3. Wild J. Rolle des TNF-Familienmitgliedes BAFF und seiner Neutralisation durch Belimumab für die Suszeptibilität von CLL-Zellen gegenüber NK-Zellyse und Systemtherapie. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2016.
4. Steinbacher J. Expression, Freisetzung und therapeutische Modulation von Natural killer group 2 member D (NKG2D)-Liganden bei Leukämien: Konsequenzen für die NK-Zell-Reaktivität. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2014.
5. Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol* 2007; 18 Suppl 1:i9-i13.
6. Lutz M. Ein Fc-optimierter FLT3-Antikörper zur Induktion der Immunantwort von natürlichen Killerzellen gegen die akute lymphatische B-Zell-Leukämie. Masterarbeit Universität Stuttgart 2020.
7. K M. Janeway Immunologie: Springer Spektrum; 2018.
8. Schmied B. Fc-optimized antibodies for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia and colorectal cancer Dissertation Eberhard Karls University Tübingen; 2020.
9. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 2011; 138:35-7.
10. Rothfelder K. Die Abwesenheit von NKG2D-Liganden auf leukämieinduzierenden Zellen vereint Stammzelleigenschaften und Immunevasion in der akuten myeloischen Leukämie. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen; 2018.
11. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990; 11:237-44.
12. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319:675-8.
13. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.
14. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20:123-37.
15. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:613-35.
16. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; 5:996-1002.
17. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 2017; 47:820-33.
18. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 2016; 16:7-19.
19. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:850-61.
20. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:940-52.
21. Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 2005; 42:495-9.
22. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol* 2002; 20:197-216.

23. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
24. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med* 1990; 172:1785-94.
25. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol* 1999; 17:593-623.
26. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J. Exp. Med* 1999; 190:1909-14.
27. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 2000; 18:767-811.
28. Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997; 6:1-11.
29. van Boxel GI, Holmes S, Fugger L, Jones EY. An alternative conformation of the T-cell receptor alpha constant region. *J Mol Biol* 2010; 400:828-37.
30. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:419-66.
31. Janeway CA, Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:645-74.
32. Singer A, Bosselut R. CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv Immunol* 2004; 83:91-131.
33. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Front Immunol* 2013; 4:206.
34. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:486-99.
35. Hörner S. Entwicklung von immunstimulatorischen und bispezifischen Antikörpern und deren Charakterisierung in Mausmodellen. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2021.
36. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; 11:211-6.
37. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261:609-12.
38. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003; 3:609-20.
39. Redmond WL, Weinberg AD. Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Crit Rev Immunol* 2007; 27:415-36.
40. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 162:3256-62.
41. Olejniczak K, Kasprzak A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. *Med Sci Monit* 2008; 14:RA179-89.
42. Cousens LP, Orange JS, Biron CA. Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 1995; 155:5690-9.
43. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2018; 36:411-33.

44. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-63.
45. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11:3887-95.
46. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk* 1909; 5:273-90.
47. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1284:1-5.
48. Baldwin RW. Immunity to transplanted tumour: the effect of tumour extracts on the growth of homologous tumours in rats. *Br J Cancer* 1955; 9:646-51.
49. Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967; 1:1171-4.
50. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
51. Thomas L. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. New York: Hoeber-Harper; 1959.
52. Old LJ, Boyse EA. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med* 1964; 15:167-86.
53. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst* 1957; 18:769-78.
54. Burnet FM. Cancer—a biological approach. *Br. Med. J* 1957; 1:841-7.
55. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
56. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol* 2004; 22:329-60.
57. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.
58. Vyas M, Muller R, Pogge von Strandmann E. Antigen Loss Variants: Catching Hold of Escaping Foes. *Front Immunol* 2017; 8:175.
59. Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, et al. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2017; 214:895-904.
60. Laine A, Labiad O, Hernandez-Vargas H, This S, Sanlaville A, Leon S, et al. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin α v β 8-mediated TGF- β activation. *Nat Commun* 2021; 12:6228.
61. Radoja S, Rao TD, Hillman D, Frey AB. Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164:2619-28.
62. Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 1999; 16:86-94.
63. Eyles J, Puaux AL, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, et al. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 2010; 120:2030-9.
64. Loeser S, Loser K, Bijker MS, Rangachari M, van der Burg SH, Wada T, et al. Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells. *J Exp Med* 2007; 204:879-91.
65. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:411-22.
66. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348:62-8.
67. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018; 359:1361-5.

68. 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* 1989; 86:10024-8.
69. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:31-42.
70. Grupp SA, Maude SL, Rives S, Baruchel A, Boyer MW, Bittencourt H, et al. Updated Analysis of the Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 2018; 132:895-.
71. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63:803-43.
72. Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. <https://archive.org/details/philtrans05561826> 1900.
73. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63:78-85.
74. Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959; 73:119-26.
75. Ribatti D. Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunol Lett* 2015; 164:72-5.
76. Koerner SP. Ein Fc-optimierter CD133 Antikörper zur Induktion der Immunantwort von natürlichen Killerzellen gegen Leukämiezellen. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2017.
77. Tonegawa S, Brack C, Hozumi N, Pirrotta V. Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978; 42 Pt 2:921-31.
78. Brack C, Hiramata M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978; 15:1-14.
79. Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981; 290:562-5.
80. Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:172-80.
81. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:3180-4.
82. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J* 2010; 12:33-43.
83. Vogt F. Entwicklung von bispezifischen Antikörpern mit optimierter Ziel- und Effektorspezifität. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2017.
84. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8:34-47.
85. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:311-31.
86. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
87. Seidel UJ, Vogt F, Grosse-Hovest L, Jung G, Handgretinger R, Lang P. gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Front Immunol* 2014; 5:618.
88. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 2013; 23:277-86.

89. Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 2013; 122:3482-91.
90. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-7.
91. Ortho Multicenter Transplant Study G. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med* 1985; 313:337-42.
92. Ayyar BV, Arora S, O'Kennedy R. Coming-of-Age of Antibodies in Cancer Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37:1009-28.
93. Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 1985; 314:268-70.
94. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:2188-95.
95. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321:522-5.
96. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994; 7:13-21.
97. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991; 222:581-97.
98. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:278-87.
99. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 2014; 5:12472-508.
100. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019; 19:133-50.
101. Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood* 2018; 131:49-57.
102. Alves Costa Silva C, Facchinetti F, Routy B, Derosa L. New pathways in immune stimulation: targeting OX40. *ESMO Open* 2020; 5.
103. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4005-10.
104. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014; 370:1101-10.
105. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2016; 375:740-53.
106. Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discov* 2014; 4:522-6.
107. Ma S, Li X, Wang X, Cheng L, Li Z, Zhang C, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci* 2019; 15:2548-60.

108. Jung G, Honsik CJ, Reisfeld RA, Muller-Eberhard HJ. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:4479-83.
109. Perez P, Hoffman RW, Shaw S, Bluestone JA, Segal DM. Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. *Nature* 1985; 316:354-6.
110. Wu Z, Cheung NV. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. *Pharmacol Ther* 2018; 182:161-75.
111. Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010; 36:458-67.
112. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; 321:974-7.
113. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2015; 93:290-6.
114. Middleton MR, McAlpine C, Woodcock VK, Corrie P, Infante JR, Steven NM, et al. Tebentafusp, A TCR/Anti-CD3 Bispecific Fusion Protein Targeting gp100, Potently Activated Antitumor Immune Responses in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2020; 26:5869-78.
115. Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, Nevinsky GA. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12:195-208.
116. Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, Pfistershammer K, Kirchberger S, Klauser C, et al. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J Immunol* 2004; 172:2352-9.
117. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al. B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2021; 27:1227-35.
118. Vigdorovich V, Ramagopal UA, Lazar-Molnar E, Sylvestre E, Lee JS, Hofmeyer KA, et al. Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure* 2013; 21:707-17.
119. Seaman S, Zhu Z, Saha S, Zhang XM, Yang MY, Hilton MB, et al. Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature. *Cancer Cell* 2017; 31:501-15 e8.
120. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2001; 2:269-74.
121. Luo L, Zhu G, Xu H, Yao S, Zhou G, Zhu Y, et al. B7-H3 Promotes Pathogenesis of Autoimmune Disease and Inflammation by Regulating the Activity of Different T Cell Subsets. *PLoS One* 2015; 10:e0130126.
122. Wang L, Fraser CC, Kikly K, Wells AD, Han R, Coyle AJ, et al. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection. *Eur J Immunol* 2005; 35:428-38.
123. Prasad DV, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol* 2004; 173:2500-6.
124. Leitner J, Klauser C, Pickl WF, Stockl J, Majdic O, Bardet AF, et al. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Eur J Immunol* 2009; 39:1754-64.
125. Suh WK, Gajewska BU, Okada H, Gronski MA, Bertram EM, Dawicki W, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol* 2003; 4:899-906.
126. Luo L, Chapoval AI, Flies DB, Zhu G, Hirano F, Wang S, et al. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J Immunol* 2004; 173:5445-50.

127. Sun X, Vale M, Leung E, Kanwar JR, Gupta R, Krissansen GW. Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Ther* 2003; 10:1728-34.
128. Chen L, Chen J, Xu B, Wang Q, Zhou W, Zhang G, et al. B7-H3 expression associates with tumor invasion and patient's poor survival in human esophageal cancer. *Am J Transl Res* 2015; 7:2646-60.
129. Lim S, Liu H, Madeira da Silva L, Arora R, Liu Z, Phillips JB, et al. Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1alpha. *Cancer Res* 2016; 76:2231-42.
130. Altan M, Pelekanou V, Schalper KA, Toki M, Gaule P, Syrigos K, et al. B7-H3 Expression in NSCLC and Its Association with B7-H4, PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2017; 23:5202-9.
131. MacGregor HL, Sayad A, Elia A, Wang BX, Katz SR, Shaw PA, et al. High expression of B7-H3 on stromal cells defines tumor and stromal compartments in epithelial ovarian cancer and is associated with limited immune activation. *J Immunother Cancer* 2019; 7:357.
132. Lu Z, Zhao ZX, Cheng P, Huang F, Guan X, Zhang MG, et al. B7-H3 immune checkpoint expression is a poor prognostic factor in colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2020; 33:2330-40.
133. Sun TW, Gao Q, Qiu SJ, Zhou J, Wang XY, Yi Y, et al. B7-H3 is expressed in human hepatocellular carcinoma and is associated with tumor aggressiveness and postoperative recurrence. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:2171-82.
134. Zhao X, Li DC, Zhu XG, Gan WJ, Li Z, Xiong F, et al. B7-H3 overexpression in pancreatic cancer promotes tumor progression. *Int J Mol Med* 2013; 31:283-91.
135. Li Y, Yang X, Wu Y, Zhao K, Ye Z, Zhu J, et al. B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* 2017; 8:71725-35.
136. Zhang X, Fang C, Zhang G, Jiang F, Wang L, Hou J. Prognostic value of B7-H3 expression in patients with solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8:93156-67.
137. Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5150-7.
138. Institut RK. Krebs in Deutschland für 2015/2016: GdeKiDeV; 2020.
139. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet* 2019; 394:1467-80.
140. Greene FL. Current TNM staging of colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2007; 8:572-3.
141. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64:104-17.
142. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16:361-75.
143. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20:5322-30.
144. Peeters M, Kafatos G, Taylor A, Gastanaga VM, Oliner KS, Hechmati G, et al. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer* 2015; 51:1704-13.
145. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71:209-49.

146. Méndez-Sánchez N, Valencia-Rodríguez A, Coronel-Castillo CE, Qi X. Narrative review of hepatocellular carcinoma: from molecular bases to therapeutic approach. *Digestive Medicine Research* 2021; 4.
147. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19:329-38.
148. Liu Z, Liu X, Liang J, Liu Y, Hou X, Zhang M, et al. Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Future Prospects. *Front Immunol* 2021; 12:765101.
149. Casadei-Gardini A, Scartozzi M, Tada T, Yoo C, Shimose S, Masi G, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: An inverse probability of treatment weighting analysis. *Liver Int* 2021; 41:1389-97.
150. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2020; 382:1894-905.
151. Mou L, Tian X, Zhou B, Zhan Y, Chen J, Lu Y, et al. Improving Outcomes of Tyrosine Kinase Inhibitors in Hepatocellular Carcinoma: New Data and Ongoing Trials. *Front Oncol* 2021; 11:752725.
152. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 379:54-63.
153. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389:56-66.
154. Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased alpha-fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:282-96.
155. Yeo D, Giardina C, Saxena P, Rasko JEJ. The next wave of cellular immunotherapies in pancreatic cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2022; 24:561-76.
156. Society AC. Cancer facts & figures: The Society; 2008.
157. Organization WH. World Health Organization Statistical Information System (WHOSIS). Accessed August 2008; 4.
158. Wormann SM, Algul H. Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Front Oncol* 2013; 3:282.
159. Masiak-Segit W, Rawicz-Pruszyński K, Skorzewska M, Polkowski WP. Surgical treatment of pancreatic cancer. *Pol Przegl Chir* 2018; 90:45-53.
160. Lee HS, Park SW. Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. *Gut Liver* 2016; 10:340-7.
161. Landman A, Feetham L, Stuckey D. Working together to reduce the burden of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2020; 21:334-5.
162. Balachandran VP, Beatty GL, Dougan SK. Broadening the Impact of Immunotherapy to Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities. *Gastroenterology* 2019; 156:2056-72.
163. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-6.
164. Zhou Z, Li M. Pancreatic Cancer: Targeted Therapy Holds the Promise. *EBioMedicine* 2022; 75:103755.
165. O'Reilly EM, Oh D-Y, Dhani N, Renouf DJ, Lee MA, Sun W, et al. Durvalumab with or without tremelimumab for patients with metastatic pancreatic ductal

- adenocarcinoma: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA oncology* 2019; 5:1431-8.
166. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
167. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893-917.
168. Mukaisho K, Nakayama T, Hagiwara T, Hattori T, Sugihara H. Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: interactions among pH, *Helicobacter pylori*, and bile acids. *Front Microbiol* 2015; 6:412.
169. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* 2016; 4:e609-16.
170. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T, et al. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: A population-based modelling study. *EClinicalMedicine* 2022; 47:101404.
171. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet* 2020; 396:635-48.
172. Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390:2461-71.
173. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014; 383:31-9.
174. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:1224-35.
175. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 2020; 38:1-10.
176. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol* 2020; 21:1353-65.
177. Janjigian YY, Kawazoe A, Yanez P, Li N, Lonardi S, Kolesnik O, et al. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer. *Nature* 2021; 600:727-30.
178. Maurer S. Expression, Freisetzung und therapeutische Modulation von NKG2D-Liganden bei metastasierenden Tumorzellen: Konsequenzen für die NK-Zell-Reaktivität. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2018.
179. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008; 111:981-6.
180. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531-9.
181. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Gøerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317:1767-70.

182. Clar KL. Die Rolle von RANK und seinem Liganden bei Immunevasion und Chemotherapie-Resistenz von Tumorzellen. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2022.
183. Grozovsky R, Hoffmeister KM, Falet H. Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin Hematol* 2010; 17:585-9.
184. Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang* 2010; 99:112-22.
185. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 2004; 25:489-95.
186. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:663-8.
187. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:123-34.
188. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:610-8.
189. Hinterleitner C, Zhou Y, Tandler C, Heitmann JS, Kropp KN, Hinterleitner M, et al. Platelet-Expressed TNFRSF13B (TACI) Predicts Breast Cancer Progression. *Front Oncol* 2021; 11:642170.
190. Erpenbeck L, Schon MP. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 2010; 115:3427-36.
191. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003; 19:9-19.
192. Elzey BD, Grant JF, Sinn HW, Nieswandt B, Waldschmidt TJ, Ratliff TL. Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol* 2005; 78:80-4.
193. Saris A, Steuten J, Schrijver DP, van Schijndel G, Zwaginga JJ, van Ham SM, et al. Inhibition of Dendritic Cell Activation and Modulation of T Cell Polarization by the Platelet Secretome. *Front Immunol* 2021; 12:631285.
194. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, Clipstone N, et al. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 2003; 197:1689-99.
195. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 2000; 165:4773-7.
196. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002; 195:1129-43.
197. Rachidi S, Metelli A, Riesenber B, Wu BX, Nelson MH, Wallace C, et al. Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGFbeta axis. *Sci Immunol* 2017; 2.
198. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271:1734-6.
199. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood* 2016; 127:3312-20.
200. Myers RM, Li Y, Barz Leahy A, Barrett DM, Teachey DT, Callahan C, et al. Humanized CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in CAR-Naive and CAR-Exposed Children and Young Adults With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 2021; 39:3044-55.

201. Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2017; 376:836-47.
202. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16:372-85.
203. Singh A, Dees S, Grewal IS. Overcoming the challenges associated with CD3+ T-cell redirection in cancer. *Br J Cancer* 2021; 124:1037-48.
204. Guha P, Heatherton KR, O'Connell KP, Alexander IS, Katz SC. Assessing the Future of Solid Tumor Immunotherapy. *Biomedicines* 2022; 10.
205. Mehta NK, Pfluegler M, Meetze K, Li B, Sindel I, Vogt F, et al. A novel IgG-based FLT3xCD3 bispecific antibody for the treatment of AML and B-ALL. *J Immunother Cancer* 2022; 10.
206. Zekri L, Vogt F, Osburg L, Muller S, Kauer J, Manz T, et al. An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med* 2021; 13:e11902.
207. Heitmann JS, Walz JS, Pflugler M, Kauer J, Schlenk RF, Jung G, et al. Protocol of a prospective, multicentre phase I study to evaluate the safety, tolerability and preliminary efficacy of the bispecific PSMAxCD3 antibody CC-1 in patients with castration-resistant prostate carcinoma. *BMJ Open* 2020; 10:e039639.
208. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* 2020; 159:335-49 e15.
209. Leblanc R, Peyruchaud O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood* 2016; 128:24-31.
210. Lutz MS, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Marklin M, Zekri L, et al. Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies. *J Immunother Cancer* 2022; 10.
211. Bortoletto N, Scotet E, Myamoto Y, D'Oro U, Lanzavecchia A. Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells. *Eur J Immunol* 2002; 32:3102-7.
212. Haber L, Olson K, Kelly MP, Crawford A, DiLillo DJ, Tavare R, et al. Generation of T-cell-redirecting bispecific antibodies with differentiated profiles of cytokine release and biodistribution by CD3 affinity tuning. *Sci Rep* 2021; 11:14397.
213. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 2006; 211:214-24.
214. Ando M, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol Med* 2020; 43:1-9.
215. Placke T, Salih HR, Kopp HG. GITR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J Immunol* 2012; 189:154-60.
216. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009; 69:7775-83.
217. Danese S, de la Motte C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol* 2004; 172:2011-5.
218. Marklin M, Hagelstein I, Koerner SP, Rothfelder K, Pfluegler MS, Schumacher A, et al. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer* 2019; 7:143.
219. Metelli A, Wu BX, Riesenberger B, Guglietta S, Huck JD, Mills C, et al. Thrombin contributes to cancer immune evasion via proteolysis of platelet-bound GARP to activate LTGF-beta. *Sci Transl Med* 2020; 12.

220. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9:16-32.
221. Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs* 2010; 70:1445-76.
222. Pishvaian M, Morse MA, McDevitt J, Norton JD, Ren S, Robbie GJ, et al. Phase 1 Dose Escalation Study of MEDI-565, a Bispecific T-Cell Engager that Targets Human Carcinoembryonic Antigen, in Patients With Advanced Gastrointestinal Adenocarcinomas. *Clin Colorectal Cancer* 2016; 15:345-51.
223. Kebenko M, Goebeler ME, Wolf M, Hasenburg A, Seggewiss-Bernhardt R, Ritter B, et al. A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE(R)) antibody construct, in patients with refractory solid tumors. *Oncoimmunology* 2018; 7:e1450710.
224. Morris ZS, Guy EI, Francis DM, Gressett MM, Werner LR, Carmichael LL, et al. In Situ Tumor Vaccination by Combining Local Radiation and Tumor-Specific Antibody or Immunocytokine Treatments. *Cancer Res* 2016; 76:3929-41.
225. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hammerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002; 62:1462-70.
226. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:19458-63.
227. Li Y, Cai Q, Shen X, Chen X, Guan Z. Overexpression of B7-H3 Is Associated With Poor Prognosis in Laryngeal Cancer. *Front Oncol* 2021; 11:759528.
228. Inamura K, Takazawa Y, Inoue Y, Yokouchi Y, Kobayashi M, Saiura A, et al. Tumor B7-H3 (CD276) Expression and Survival in Pancreatic Cancer. *J Clin Med* 2018; 7.
229. Bin Z, Guangbo Z, Yan G, Huan Z, Desheng L, Xueguang Z. Overexpression of B7-H3 in CD133+ colorectal cancer cells is associated with cancer progression and survival in human patients. *J Surg Res* 2014; 188:396-403.
230. Liu Z, Zhang W, Phillips JB, Arora R, McClellan S, Li J, et al. Immunoregulatory protein B7-H3 regulates cancer stem cell enrichment and drug resistance through MVP-mediated MEK activation. *Oncogene* 2019; 38:88-102.
231. Zhang Y, He L, Sadagopan A, Ma T, Dotti G, Wang Y, et al. Targeting Radiation-Resistant Prostate Cancer Stem Cells by B7-H3 CAR T Cells. *Mol Cancer Ther* 2021; 20:577-88.
232. Wang R, Ma Y, Zhan S, Zhang G, Cao L, Zhang X, et al. B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF-kappaB pathway to induce VEGFA expression. *Cell Death Dis* 2020; 11:55.
233. Xie C, Liu D, Chen Q, Yang C, Wang B, Wu H. Soluble B7-H3 promotes the invasion and metastasis of pancreatic carcinoma cells through the TLR4/NF-kappaB pathway. *Sci Rep* 2016; 6:27528.
234. Kang FB, Wang L, Jia HC, Li D, Li HJ, Zhang YG, et al. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int* 2015; 15:45.
235. Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10277-8.
236. Brustmann H, Igaz M, Eder C, Brunner A. Epithelial and tumor-associated endothelial expression of B7-H3 in cervical carcinoma: relation with CD8+ intraepithelial lymphocytes, FIGO stage, and phosphohistone H3 (PHH3) reactivity. *Int J Gynecol Pathol* 2015; 34:187-95.

237. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5:166.
238. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007; 11:539-54.
239. Ingebrigtsen VA, Boye K, Tekle C, Nesland JM, Flatmark K, Fodstad O. B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer* 2012; 131:2528-36.
240. Zhang T, Jin Y, Jiang X, Li L, Qi X, Mao Y, et al. Clinical and Prognostic Relevance of B7-H3 and Indicators of Glucose Metabolism in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2020; 10:546110.
241. Zhang C, Wang Z, Yang Z, Wang M, Li S, Li Y, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA(+) Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther* 2017; 25:1248-58.
242. Feng K, Guo Y, Dai H, Wang Y, Li X, Jia H, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci China Life Sci* 2016; 59:468-79.
243. Bluemel C, Hausmann S, Fluhr P, Sriskandarajah M, Stallcup WB, Baeuerle PA, et al. Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59:1197-209.
244. Durben M, Schmiedel D, Hofmann M, Vogt F, Nubling T, Pyz E, et al. Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia. *Mol Ther* 2015; 23:648-55.
245. Staflin K, Zuch de Zafra CL, Schutt LK, Clark V, Zhong F, Hristopoulos M, et al. Target arm affinities determine preclinical efficacy and safety of anti-HER2/CD3 bispecific antibody. *JCI Insight* 2020; 5.
246. Dang K, Castello G, Clarke SC, Li Y, Balasubramani A, Boudreau A, et al. Attenuating CD3 affinity in a PSMAxCD3 bispecific antibody enables killing of prostate tumor cells with reduced cytokine release. *J Immunother Cancer* 2021; 9.
247. Trinklein ND, Pham D, Schellenberger U, Buelow B, Boudreau A, Choudhry P, et al. Efficient tumor killing and minimal cytokine release with novel T-cell agonist bispecific antibodies. *MAbs* 2019; 11:639-52.
248. Al-Aghbar MA, Jainarayanan AK, Dustin ML, Roffler SR. The interplay between membrane topology and mechanical forces in regulating T cell receptor activity. *Commun Biol* 2022; 5:40.
249. Mandikian D, Takahashi N, Lo AA, Li J, Eastham-Anderson J, Slaga D, et al. Relative Target Affinities of T-Cell-Dependent Bispecific Antibodies Determine Biodistribution in a Solid Tumor Mouse Model. *Mol Cancer Ther* 2018; 17:776-85.
250. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359:378-90.
251. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2018; 391:1163-73.
252. Pavlakis N, Sjoquist KM, Martin AJ, Tsobanis E, Yip S, Kang YK, et al. Regorafenib for the Treatment of Advanced Gastric Cancer (INTEGRATE): A Multinational Placebo-Controlled Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34:2728-35.
253. Shlomain A, Leshno M, Goldstein DA. Regorafenib treatment for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib-A cost-effectiveness analysis. *PLoS One* 2018; 13:e0207132.
254. Fuchs CS, Shitara K, Di Bartolomeo M, Lonardi S, Al-Batran SE, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab with cisplatin and fluoropyrimidine as first-line therapy in patients

- with metastatic gastric or junctional adenocarcinoma (RAINFALL): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20:420-35.
255. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376:687-97.
256. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol* 2018; 4:e180013.
257. Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, et al. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. *Hepatology* 2016; 64:2038-46.
258. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 2001; 305:989-1010.
259. Picarda E, Ohaegbulam KC, Zang X. Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22:3425-31.
260. Ling V, Wu PW, Spaulding V, Kieleczawa J, Luxenberg D, Carreno BM, et al. Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* 2003; 82:365-77.
261. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
262. Jenkins L, Jungwirth U, Avgustinova A, Irvani M, Mills A, Haider S, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Suppress CD8+ T-cell Infiltration and Confer Resistance to Immune-Checkpoint Blockade. *Cancer Res* 2022; 82:2904-17.
263. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol* 2013; 190:3783-97.
264. Placke T, Kopp HG, Salih HR. Modulation of natural killer cell anti-tumor reactivity by platelets. *J Innate Immun* 2011; 3:374-82.
265. Clar KL, Hinterleitner C, Schneider P, Salih HR, Maurer S. Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL. *Cancers (Basel)* 2019; 11.
266. Danese S, de la MC, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J. Immunol* 2004; 172:2011-5.
267. Brand A, Allen, L., Altman, M., Hlava, M. and Scott, J. Beyond authorship: attribution, contribution, collaboration, and credit. *Learned Publishing* 2015; 28:151-5.

8 Eigene Publikationen

Schmied BJ*, **Lutz MS***, Riegg F, Zekri L, Heitmann JS, Bühring HJ, Jung G, Salih HR. Induction of NK Cell Reactivity against B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-Optimized FLT3 Antibody. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 6;11(12):1966. doi: 10.3390/cancers11121966. PMID: 31817795; PMCID: PMC6966676. *equal contribution

Riegg F, **Lutz MS**, Schmied BJ, Heitmann JS, Queudeville M, Lang P, Jung G, Salih HR, Märklin M. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of NK Cell Reactivity against B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 1;13(7):1632. doi: 10.3390/cancers13071632. PMID: 33915811; PMCID: PMC8036612.

Hagelstein I*, **Lutz MS***, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, Clar KL, Kopp HG, Jung G, Salih HR, Märklin M, Hinterleitner C. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front Immunol*. 2021 Apr 14;12:653081. doi: 10.3389/fimmu.2021.653081. PMID: 33936075; PMCID: PMC8079770. *equal contribution

Hinterleitner C, Strähle J, Malenke E, Hinterleitner M, Henning M, Seehawer M, Bilich T, Heitmann J, **Lutz M**, Mattern S, Scheuermann S, Horger M, Maurer S, Walz J, Fend F, Handgretinger R, Seitz C, Weigelin B, Singer S, Salih H, Borst O, Kopp HG, Zender L. Platelet PD-L1 reflects collective intratumoral PD-L1 expression and predicts immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1):7005. doi: 10.1038/s41467-021-27303-7. PMID: 34853305.

Aschmoneit N, Kocher K, Siegemund M, **Lutz MS**, Kühl L, Seifert O, Kontermann RE. Fc-based Duokines: dual-acting costimulatory molecules comprising TNFSF ligands in the single-chain format fused to a heterodimerizing Fc (scDk-Fc). *Oncoimmunology*. 2022 Jan 20;11(1):2028961. doi: 10.1080/2162402X.2022.2028961. PMID: 35083097; PMCID: PMC8786347.

Lutz MS, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Märklin M, Zekri L, Jung G, Salih HR, Hinterleitner C. Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;10:e003655. doi: 10.1136/jitc-2021-003655.

Rittig SM, **Lutz MS**, Clar KL, Zhou Y, Kropp KN, Koch a, Hartkopf AD, Hinterleitner M, Zender L, Salih HR, Maurer S, Hinterleitner C. Controversial Role of the Immune Checkpoint OX40L Expression on Platelets in Breast Cancer Progression. *Frontiers in Oncology*. 2022;12. doi: 10.3389/fonc.2022.917834.

Zekri L, **Lutz M**, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A, Pfluegler M, Heitmann JS, Jung G, Salih HR. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. *Mol Ther*. 2023. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.02.010.

Lutz MS, Zekri L, Weßling L, Berchtold S, Heitmann JS, Lauer UM, Jung G, Salih HR. IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer. *Front Immunol*. 2023 Apr 14;14:1163136. doi: 10.3389/fimmu.2023.1163136. PMID: 37122707; PMCID: PMC10140336.

9 Eigenanteil

Die Arbeiten, die zu den drei Publikationen in dieser Doktorarbeit geführt haben, wurden nicht bzw. nicht ausschließlich von mir selbst durchgeführt. Die Beiträge von mir und den anderen Autoren sind im Folgenden gemäß den CRediT-Beitragstaxonomierichtlinien aufgeführt.²⁶⁷

Lutz MS, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Märklin M, Zekri L, Jung G, Salih HR, Hinterleitner C. Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2022;10:e003655. doi: 10.1136/jitc-2021-003655.

Konzeptualisierung: Hinterleitner C, Lutz MS, Salih HR

Projektleitung: Lutz MS, Hinterleitner C

Supervision: Hinterleitner C, Salih HR

Methodologie: Lutz MS, Hinterleitner C

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Lutz MS, Hinterleitner C

Formelle Analyse: Lutz MS, Hinterleitner C, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Märklin M, Zekri L

Validierung: Lutz MS, Hinterleitner C, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Märklin M, Zekri L

Datenkuratierung: Lutz MS, Hinterleitner C

Visualisierung: Lutz MS, Hinterleitner C

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Lutz MS, Klimovich B, Märklin M, Hinterleitner C

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR

Ressourcen: Salih HR, Jung G, Zekri L

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

Zekri L, **Lutz M**, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A, Pfluegler M, Heitmann JS, Jung G, Salih HR. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. Mol Ther. 2023. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.02.010.

Konzeptualisierung: Jung G, Salih HR, Zekri L

Projektleitung: Zekri L, Jung G, Salih HR

Supervision: Jung G, Salih HR

Methodologie: Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A

Formelle Analyse: Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A

Validierung: Zekri L, Pfluegler M, Heitmann J, Salih HR, Jung G

Datenkuratierung: Zekri L, Pfluegler M

Visualisierung: Zekri L

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Zekri L

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR, Jung G

Ressourcen: Salih HR, Jung G, Zekri L

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

Lutz MS, Zekri L, Weßling L, Berchtold S, Heitmann JS, Lauer UM, Jung G, Salih HR. IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer. *Front Immunol.* 2023 Apr 14;14:1163136. doi: 10.3389/fimmu.2023.1163136. PMID: 37122707; PMCID: PMC10140336.

Konzeptualisierung: Salih HR, Jung G, Lutz MS

Projektleitung: Lutz MS, Salih HR

Supervision: Salih HR

Methodologie: Lutz MS, Zekri L, Berchtold S

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Lutz MS, Weßling L

Formelle Analyse: Lutz MS

Validierung: Lutz MS, Salih HR

Datenkuratierung: Lutz MS

Visualisierung: Lutz MS

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Lutz MS

Schreiben – Revision und Editieren: Salih HR

Ressourcen: Salih HR, Jung G, Zekri L, Berchtold S, Lauer UM

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Helmut R. Salih für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die Unterstützung und intensive Betreuung während der letzten Jahren. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft und ihre Motivation, die Behandlung von Tumorpatienten stetig zu verbessern, sind mir ein großes Vorbild.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Doktorarbeit und das Ausüben der Gutachtertätigkeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus dem Labor Salih bedanken. Vielen Dank für die vielen schönen Momente innerhalb und außerhalb des Labors, die Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit. Ein weiterer Dank geht an die ehemalige AG Jung und insbesondere an Prof. Dr. Gundram Jung und Latifa Zekri für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Ebenfalls danken möchte ich Clemens Hinterleitner. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und dass du mich mit deiner Begeisterung und Kreativität stets motiviert und inspiriert hast.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, die mich schon seit vielen Jahren begleiten und auch angespannte Zeiten ein Stück leichter machen.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie. Danke an meine Eltern und meinen Bruder; Ihr habt mich immer begleitet, unterstützt und darin bestärkt meinen eigenen Weg einzuschlagen. Ein großer Dank gilt auch meinem Freund Matthis; danke für deine liebevolle Unterstützung in den letzten Jahren, ohne die das alles um einiges mühsamer gewesen wäre. Von Herzen danke!

11 Anhang

Publikation 1 (20 Seiten):

Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, Hagelstein I, Engel M, Chashchina A, Pfluegler M, Heitmann JS, Jung G, Salih HR. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. *Mol Ther*. 2023. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.02.010.

Publikation 2 (18 Seiten):

Lutz MS, Zekri L, Weßling L, Berchtold S, Heitmann JS, Lauer UM, Jung G, Salih HR. IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer. *Front Immunol*. 2023 Apr 14;14:1163136. doi: 10.3389/fimmu.2023.1163136. PMID: 37122707; PMCID: PMC10140336.

Publikation 3 (11 Seiten):

Lutz MS, Klimovich B, Maurer S, Heitmann JS, Märklin M, Zekri L, Jung G, Salih HR, Hinterleitner C. Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;10:e003655. doi: 10.1136/jitc-2021-003655.

An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers

Latifa Zekri,^{1,2,3,4} Martina Lutz,^{1,2,4} Nisha Prakash,^{1,2,3,4} Timo Manz,^{3,4} Boris Klimovich,^{1,2,4} Stefanie Mueller,^{1,2,4} Sebastian Hoerner,^{1,2,3,4} Ilona Hagelstein,^{1,2,4} Monika Engel,^{1,2,3,4} Anna Chashchina,^{1,2,4} Martin Pfluegler,^{1,2,4} Jonas S. Heitmann,^{1,2,4} Gundram Jung,^{2,3,4,5} and Helmut R. Salih^{1,2,4,5}

¹Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, Department of Internal Medicine, University Hospital Tuebingen, Tuebingen 72076, Germany; ²Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) “Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies”, University of Tuebingen, Tuebingen 72076, Germany; ³Department of Immunology, Institute for Cell Biology, Eberhard Karls University, Tuebingen, Germany; ⁴DKFZ Partner Site Tuebingen, German Cancer Consortium (DKTK), Tuebingen 72076, Germany

T cell-based immunotherapy has revolutionized oncological treatment. However, many patients do not respond to treatment, and long-term remissions remain rare, particularly in gastrointestinal cancers like colorectal cancer (CRC). B7-H3 is overexpressed in multiple cancer entities including CRC on both tumor cells and tumor vasculature, the latter facilitating influx of effector cells into the tumor site upon therapeutic targeting. We generated a panel of T cell-recruiting B7-H3xCD3 bispecific antibodies (bsAbs) and show that targeting a membrane-proximal B7-H3 epitope allows for a 100-fold reduction of CD3 affinity. *In vitro*, our lead compound CC-3 showed superior tumor cell killing, T cell activation, proliferation, and memory formation, whereas undesired cytokine release was reduced. *In vivo*, CC-3 mediated potent antitumor activity in three independent models using immunocompromised mice adoptively transferred with human effector cells with regard to prevention of lung metastasis and flank tumor growth as well as elimination of large established tumors. Thus, fine-tuning of both target and CD3 affinities as well as binding epitopes allowed for the generation of a B7-H3xCD3 bsAbs with promising therapeutic activity. CC-3 is presently undergoing good manufacturing practice (GMP) production to enable evaluation in a clinical “first-in-human” study in CRC.

INTRODUCTION

In the last decade, approaches to mobilize T cells against cancer have achieved remarkable success: besides strategies to reinforce activity of antigen-specific T cells, e.g., using immune checkpoint inhibition (ICI), approaches to redirect T cells in a major histocompatibility complex (MHC)-independent manner have also recently revolutionized cancer treatment.^{1–4} The latter comprise bispecific antibodies (bsAbs), which stimulate the T cell receptor/CD3 complex with their effector part after binding to their target antigen on tumor cells^{2,5} and the functionally closely related chimeric antigen receptor T (CAR T) cells.⁶ Such T cells transduced with chimeric receptors containing

an Ab part targeting CD19 are highly effective in lymphoid malignancies.^{6,7} The same holds true for bsAbs, which stimulate the T cell receptor/CD3 complex on T cells.^{1,2,8} However, all these mentioned approaches are associated with profound side effects due to off-target activation of T cells, and success of bsAbs and CAR T cells is so far limited to hematological malignancies, whereas treatment of solid tumors remains challenging.^{9,10} This particularly holds true for metastatic colorectal cancer (CRC) with its 5-year overall survival rate of approximately 20%,¹¹ where except for the small patient cohort with microsatellite instability that benefit from ICI, available immunotherapeutic strategies are of limited efficiency.^{12–15} A major prerequisite for successful treatment with MHC-independent T cell mobilizing strategies is the identification of suitable target antigens. Recently, the immunoglobulin (Ig) superfamily member B7-H3 has attracted considerable interest due to its rather specific expression on a wide array of cancer cells and notably also on the microenvironment/vessels in a variety of malignancies including CRC.^{16,17} Targeting tumor vessels promises improved access of immune effector cells to solid tumors, thereby potentially overcoming a major obstacle for T cell-based immunotherapy. Based on this rationale and on extensive previous work including the development of prostate-specific membrane antigen PSMAxCD3 and FLT3xCD3 bsAbs until the stage of clinical evaluation, we intended to develop an optimized B7-H3xCD3 bsAb in our previously introduced IgGsc format^{18–20} (ClinicalTrials.gov: NCT04104607, NCT04496674, and NCT05143996). To this end, we generated a panel of Abs directed to different epitopes of the B7-H3 molecule and constructed various bsAbs that differ in B7-H3- as well as CD3-binding properties. We here report on the selection and

Received 6 October 2022; accepted 9 February 2023;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.010>

⁵These authors contributed equally

Correspondence: Helmut R. Salih, MD, CCU Translational Immunology - German Cancer Consortium (DKTK), Department of Internal Medicine - University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany.

E-mail: helmut.salih@med.uni-tuebingen.de

preclinical characterization of an optimized bsAb, designated CC-3, which is presently undergoing GMP production to enable evaluation in a clinical “first-in-human” study in patients with CRC.

RESULTS

Generation and characterization of B7-H3 monoclonal Abs

From a panel of B7-H3 monoclonal Abs (mAbs) obtained using a conventional hybridization procedure described in the [materials and methods](#), four mAbs of IgG1k isotype were biochemically characterized ([Figures S1A and S1B](#)). Assessment of binding affinities by flow cytometry using two CRC and one prostate carcinoma cell line documents that clones 8H8, 11A7, and 8D9 bind to B7-H3 with high affinity and EC_{50} values in the subnanomolar range, whereas clone 7C4 displays an affinity that is more than an order of magnitude lower ([Figures 1A–1C](#)). Identification of the binding epitopes of the mAbs was facilitated by the fact that human and mouse B7-H3 protein sequences are highly similar, with only few amino acids differing ([Figure S1C](#)). ELISA using several mutants of a human B7-H3-Fc fusion protein in which one or two amino acids were replaced by the corresponding murine sequences ([Figure 1D](#)) documented that all mAbs bind different epitopes of the B7-H3 molecule ([Figure 1D](#)). Clone 7C4 binds an epitope in close proximity to the cell membrane, whereas the other clones 8H8, 11A7, and 8D9 bind to membrane-distal regions of the molecule ([Figure 1E](#)).

Generation and characterization of bsAbs with different binding properties to B7-H3 and CD3

As binding kinetics and recognized epitopes influence functionality, the variable domains of the different B7-H3 mAb clones were sequenced and cloned into the previously described IgGsc bsAb format.¹⁸ Binding analyses with B7-H3 expressing LNCaP cancer cells revealed that constructs containing the antigen binder 7C4 have profoundly lower affinity to target antigen than the three other bsAbs ([Figures S2 and S3](#)). Next, the constructs containing the variable domains of clones 7C4 and 8H8 (directed to membrane-proximal and -distant epitopes of the B7-H3 protein, respectively) were further compared. For construction of the CD3 part, we used either the single-chain (scCD3) sequence of humanized UCHT1 (CD3^{high}) that is contained in our PSMAXCD3 and FLT3xCD3 presently undergoing clinical evaluation^{18–20} or a UCHT1 sequence carrying four mutations in the CDR-H2 and one mutation in the FR-H3 to reduce affinity to CD3 (CD3^{low}) ([Figure 2A](#)). After biochemical characterization of the resulting four bsAbs ([Figures S2A and S2B](#)), we performed flow cytometric analysis, which revealed that both constructs containing 7C4 (regardless of the CD3 part) bound to B7-H3-expressing cancer cells with an approximately 4- to 10-fold lower affinity than the 8H8 containing bsAbs, and this was observed with cells displaying various B7-H3 expression levels ([Figures 2B, S2C, and S2D](#)). This is in line with the considerably slower K_a value observed with 7C4 versus the bsAbs containing other target binders, whereas K_d was less affected ([Figure 2C](#)). The constructs comprising the CD3^{high} variant of UCHT1 displayed an EC_{50} of approximately 30–60 nM, whereas binding of the CD3^{low} bsAbs was detected only at very high concentrations ([Figures 2B, S2E and S2F](#)). Analysis

by biolayer interferometry revealed that the binding affinity of CD3^{low} variants was attenuated by a factor of about 100 ([Figures 2E and 2F](#)).

Influence of B7-H3 affinity and binding site on bsAb function

To investigate whether and how binding affinity and/or binding site to B7-H3 affect the capacity of bsAb variants in stimulating T cells, we analyzed T cell activation using PBMCs co-cultured with B7-H3-expressing CRC cells. Flow cytometry revealed maximal stimulation of both CD4 and CD8 T cells with the two 7C4 containing bsAbs at concentrations of 40 pM, whereas 200 pM were required with the two 8H8-containing reagents to reach maximum activation. BsAbs with irrelevant target specificity (CTR_xCD3^{low} and CTR_xCD3^{high}) did not have any notable effect, confirming target-restricted activity of all constructs ([Figures 3A and S4A](#)). Similar observations were made when the cytolytic activity of T cells stimulated with the various constructs was analyzed using two different experimental settings, flow cytometric analysis after 3 days and a real-time cytolytic assay over a period of 5 days. In both settings, target cell lysis mediated by bsAbs comprising 7C4 was superior to that of 8H8-containing bsAbs, of which higher concentrations were required to achieve comparable T cell stimulation and tumor cell killing ([Figures 3B, 3C, S4B, and S4C](#)). Likewise, when T cell cytokine production and proliferation were evaluated by Legendplex assays and ³H-thymidine uptake as well as flow cytometry after 3 and 6 days, respectively, we observed that 8H8-containing constructs mediated profoundly less T cell stimulation compared with 7C4-containing bsAbs ([Figures 3D–3F and S4D–S4F](#)). In the latter assays the activity of the 8H8-containing constructs remained inferior even at high Ab concentrations. This particularly holds true for induction of proliferation over time ([Figures 3G–3I and S4G–S4I](#)). In summary, bsAb comprising 7C4 directed to a membrane-proximal B7-H3 epitope exhibited clearly superior activity despite their markedly lower binding affinity to B7-H3.

Influence of CD3 affinity within the different B7-H3xCD3 constructs

When we directly compared the functionality of the CD3^{high} and -^{low} bsAb variants, we unexpectedly found that, despite approximately 100-fold reduced CD3 affinity, only marginal differences were detectable comparing the two 7C4 containing bsAbs with regard to T cell activation, proliferation, and tumor cell killing. With the 8H8xCD3^{low} and -^{high} variants, a moderate difference regarding tumor cell killing was noted. Effects observed with the 7C4xCD3^{low} variant were superior to the activity of both the 8H8xCD3^{high} and -^{low} variants ([Figures 3B and S4B](#)). In contrast, substantially reduced cytokine induction was observed with both 7C4 and 8H8 CD3^{low} constructs compared with their CD3^{high} counterparts ([Figures 3D, 3E, and S3D](#)).

To further study the role of CD3 affinity, we generated and compared CD3^{high} and -^{low} variants of the bsAbs CC-1 directed to PSMA as an independent target antigen.¹⁸ In line with previously reported results,^{21,22} clearly less T cell activation and cytokine production was

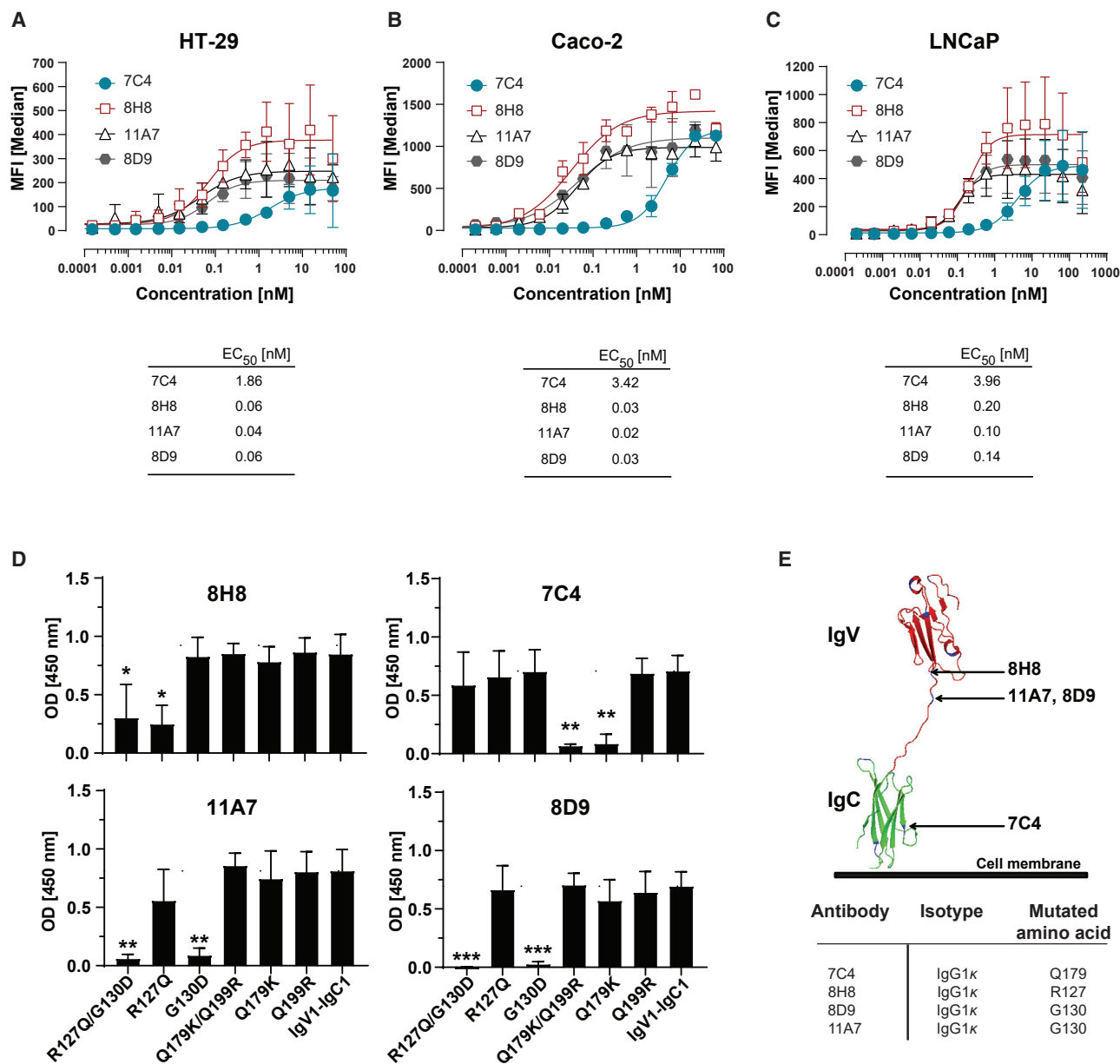


Figure 1. Characterization of the generated B7-H3 mAbs

(A–C) Binding of anti-B7-H3 mAbs to B7-H3 expressing HT-29 (A), Caco-2 (B), and LNCaP (C) cancer cells was assessed by flow cytometry. EC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism software. (D) Binding of B7-H3 mAbs to the indicated B7-H3 IgV1-IgC1-Fc fusion proteins was analyzed by ELISA. Data represent means ± standard deviation (SD) from 3 independent experiments. Statistical significance, compared with wild type, was calculated using an independent t test. (E) Summary of epitope mapping results obtained as in (D). The crystal structure of the murine B7-H3 antigen (PDB: 4I0K) is depicted, with arrows indicating binding sites of the respective mAbs. Isotypes of the generated mAbs and mutated amino acids within the B7-H3 molecule that are critical for binding are given in the table.

observed with the CD3^{low} variant, which failed completely to exert measurable tumor cell lysis (Figure S5). Thus, whereas we observed the expected effects of CD3 affinity attenuation upon targeting PSMA, our CD3-attenuated B7-H3 bsAbs containing the membrane-proximal binder 7C4 retain their potency with respect to T cell activation, proliferation, and tumor cell killing, while “unde-

sired” induction of cytokines associated with side effects upon clinical application is reduced.

Based on the results accumulated thus far, subsequent experiments were restricted to bsAbs containing the functionally superior B7-H3 binder 7C4, for which we next determined whether CD3 affinity

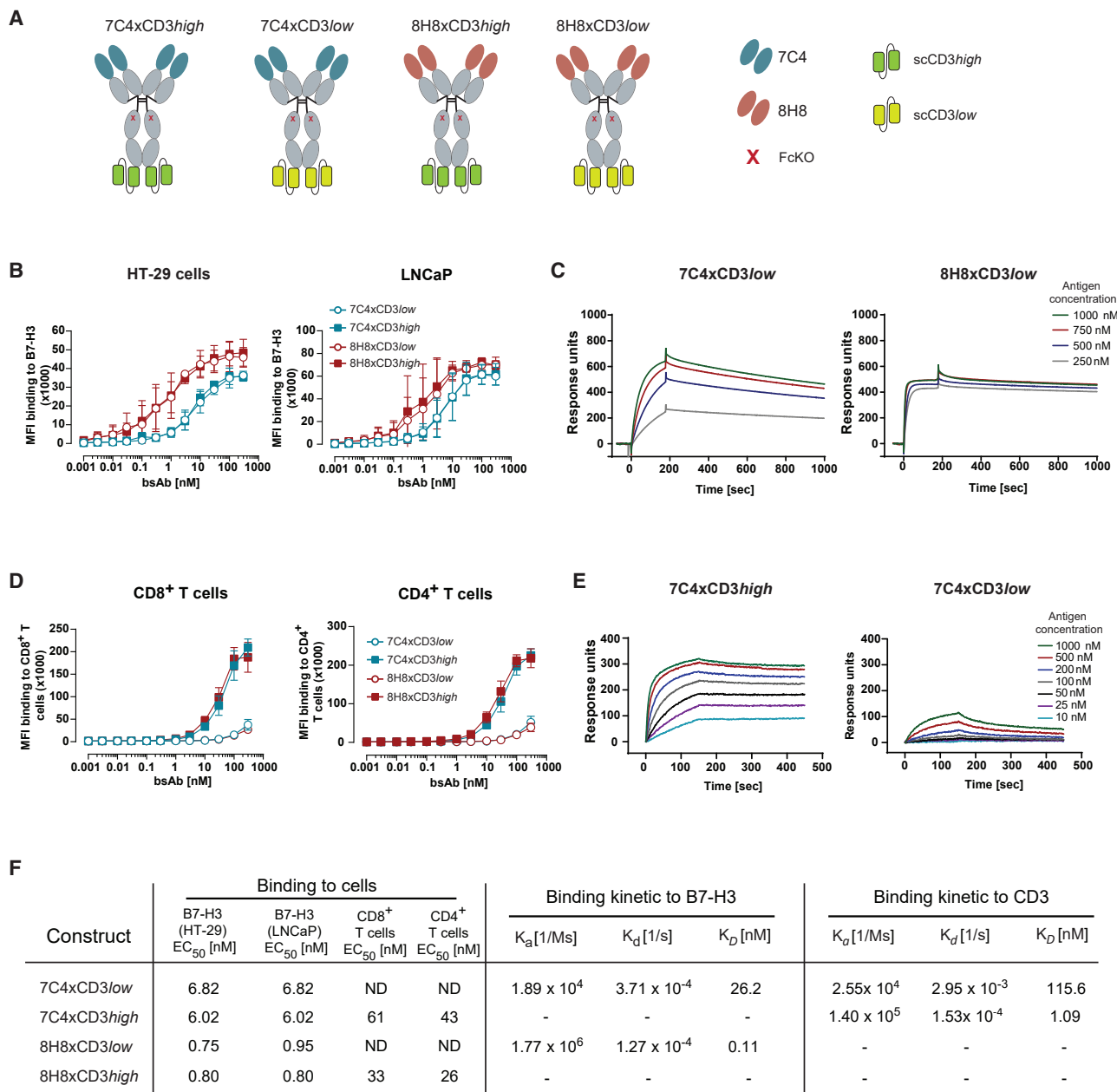
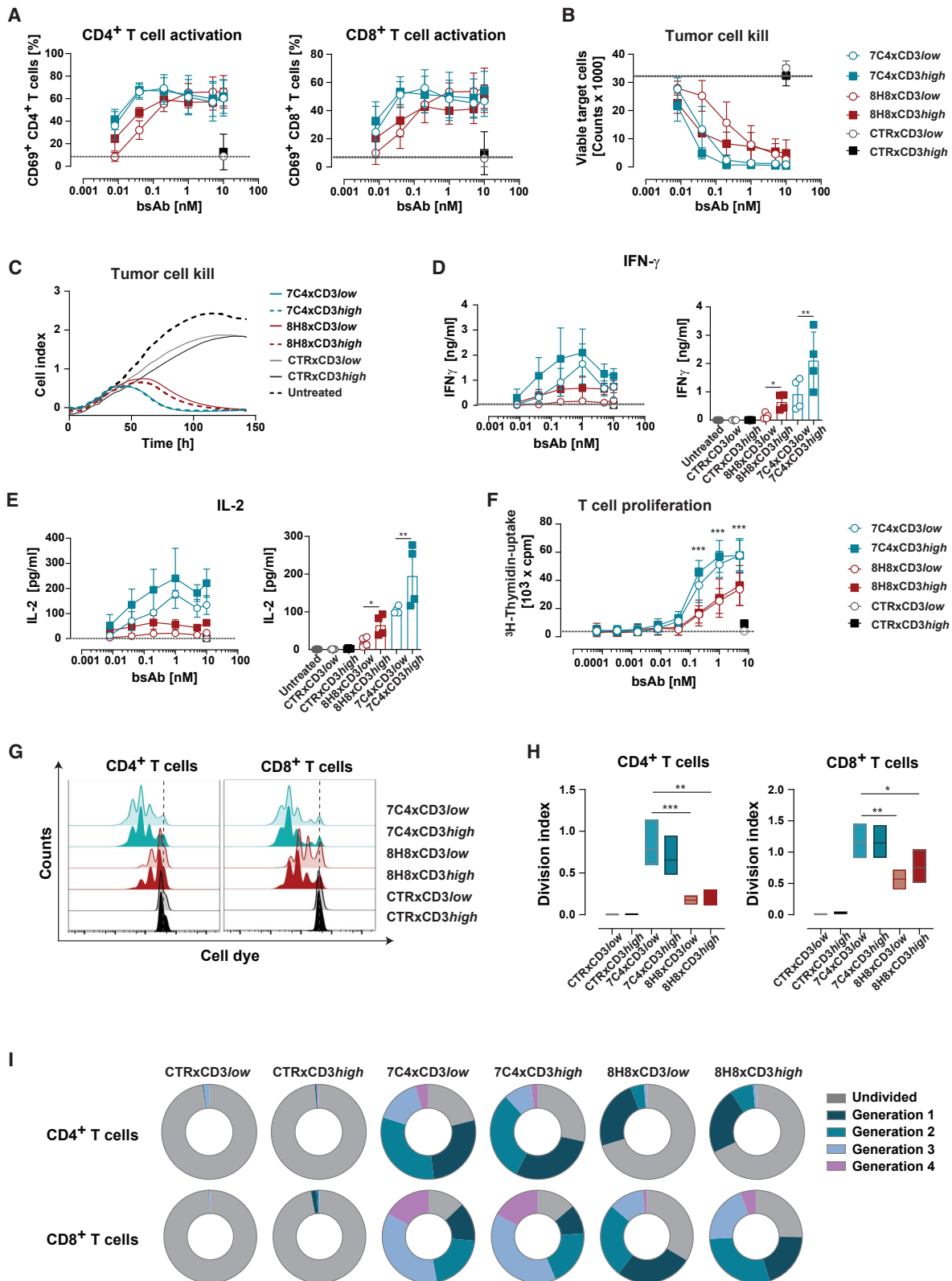


Figure 2. Development and characterization of B7-H3xCD3 bsAb constructs carrying distinct B7-H3 and CD3 moieties

(A) Schematic illustration of the panel of B7-H3xCD3 bsAbs used for further analysis. (B) Binding of the four B7-H3xCD3 bsAbs to B7-H3 expressing HT-29 and LNCaP cells as determined by flow cytometry. Data are shown as means \pm SD of two independent experiments. (C) SPR-Biacore sensorgrams determining binding of B7-H3 antigen to surface-captured B7-H3xCD3 bsAbs at 25°C and pH 7.4. (D) Binding of the indicated B7-H3xCD3 bsAbs to CD3-expressing CD8 and CD4 T cells within healthy donor PBMC preparations (n = 6) as assessed by flow cytometry. (E) Binding of the indicated B7-H3xCD3 bsAbs to a His-tagged CD3 epsilon-delta heterodimer as determined by biolayer interferometry (BLI) at 25°C and pH 7.4. (F) Summary of the EC₅₀ values based on binding results depicted in (B) and (D), as well as kinetic values corresponding to SPR (C) and BLI (E) measurements.

affected induction of memory T cells, the subset most relevant for therapeutic success.^{23,24} Both 7C4xCD3 bsAbs drove expansion of effector and central memory T cells. CD3 affinity did significantly influence expansion of the memory T cell subset, with the

CD3low bsAb (Figure 4) variant inducing significantly more effector and memory T cells. We thus selected 7C4xCD3low as lead compound (termed CC-3) for further development and *in vivo* evaluation.



(legend on next page)

***In vivo* evaluation of CC-3**

First, we analyzed pharmacokinetics, which confirmed the expected prolonged serum half-life of CC-3 in C57BL/6 mice (Figure 5A), comparable to that of its sister molecules CC-1 and CLN-049 in the same format.^{18,20} Application in immunocompromised NSG mice adoptively transferred with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) did not induce undesired off-target T cell activation in the absence of tumor targets as revealed by determination of interferon γ (IFN- γ) serum levels upon application of CC-3 and the parental UCHT1 Ab as positive control (Figure 5B).

We then evaluated the anti-tumor activity of CC-3 in three different NSG models using immunocompromised NSG mice adoptively transferred with human PBMCs.

In a lung metastasis model, HT-29 cells engineered with a luciferase reporter were injected intravenously (i.v.), followed by injection of PBMCs and, in the treatment group, CC-3 at days 1 and 4. Flow cytometric analyses of T cells and tumor cells in lungs after 8 days revealed a pronounced T cell activation with the reduction of lung metastasis in treated animals occurring in a dose-dependent manner (Figure 5C).

Next, efficacy was evaluated by analysis of flank tumor development after injection of HT-29 cells engineered with a luciferase reporter, with animals being left untreated or injected i.v. with CC-3. Tracking tumor growth by bioluminescence imaging over time revealed that CC-3 effectively prevented development of flank tumors, which grew unabated in untreated animals (Figure 5D).

Finally, we assessed efficacy of CC-3 animals bearing established B7-H3-expressing LNCaP tumors with a diameter of 5 mm. Mice treated with CC-3 experienced a pronounced tumor regression below the level of detection at the rather low dose of 2 μ g applied three times in weekly intervals together with human PBMCs (Figure 5E). Together, these data clearly document the desired long half-life, safety, and potent *in vivo* efficacy of CC-3, which warrants further development and evaluation in a clinical trial.

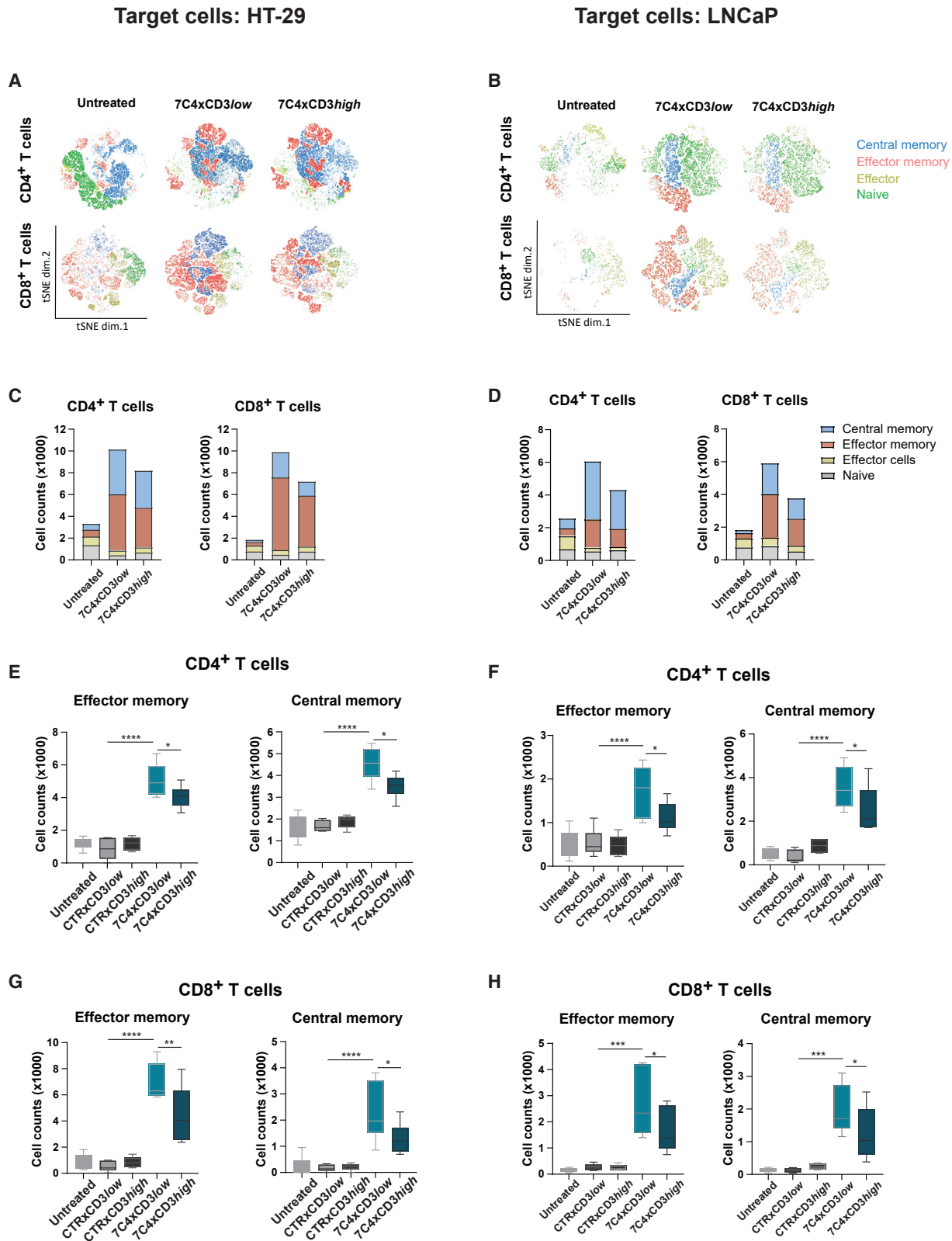
DISCUSSION

Despite the undisputed success of T cell-based immunotherapy, the presently available approaches suffer from several limitations when it comes to solid tumors. bsAbs and CAR T cells are functionally closely related, but in contrast to CAR T cells, bsAbs are “off-the-shelf drugs,” eliminating the laborious preparative work required for CAR T cell generation that results in high costs and delay of treatment for patients. Both approaches are so far only established in hematologic malignancies and are not effective in solid tumors. The reasons for these limitations are not yet fully understood, but limited access of immune effector cells to the tumor site appears to constitute a major hurdle.^{25,26} Thus, it seems critical to target not only the tumor cells themselves but also the microenvironment/neovasculature to induce a pro-inflammatory setting that ensures sufficient access of effector cells and subsequent tumor cell destruction. This reasoning is supported by reports demonstrating that T cells fail to eradicate tumors unless a pro-inflammatory microenvironment facilitates T cell extravasation.^{27,28} In current preclinical and early clinical approaches to develop CAR T cells and bsAbs for treatment of gastrointestinal (GI) cancer including CRC, EGFR, and carcinoembryonic antigen (CEA) are widely used target antigens.^{25,29,30} These antigens do not appear suitable for targeting both tumor cells and vessels as outlined above.

B7-H3 has attracted considerable interest due to its involvement in tumor cell metabolism, migration and invasion, angiogenesis, chemotherapy resistance, and endothelial-to-mesenchymal transition and expression on cancer-initiating cells.^{31–35} In addition, B7-H3 also modulates immune responses, but the so far available data on its exact functional role are, at least in part, conflicting.^{36–38} Originally, B7-H3 was identified as a costimulatory molecule enhancing the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the presence of an anti-CD3 Ab.³⁹ In line, introduction of B7-H3 in CRC-bearing mice resulted in suppression of tumor growth and reduction of secondary metastasis.⁴⁰ In contrast, several studies have shown that B7-H3 may rather mediate inhibitory effects in antitumor immunity, like inhibiting CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation and proliferation and reducing interleukin-2 (IL-2) and IFN- γ production, probably through suppression of signaling pathways mediated by nuclear factor κ B

Figure 3. Impact of differential B7-H3 binding and CD3 affinity on T cell stimulation

(A and B) HT-29 cells were cocultured with monocyte-depleted PBMCs in the presence of the indicated bsAbs at an E:T ratio 2:1. (A) Different concentrations of the indicated constructs were employed, and CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation was determined by flow cytometry. (B) Tumor cell depletion was determined after 3 days by flow cytometry. Mean values and SD of four independent measurements are indicated. Dotted lines represent baseline T cell activation (A) and tumor cell percentage in the presence of CTRxCD3 bsAbs (B). (C) Survival of HT-29 tumor cells in the presence of monocyte-depleted PBMCs and 0.2 nM of the indicated bsAbs was monitored over time using an xCELLigence system. (D and E) Levels of the indicated cytokines in culture medium of the experiments described in (A) and (B) were determined after 24 h of incubation by Legendplex multiplex assays (right panels). Left graphs represent cytokine measurements performed with 0.2 nM of the indicated bsAbs. Data are shown as means \pm SD calculated from four independent experiments. p values were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (F) Irradiated HT-29 cells and monocyte-depleted PBMCs were incubated with the indicated concentration of B7-H3 bsAbs for 3 days. T cell proliferation was assessed using ³H-thymidine incorporation assays. The dashed line represents baseline proliferation in the presence of control bsAb with irrelevant specificity. Data are shown as means \pm SD calculated from four independent experiments. p values were calculated using Wilcoxon test for each time point comparing 7C4xCD3/low with 8H8xCD3/low. (G–I) Monocyte-depleted PBMCs were labeled with CellTrace Violet dye and cocultured with HT-29 and 1 nM of the indicated bsAbs for 6 days. On day 3, HT-29 cells and bsAbs were renewed. Proliferation of CD8⁺/CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry on day 6. (G) Exemplary proliferation profiles. (H) The division index of proliferating T cells was calculated using FlowJo software. Results represent the mean values obtained with 4 PBMC donors. p values were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (I) Pie charts representing T cell mean counts for each division peak obtained in the experiment described in (G). Data are shown as means calculated from four independent experiments.



(legend on next page)

(NF- κ B) and activator protein-1.^{41,42} In addition, it has been shown that B7-H3 enables evasion from immune surveillance during initiation, development, and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma, suggesting that the suppressive immune microenvironment shaped by B7-H3 helps cancer cells avoid immune cell killing.⁴³ Based on its putatively overall immunosuppressive function and due to its broad but nevertheless rather tumor-specific expression on tumor cells and tumor vessels/microenvironment in a variety of different tumor entities, B7-H3 is considered an attractive target for Ab-based immunotherapy.^{16,17,44,45} The suitability of B7-H3 for targeting both tumor cells and vessels is supported by findings with anti-B7-H3 drug conjugates (ADCs), showing that targeting B7-H3 eradicates established tumors in mice only if armed with a drug that acts against both the tumor cells and the tumor vasculature.¹⁷

Against this background, we developed a panel of B7-H3 Abs that was extensively characterized using flow cytometry, binding kinetic and epitope mapping to guide selection of optimal tumor antigen binders in bsAbs. Two Abs (7C4 and 8H8) with distinct binding and kinetic properties were selected and used for construction of bsAbs. Extensive functional characterization revealed that bsAbs binding the distal B7-H3 epitope recognized by the 8H8 Ab were less potent despite their superior affinity for B7-H3 if compared with bsAbs containing 7C4 that binds to a membrane-proximal epitope. These findings confirm the meanwhile well-established notion that membrane proximity of the target epitope recognized by bsAbs is an important determinant for their function.^{46–48} In the case of the B7-H3-targeting bsAbs described here, it appears that membrane proximity of binding “outperforms” affinity regarding its influence on bsAb activity.

Besides membrane proximity and affinity of the targeting arm, efficacy and potency, but also safety, of bsAbs depend on CD3 affinity,^{22,48,49} and tuning CD3 affinity may allow to uncouple efficacy from cytokine release,^{50,51} at least to some extent. We unexpectedly found that lowering the binding affinity to CD3 by about 100-fold did not affect the efficacy of our 7C4-containing bsAbs but resulted in reduced cytokine induction. bsAbs containing 8H8 as B7-H3 binder were less resistant to CD3 affinity attenuation but more resistant if compared with bsAbs targeting PSMA, where the targeting Ab is directed to a distant epitope of the molecule.¹⁸ It is tempting to speculate that bsAbs recognizing “proximal target epitopes” are generally less sensitive to CD3 affinity attenuation than those directed to distal epitopes. In line with these considerations, Mandikian et al.⁵² and Staflin et al.,⁴⁸ upon characterizing the impact of CD3 and/or HER2 affinity of HER2xCD3 bsAbs, likewise reported that T cell binding affinity had little impact on antitumor activity.⁴⁸ This notion may have far-reaching implications since attenuated CD3 affinity,

among others, may reduce potentially dose-limiting side effects due to cytokine release upon clinical application, while antitumor activity may be preserved. On the other hand, induction of immunostimulatory cytokines may contribute to therapeutic efficacy, and further analyses in appropriate mouse models are needed to assess the extent to which immunoregulatory cytokines contribute to or are dispensable for bsAb efficacy in general and CC-3 in particular.

The growing interest in the B7-H3 molecule as a target for Ab-based immunotherapy is reflected by a number of clinical trials evaluating different B7-H3-directed compounds including Ab-drug conjugates (MGC018; DS7300a), Fc-optimized mAbs (MGA271, enoblituzumab; DS-5573a, clinical trial completed), radiolabeled mAbs (¹³¹I-8H9, ¹⁷⁷Lu-DPTA omburtamab), and also a bsAb (MGD009, ClinicalTrials.gov: NCT026285351).⁵³ Notably, clinical evaluation of the MGD009 bsAb was put on hold due to a transient elevation of liver enzymes in treated patients, in line with reports documenting low-level B7-H3 expression in healthy liver tissue,⁴⁵ but the trial restarted after safety evaluation (ClinicalTrials.gov: NCT02628535). MGD009 was constructed using the so-called dual affinity re-targeting (DART) format that consists of four variable domains expressed as single chains. Reportedly, bsAbs carrying many single chains tend to aggregate, resulting in off-target T-cell activation and cytokine release.⁵⁴ Detailed information on MGD009 is not available, and thus a direct comparison with CC-3 is not possible. Beyond liver tissue, limited expression of B7-H3 has also been observed by immunohistochemistry on endothelial cells in the GI tract, with the possibility of respective “on-target, off-tumor” toxicities that require careful monitoring upon clinical evaluation of CC-3, as do potential effects on immunity due to blocking B7-H3 function.

In any case, the preclinical data for our optimized bispecific B7-H3xCD3 Ab CC-3 described in this study provide a solid basis for further clinical development. Good manufacturing practice (GMP)-compliant production of CC-3 is presently ongoing to enable evaluation in a clinical “first-in-human” study in patients with CRC to be initiated in 2023.

MATERIALS AND METHODS

Hybridoma generation and epitope characterization

The anti-B7-H3 Abs were generated after immunization of BALB/c mice with recombinant 4IgB7-H3-Fc fusion protein containing Leu29-Thr461 (Q5ZPR3-2). Epitope mapping of anti-B7-H3 Abs was performed by ELISA. 1 μ g/mL different 2IgB7-H3-Fc (Leu29-Ser242) mutants was coated in 96-Well Half Area Microplates (Greiner Bio-One), before 10 μ g/mL primary Abs were added. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L)-specific Abs (Jackson

Figure 4. Proliferation and expansion of T cell subsets upon B7-H3xCD3 bsAb treatment

(A–D) Monocyte-depleted PBMCs were cocultured with HT-29 cells (A and C) and LNCaP cells (B and D) and 1 nM of the indicated bsAbs for 9 days. Tumor cells and bsAbs were renewed on days 3 and 6. CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets were defined by flow cytometry on day 9. Representative t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) plots (A and B) and bar graphs depicting pooled data (n = 6; C and D) are shown. (E–H) Effector and central memory cell counts obtained using the experimental setting described in (A)–(D). Data are shown as means \pm SD calculated from 6 independent PBMC donors. Statistical significance was calculated using one-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison test. *p < 0.05, ****p < 0.0001.

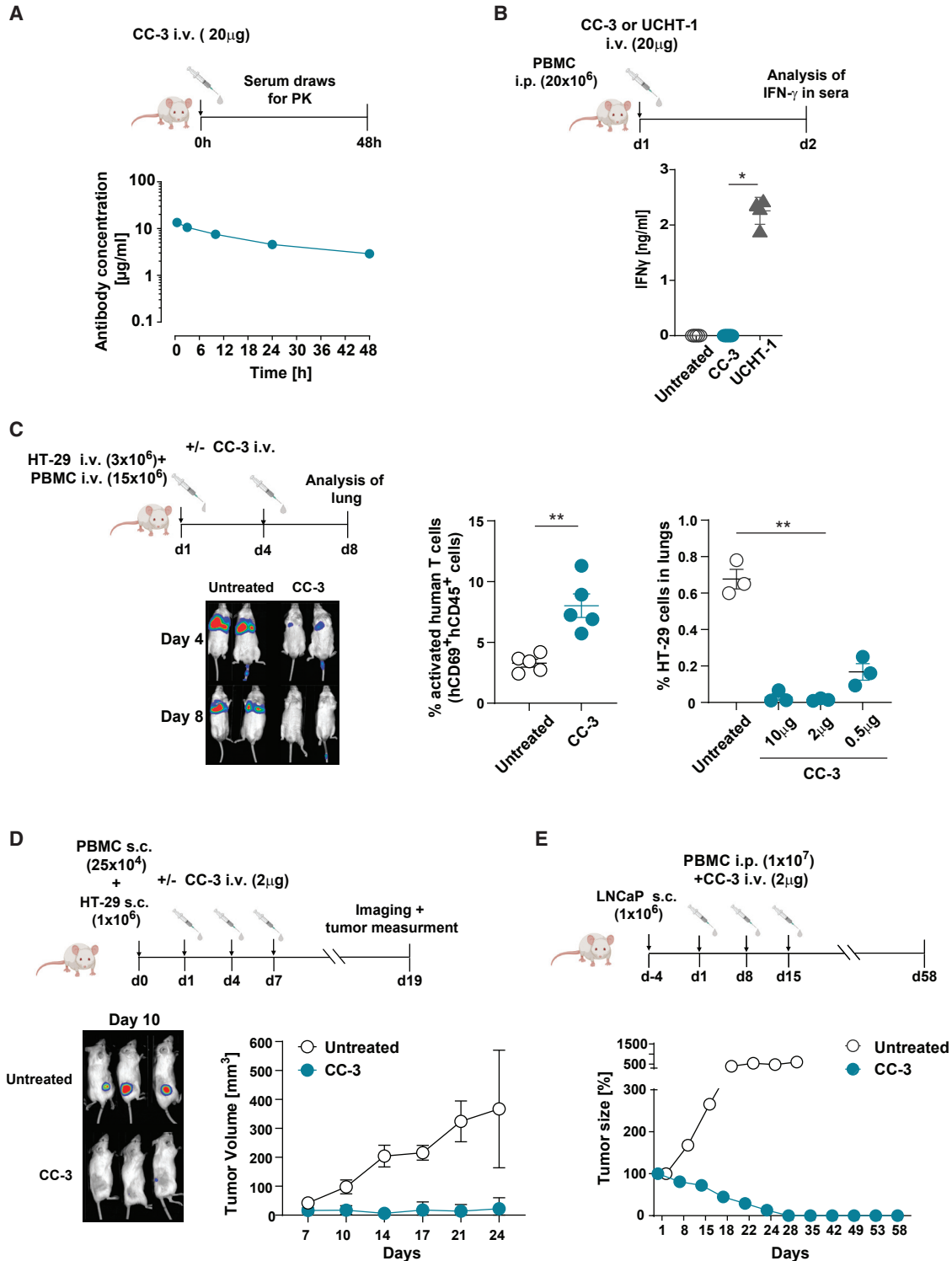


Figure 5. In vivo evaluation of the B7-H3xCD3 bsAb CC-3

(A) 20 µg CC-3 was injected i.v. into C57BL/6 mice, and serum concentrations were measured at the indicated time points after injection using T cell Activation Bioassay (Promega). Mean values and SDs obtained from groups of four animals per time point are indicated. (B) NSG mice (n = 4 per group) were injected with 20 × 10⁶ human PBMCs (i.p.) and 20 µg (i.v.) parental UCHT1 antibody (anti-CD3) or CC-3. After 24 h, IFN-γ levels in sera were determined by ELISA. (C) 3 × 10⁶ luciferase-expressing HT-29

(legend continued on next page)

ImmunoResearch) and TMB Peroxidase Substrate Kit (Milford) were used for detection. The optical density at 450 nm was determined using a Spectra Max 340 (Molecular Devices).

Generation, purification, and characterization of bsAbs

The variable domains of 7C4, 8H8, 11A7, 8D9, and MOPC-21 (used as a control Ab; GenBank: AAD15290.1 and AAA39002.1) were codon optimized for the transfection of CHO cells using the GeneArt GeneOptimizer tool (Thermo Fisher Scientific). Variable-heavy (V_H), variable-light (V_L), and scFv sequences were synthesized *de novo* at GeneArt (Thermo Fisher Scientific). The variable domains were inserted into a human Igy1 κ backbone-based IgGsc molecule with C-terminal scFvs.¹⁸ bsAbs were produced and purified as described previously.¹⁸ Endotoxin levels of samples as determined by a limulus amoebocyte lysate assay (Endosafe Charles River) were <0.5 EU/mL.

Kinetics

Surface plasmon resonance (SPR) experiments with recombinant, His-tagged B7-H3 produced by transfected CHO cells were performed using B7-H3 bsAbs immobilized to a sensor chip coated with Protein A (GE Healthcare). Binding was analyzed using a Biacore X instrument at 25°C at a flow rate of 30 μ L/min. Data evaluation was done using BIAevaluation_v.4.1 software.

Binding of bsAbs to CD3 was analyzed by biolayer interferometry on Octet HTX. Assays were run with a sensor offset of 3 mm and an acquisition rate of 5 Hz on HIS1k biosensors in 16-channel mode. Microplates were loaded with 60 μ L per well. Assay buffer composition was PBS with 0.05% Tween 20 and 0.1% BSA. Sensors were equilibrated in assay buffer for 10 min. Following a baseline step of 60 s, the analyte, a His-tagged CD3 epsilon-delta heterodimer protein (Acro Biosystems), was loaded at 20 μ g/mL for 120 s. Association was measured for 150 s and dissociation for 300 s. Regeneration of the sensors was performed using 10 mM glycine (pH 1.5). Data evaluation was done using Octet Analysis HT software.

Cells

Isolation of healthy donor PBMCs was carried out by density gradient centrifugation (Biochrom). A written informed consent, in accordance with the Helsinki protocol, was given in all cases. The study was conducted according to the guidelines of the local ethics committee. LNCaP, 22Rv1, HT-29, and Caco-2 cells were purchased from DSMZ and the Jurkat cell line from the American Type Culture Collection (ATCC). HT-29 cells transduced with luciferase reporter

gene were generated using lentiviral vector containing firefly luciferase under the control of EF1 promoter, and GFP-T2A-*pac* under the control of CMV promoter was synthesized by VectorBuilder. Viral particles were packaged in HEK293-T cells using psPAX2 and pMD2.G packaging plasmids (a gift from Didier Trono, Addgene). Lentiviral supernatants were collected 24–48 h after transfection and directly used for infection of HT-29 cells. After selection with 1 μ g/mL puromycin, cells were used for experiments. All cell lines were cultured as described previously¹⁸ for a maximum of 2 months. To validate cell authenticity, the respective immunophenotype provided by the supplier was examined. To exclude contamination of cultured cells with mycoplasma, cells were tested biweekly.

Binding assays and *in vitro* activity of bsAbs

For the detection of primary Ab binding, PE-conjugated donkey anti-human IgG or goat anti-mouse IgG reagents were used (Jackson ImmunoResearch). Flow cytometry was performed using the BD FACSCanto II and BD FACSCalibur systems (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo (Ashland, OR, USA). EC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism9 (GraphPad Software). T cell activation and target cell depletion were determined using flow cytometry-based assays. When indicated, monocyte-depleted PBMCs were prepared using the human CD14 MicroBeads UltraPure kit (Miltenyi Biotec). PBMCs were incubated with LNCaP or HT-29 cells at the indicated effector:target (E:T) ratio in the presence or absence of bsAbs. T cells were identified using fluorescent dye-conjugated Abs directed to CD4, CD8a; CD45RO, CD62L, and CD69 (BioLegend), CD45 (BD Biosciences), and the target cells were identified using anti-EpCam (BioLegend) Ab. Absolute cell numbers were calculated using equal numbers of BD CompBead (BD Biosciences). Dead cells were excluded from analysis using 7-AAD (BioLegend). For analysis of cytokine secretion, supernatants were harvested after 24 h of incubation and measured using the TH1 LEGENDplex multiplex kits (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. The real-time cytotoxicity assay was performed at 30 min intervals over a 72 h observation period using the xCELLigence RTCA system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Values are depicting means of technical triplicates with standard deviation.

T cell proliferation and T cell subset analysis

For thymidine uptake assay, irradiated target cells (1×10^5) were incubated with monocyte-depleted PBMCs seeded in triplicates in 96-well plates (2×10^5) with or without the indicated Abs. After 48 h, cells were pulsed with ³H-methyl-thymidine (0.5 μ Ci/well) for

cells were injected i.v. in NSG mice ($n = 5$ per group) followed by i.v. injection of 15×10^6 PBMC and CC-3 (2 μ g or at the indicated concentrations). Treatment with bsAb was repeated on day 4. Tumor burden was measured by monitoring bioluminescence over time. Representative bioluminescence images of mice (treated with 2 μ g CC-3) from the indicated treatment groups are depicted. After 8 days, activated human T cells (left panel) and number of tumor cells (right panels) in digested lungs were quantified by flow cytometry. Statistical analysis was performed using nonparametric Mann Whitney test. ** $p < 0.01$. (D) 1×10^6 luciferase-expressing HT-29 cells and 250,000 PBMCs from healthy donors were injected s.c. into the right flank of NSG mice ($n = 3$ per group). Where indicated, CC-3 (2 μ g) was injected i.v. 6 h later as well as on days 4 and 7 after tumor implantation. Tumor burden was monitored by bioluminescence (representative bioluminescent images at day 10 are shown). Tumor size was measured using caliper (the graph represents tumor volumes over time). (E) 10^6 LNCaP cells were injected s.c. into the right flank of NSG mice (five per group), and treatment with PBMCs and bsAbs was started when tumors had reached a diameter of 5 mm. Where indicated, CC-3 (2 μ g per dose) and PBMCs (10^7) were applied at days 1, 8, and 15. Mean values and SDs of five mice per group are indicated. Tumor growth (diameter) was measured twice weekly, and mice were euthanized when tumors had reached a diameter of 15 mm.

20 h and harvested on filter mats. Incorporated radioactivity was determined by liquid scintillation counting in a 2450 Microplate counter (PerkinElmer).

For the long-term proliferation assay and T cell subset analysis, monocyte-depleted PBMCs were labeled with 3 μ M CellTrace Violet dye (Thermo Fisher Scientific). PBMCs were incubated for 6 days with tumor cells and the indicated bsAbs. On day 3, fresh tumor cells and a new dilution of Ab were added to the plate. Cells were analyzed by flow cytometry as described above.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD). Significant differences were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, Student's *t* tests, Wilcoxon test, or nonparametric Mann-Whitney test. *p* values are represented as **p* < 0.05.

Animal experiments

All animal experiments were performed following the principles of replacement, reduction, and refinement (3Rs) following the ARRIVE guidelines and the "European animal protection laws and policies" (directive 2010/63/EU) with the authorization of the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Tübingen according to German federal and state regulations. All mouse strains were bred and maintained under specific-pathogen-free (SPF) conditions in the animal facility of the University of Tübingen.

For determination of serum half-life, C57BL/6 mice (C57BL/6NCrl, Charles River) were injected i.v. with 20 μ g CC-3 Ab, and serum concentrations of the protein was determined using a bioluminescent cell-based assay system developed by Promega (Madison, WI, USA). For the *in vivo* toxicity model, NSG mice were injected intraperitoneally (i.p.) on day 1 with 20×10^6 human PBMCs. On the same day, animals were further injected i.v. with parental UCHT-1 Ab (anti-CD3, induces T cell activation) or CC-3 (20 μ g each). After 24 h, IFN- γ levels in sera were examined.

Metastasis lung model was performed using luciferase-transduced HT-29 cells (3×10^6) that were injected into NSG mice (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ, Charles River) i.v. (day 1), followed 6 h later by injection of human PBMCs (15×10^6 cells, i.v.). CC-3 (2 μ g or at the indicated concentration, i.v.) was applied at days 1 and 4. After 8 days, the number of tumor cells in the lung was determined by flow cytometry after enzymatic digestion of the removed organ. Cells were stained with Abs directed to mCD45-eFluor 780 (eBioscience), huCD45-BV510 and huEpCam-FITC (BioLegend) Abs, the latter serving as a specific marker for HT-29 cells. Activated human hCD45⁺ PBMCs present in lung tissue were stained using CD69-PE Ab (BioLegend). Samples were analyzed by flow cytometry.

To evaluate the activity of CC-3 in a flank model where the tumor growth was prevented, 10^6 luciferase-transduced HT-29 cells were mixed with 2.5×10^5 PBMCs in Matrigel (Matrigel Basement Mem-

brane Matrix High Concentration) at a ratio of 4:1. Injection was performed into flank subcutaneously (s.c.) under ketamine-rompun anesthesia. Therapy was performed at days 1, 4, and 7 (i.v.). Tumor volume was measured with caliper. For monitoring of tumor growth by bioimaging, mice were injected i.p. with 100 μ L D-luciferin (15 mg/mL, BioVision), and luminescence was measured using IVIS Lumina II imager (PerkinElmer). The established mouse model was performed as described previously. Briefly, 10^6 LNCaP cells were injected s.c. into the right flank of female NSG mice, and treatment was started when tumors had reached a diameter of 5 mm (day 1). PBMCs (10^7 i.p.) and CC-3 (2 μ g i.v.) were applied weekly for 3 times. Tumor growth (diameter) was measured twice weekly, and mice were euthanized if tumors had reached a diameter of 15 mm or at signs of graft versus host disease (GvHD).

DATA AVAILABILITY

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.010>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Andrea Dobler, Beate Pömmel, and Carolin Walker for excellent technical assistance. Flow cytometry sample acquisition was performed within the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen. This project was supported by the Deutsche Krebshilfe (70113999 and 70114180); Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.2); Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy - EXC 2180-39090067 and DFG, project number SA 1360/9-3; and Helmholtz Validation Fund (HVF-0086).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.Z. designed and performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. T.M. generated B7-H3 mAbs and characterized them. S.H. performed epitope mapping. M.L., N.P., M.E., and I.H. performed *in vitro* experiments. B.K., S.M., and A.C. performed *in vivo* experiments. M.P. and J.S.H. supervised the CC-3 GMP production. G.J. and H.R.S. contributed to the study design, critically revised the manuscript, and supervised the study. All authors approved the submitted version of the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

G.J., H.R.S., L.Z., T.M., S.H., and M.P. are listed as inventors on the patent application "Antibodies targeting, and other modulators of, the CD276 antigen, and uses thereof," EP3822288A1, applicant is German Cancer Research Center, Heidelberg, and Medical Faculty University of Tuebingen, Germany.

REFERENCES

1. Labrijn, A.F., Janmaat, M.L., Reichert, J.M., and Parren, P. (2019). Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 585–608.

2. Sedykh, S.E., Prinz, V.V., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2018). Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* *12*, 195–208.
3. Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* *359*, 1350–1355.
4. Daver, N., Alotaibi, A.S., Bücklein, V., and Subklewe, M. (2021). T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments. *Leukemia* *35*, 1843–1863.
5. Kontermann, R.E., and Brinkmann, U. (2015). Bispecific antibodies. *Drug Discov. Today* *20*, 838–847.
6. June, C.H., and Sadelain, M. (2018). Chimeric antigen receptor therapy. *N. Engl. J. Med.* *379*, 64–73.
7. Brentjens, R.J., Davila, M.L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L.G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., et al. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* *5*, 177ra38.
8. Heitmann, J.S., Pfluegler, M., Jung, G., and Salih, H.R. (2021). Bispecific antibodies in prostate cancer therapy: current status and perspectives. *Cancers (Basel)* *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13030549>.
9. Galluzzi, L., Chan, T.A., Kroemer, G., Wolchok, J.D., and López-Soto, A. (2018). The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* *10*, eaat7807.
10. Baeuerle, P.A., and Wesche, H. (2022). T-cell-engaging antibodies for the treatment of solid tumors: challenges and opportunities. *Curr. Opin. Oncol.* *34*, 552–558.
11. Heinemann, V., von Weikersthal, L.F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-Kaiser, U., Al-Batran, S.E., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., et al. (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 1065–1075.
12. Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 609–618.
13. Passardi, A., Canale, M., Valgiusti, M., and Ulivi, P. (2017). Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 1324.
14. O'Neil, B.H., Wallmark, J.M., Lorente, D., Elez, E., Raimbourg, J., Gomez-Roca, C., Ejadi, S., Piha-Paul, S.A., Stein, M.N., Abdul Razak, A.R., et al. (2017). Safety and anti-tumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One* *12*, e0189848.
15. Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2509–2520.
16. Leitner, J., Klausner, C., Pickl, W.F., Stöckl, J., Majdic, O., Bardet, A.F., Kreil, D.P., Dong, C., Yamazaki, T., Zlabinger, G., et al. (2009). B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1754–1764.
17. Seaman, S., Zhu, Z., Saha, S., Zhang, X.M., Yang, M.Y., Hilton, M.B., Morris, K., Szot, C.R., Morris, H., Swing, D.A., et al. (2017). Eradication of tumors through simultaneous ablation of CD276/B7-H3-positive tumor cells and tumor vasculature. *Cancer Cell* *31*, 501–515.e8.
18. Zekri, L., Vogt, F., Osburg, L., Müller, S., Kauer, J., Manz, T., Pflügler, M., Maurer, A., Heitmann, J.S., Hagelstein, I., et al. (2021). An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol. Med.* *13*, e11902.
19. Heitmann, J.S., Walz, J.S., Pflügler, M., Kauer, J., Schlenk, R.F., Jung, G., and Salih, H.R. (2020). Protocol of a prospective, multicentre phase I study to evaluate the safety, tolerability and preliminary efficacy of the bispecific PSMAXCD3 antibody CC-1 in patients with castration-resistant prostate carcinoma. *BMJ Open* *10*, e039639.
20. Mehta, N.K., Pfluegler, M., Meetze, K., Li, B., Sindel, I., Vogt, F., Marklin, M., Heitmann, J.S., Kauer, J., Osburg, L., et al. (2022). A novel IgG-based FLT3xCD3 bispecific antibody for the treatment of AML and B-ALL. *J. Immunother. Cancer* *10*, e003882.
21. Bortoletto, N., Scotet, E., Myamoto, Y., D'Oro, U., and Lanzavecchia, A. (2002). Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells. *Eur. J. Immunol.* *32*, 3102–3107.
22. Haber, L., Olson, K., Kelly, M.P., Crawford, A., DiLillo, D.J., Tavaré, R., Ullman, E., Mao, S., Canova, L., Sineschekova, O., et al. (2021). Generation of T-cell-redirecting bispecific antibodies with differentiated profiles of cytokine release and bio-distribution by CD3 affinity tuning. *Sci. Rep.* *11*, 14397.
23. Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* *211*, 214–224.
24. Ando, M., Ito, M., Srirat, T., Kondo, T., and Yoshimura, A. (2020). Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol. Med.* *43*, 1–9.
25. Pishvaian, M., Morse, M.A., McDevitt, J., Norton, J.D., Ren, S., Robbie, G.J., Ryan, P.C., Soukharev, S., Bao, H., and Denlinger, C.S. (2016). Phase I dose escalation study of MEDI-565, a bispecific T-cell engager that targets human carcinoembryonic antigen, in patients with advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *Clin. Colorectal Cancer* *15*, 345–351.
26. Kebenko, M., Goebeler, M.E., Wolf, M., Hasenburg, A., Seggewiss-Bernhardt, R., Ritter, B., Rautenberg, B., Atanackovic, D., Kratzer, A., Rottman, J.B., et al. (2018). A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE(R)) antibody construct, in patients with refractory solid tumors. *Oncoimmunology* *7*, e1450710.
27. Morris, Z.S., Guy, E.I., Francis, D.M., Gressett, M.M., Werner, L.R., Carmichael, L.L., Yang, R.K., Armstrong, E.A., Huang, S., Navid, F., et al. (2016). In situ tumor vaccination by combining local radiation and tumor-specific antibody or immunocytokine treatments. *Cancer Res.* *76*, 3929–3941.
28. Ganss, R., Ryschich, E., Klar, E., Arnold, B., and Hämmerling, G.J. (2002). Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res.* *62*, 1462–1470.
29. Zhang, C., Wang, Z., Yang, Z., Wang, M., Li, S., Li, Y., Zhang, R., Xiong, Z., Wei, Z., Shen, J., et al. (2017). Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA(+) metastatic colorectal cancers. *Mol. Ther.* *25*, 1248–1258.
30. Feng, K., Guo, Y., Dai, H., Wang, Y., Li, X., Jia, H., and Han, W. (2016). 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.
31. Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* *469*, 314–322.
32. Wang, R., Ma, Y., Zhan, S., Zhang, G., Cao, L., Zhang, X., Shi, T., and Chen, W. (2020). B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF-kappaB pathway to induce VEGFA expression. *Cell Death Dis.* *11*, 55.
33. Xie, C., Liu, D., Chen, Q., Yang, C., Wang, B., and Wu, H. (2016). Soluble B7-H3 promotes the invasion and metastasis of pancreatic carcinoma cells through the TLR4/NF-kappaB pathway. *Sci. Rep.* *6*, 27528.
34. Flem-Karlsen, K., Tekle, C., Øyjord, T., Flørenes, V.A., Mælandsmo, G.M., Fodstad, Ø., and Nunes-Xavier, C.E. (2019). p38 MAPK activation through B7-H3-mediated DUSP10 repression promotes chemoresistance. *Sci. Rep.* *9*, 5839.
35. Lim, S., Liu, H., Madeira da Silva, L., Arora, R., Liu, Z., Phillips, J.B., Schmitt, D.C., Vu, T., McClellan, S., Lin, Y., et al. (2016). Immunoregulatory protein B7-H3 reprograms glucose metabolism in cancer cells by ROS-mediated stabilization of HIF1alpha. *Cancer Res.* *76*, 2231–2242.
36. Hofmeyer, K.A., Ray, A., and Zang, X. (2008). The contrasting role of B7-H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 10277–10278.
37. Chen, L., Chen, J., Xu, B., Wang, Q., Zhou, W., Zhang, G., Sun, J., Shi, L., Pei, H., Wu, C., and Jiang, J. (2015). B7-H3 expression associates with tumor invasion and patient's poor survival in human esophageal cancer. *Am. J. Transl. Res.* *7*, 2646–2660.
38. Brustmann, H., Igaz, M., Eder, C., and Brunner, A. (2015). Epithelial and tumor-associated endothelial expression of B7-H3 in cervical carcinoma: relation with CD8+ intraepithelial lymphocytes, FIGO stage, and phosphohistone H3 (PHH3) reactivity. *Int. J. Gynecol. Pathol.* *34*, 187–195.
39. Chapolov, A.I., Ni, J., Lau, J.S., Wilcox, R.A., Flies, D.B., Liu, D., Dong, H., Sica, G.L., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* *2*, 269–274.
40. Lupu, C.M., Eisenbach, C., Lupu, A.D., Kuefner, M.A., Hoyler, B., Stremmel, W., and Encke, J. (2007). Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer. *Oncol. Rep.* *18*, 745–748.

41. Suh, W.K., Gajewska, B.U., Okada, H., Gronski, M.A., Bertram, E.M., Dawicki, W., Duncan, G.S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., et al. (2003). The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 4, 899–906.
42. Prasad, D.V.R., Nguyen, T., Li, Z., Yang, Y., Duong, J., Wang, Y., and Dong, C. (2004). Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.* 173, 2500–2506.
43. Jin, M.Z., and Jin, W.L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 166.
44. MacGregor, H.L., Sayad, A., Elia, A., Wang, B.X., Katz, S.R., Shaw, P.A., Clarke, B.A., Crome, S.Q., Robert-Tissot, C., Bernardini, M.Q., et al. (2019). High expression of B7-H3 on stromal cells defines tumor and stromal compartments in epithelial ovarian cancer and is associated with limited immune activation. *J. Immunother. Cancer* 7, 357.
45. Seaman, S., Stevens, J., Yang, M.Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., and St Croix, B. (2007). Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 11, 539–554.
46. Bluemel, C., Hausmann, S., Fluhr, P., Sriskandarajah, M., Stallcup, W.B., Baeuerle, P.A., and Kufer, P. (2010). Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1197–1209.
47. Durben, M., Schmiedel, D., Hofmann, M., Vogt, F., Nübling, T., Pyz, E., Bühring, H.J., Rammensee, H.G., Salih, H.R., Große-Hovest, L., and Jung, G. (2015). Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia. *Mol. Ther.* 23, 648–655.
48. Staffin, K., Zuch de Zafra, C.L., Schutt, L.K., Clark, V., Zhong, F., Hristopoulos, M., Clark, R., Li, J., Mathieu, M., Chen, X., et al. (2020). Target arm affinities determine preclinical efficacy and safety of anti-HER2/CD3 bispecific antibody. *JCI Insight* 5, e133757.
49. Dang, K., Castello, G., Clarke, S.C., Li, Y., Balasubramani, A., Boudreau, A., Davison, L., Harris, K.E., Pham, D., Sankaran, P., et al. (2021). Attenuating CD3 affinity in a PSMAxCD3 bispecific antibody enables killing of prostate tumor cells with reduced cytokine release. *J. Immunother. Cancer* 9, e002488.
50. Trinklein, N.D., Pham, D., Schellenberger, U., Buelow, B., Boudreau, A., Choudhry, P., Clarke, S.C., Dang, K., Harris, K.E., Iyer, S., et al. (2019). Efficient tumor killing and minimal cytokine release with novel T-cell agonist bispecific antibodies. *MAbs* 11, 639–652.
51. Al-Aghbar, M.A., Jainarayanan, A.K., Dustin, M.L., and Roffler, S.R. (2022). The interplay between membrane topology and mechanical forces in regulating T cell receptor activity. *Commun. Biol.* 5, 40.
52. Mandikian, D., Takahashi, N., Lo, A.A., Li, J., Eastham-Anderson, J., Slaga, D., Ho, J., Hristopoulos, M., Clark, R., Totpal, K., et al. (2018). Relative target affinities of T-cell-dependent bispecific antibodies determine biodistribution in a solid tumor mouse model. *Mol. Cancer Ther.* 17, 776–785.
53. Liu, C., Zhang, G., Xiang, K., Kim, Y., Lavoie, R.R., Lucien, F., and Wen, T. (2022). Targeting the immune checkpoint B7-H3 for next-generation cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 71, 1549–1567.
54. Wörn, A., and Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* 305, 989–1010.

Supplemental Information

An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers

Latifa Zekri, Martina Lutz, Nisha Prakash, Timo Manz, Boris Klimovich, Stefanie Mueller, Sebastian Hoerner, Ilona Hagelstein, Monika Engel, Anna Chashchina, Martin Pflueger, Jonas S. Heitmann, Gundram Jung, and Helmut R. Salih

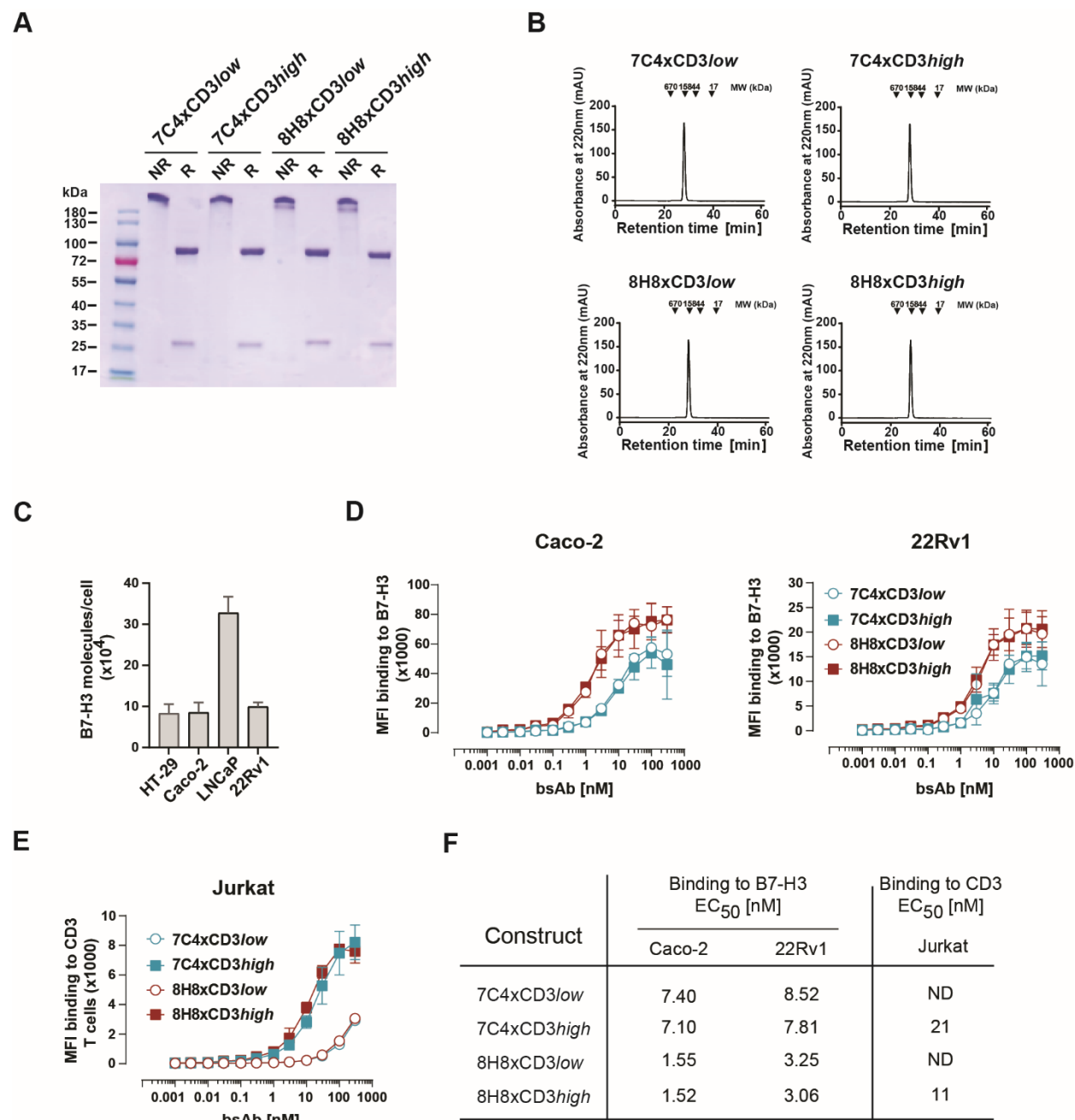


Figure S2. Characterization of bsAbs directed against B7-H3.

(A) SDS-PAGE of the newly generated B7-H3 bsAbs. NR: non-reduced; R: reduced. (B) BsAbs were subjected to analytical chromatography using Superdex S200 Increase 10/300GL column. Representative gel filtration profiles are shown. (C) B7-H3 molecule counts on tumor cell lines were determined by FACS. Results for two independent experiments are shown. (D) Binding of the indicated bsAbs to human B7-H3 on Caco-2 and 22Rv1 cells. Data are shown as means \pm SD of two independent experiments. (E) Binding of the indicated B7-H3 bsAbs to Jurkat cells. (F) Table summarizing the EC₅₀ values corresponding to D and E.

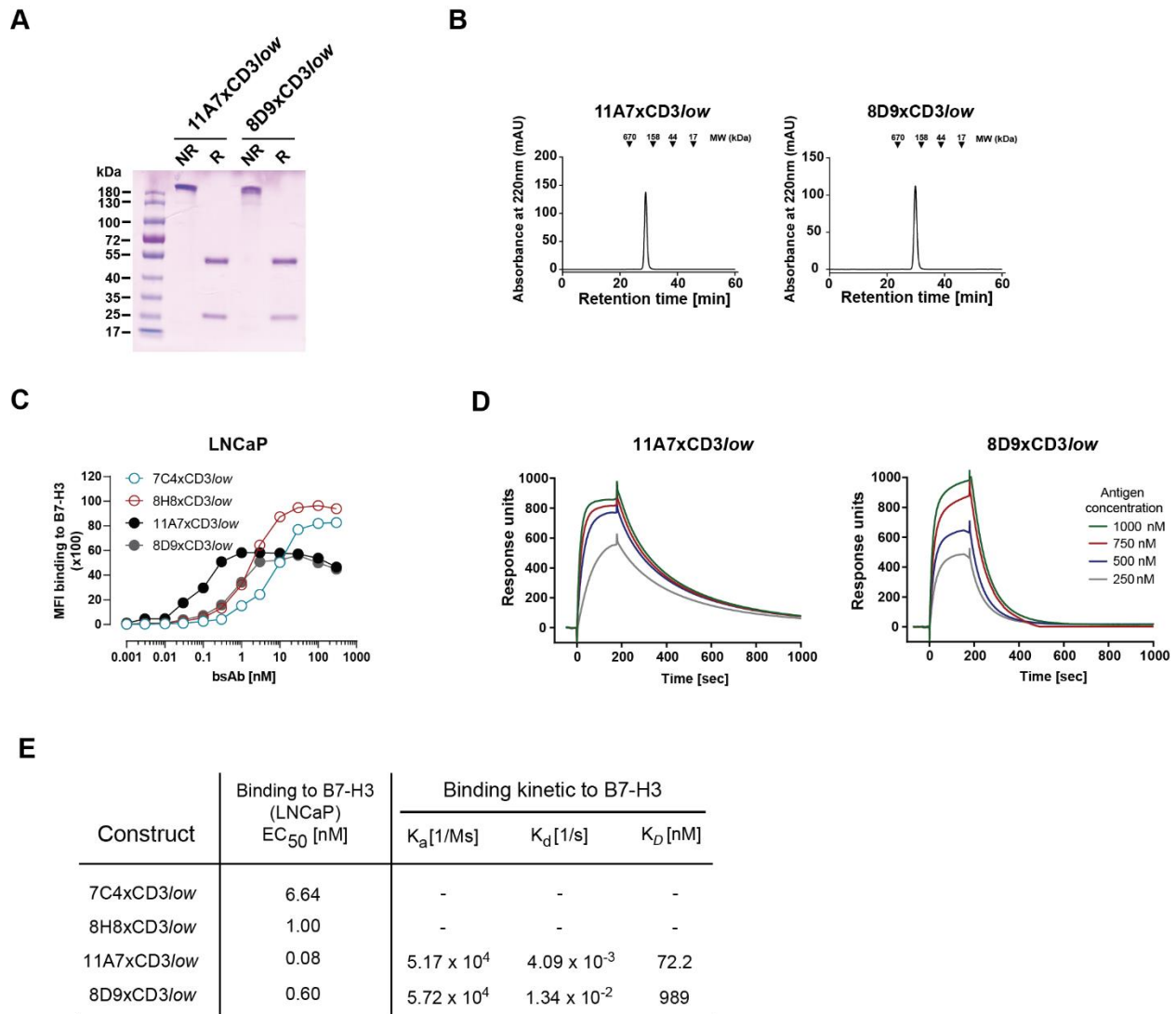


Figure S3. Comparison of bsAbs directed against B7-H3.

(A) SDS-PAGE of 11A7 and 8D9 bsAbs. NR: non-reduced; R: reduced. (B) BsAbs were subjected to analytical chromatography using Superdex S200 Increase 10/300GL column. Representative gel filtration profiles are shown. (C) Binding of the indicated bsAbs to human B7-H3 on LNCaP cells. Data are shown as means \pm SD of two independent experiments. (D) SPR-Biacore sensorgrams determining binding of B7-H3 antigen to surface-captured 11A7 and 8D9 bsAbs at 25°C and pH 7.4. (E) Table summarizing the EC₅₀ values corresponding to C and D.

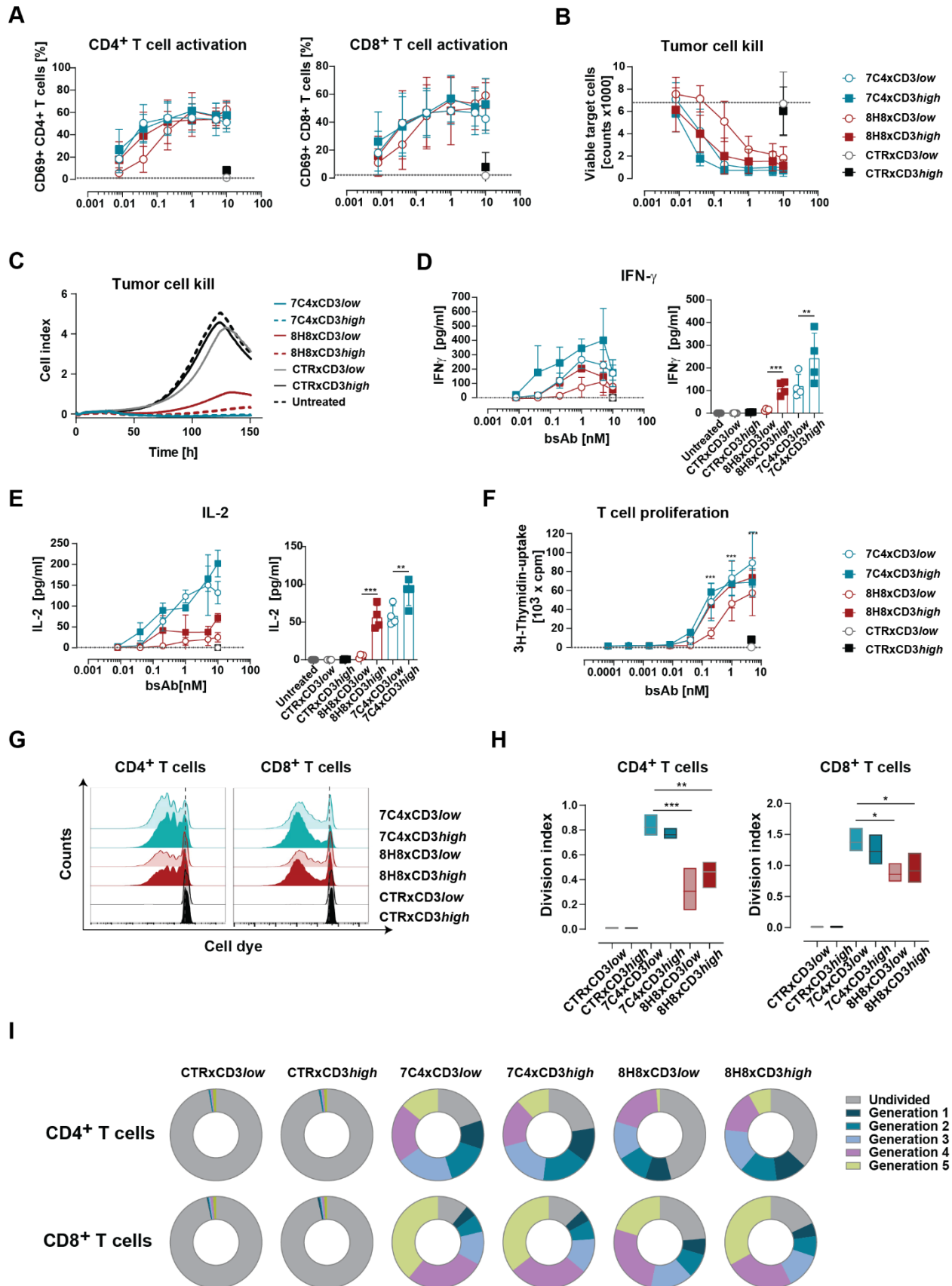


Figure S4. Impact of lowering the B7-H3 and CD3 affinity on T cell reactivity.

(A, B) LNCaP cells were incubated with monocyte-depleted PBMC from healthy donors (n=4; E:T ratio 2:1) in the presence of increasing concentrations of the indicated B7-H3xCD3 constructs or a CTRxCD3 bsAb with an unrelated specificity. Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and tumor cell kill was determined by flow cytometry after 3 days. Dotted lines represent background T cell activation (A) and tumor cell percentage in the presence of CTRxCD3 bsAbs (B). (C) Survival of LNCaP tumor cells in the presence of monocyte-depleted PBMC and 0.2 nM of the indicated bsAbs was monitored over time in xCELLigence assays. (D, E) Levels of the indicated cytokines in culture medium of the experiments described in (A) were determined after 24 h of incubation by using Legendplex multiplex assay. Left graphs represent cytokine measurements done with 0.2 nM of the indicated bsAbs. Data are shown as means \pm SD calculated from four independent experiments. *P* values were calculated with one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (F) Irradiated LNCaP cells and monocyte-depleted PBMC were incubated with the indicated concentration of B7-H3 bsAbs for 3 days. T cell proliferation was assessed using ³H-thymidine incorporation assays. The dashed line represents baseline proliferation in the presence of CTRxCD3 bsAbs. Data are shown as means \pm SD calculated from four independent experiments. *P* values were calculated using Wilcoxon test for each time point comparing 7C4xCD3_{low} to 8H8xCD3_{low}. (G-H) Monocyte-depleted PBMCs were labelled with CellTrace™ Violet dye and cocultured with LNCaP cells and 1 nM of the indicated bsAbs. On day 3, LNCaP cells and bsAbs were renewed. Proliferation of CD8⁺/CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry on day 6. (G) Exemplary proliferation profiles. (H) The division index of proliferating T cells was calculated using FlowJo software. Results represent the mean values obtained with four PBMC donors. *P* values were calculated using one-way ANOVA test. (I) Pie charts representing T cell mean counts for each division peak obtained in the experiment described in (G). Data are shown as means calculated from four independent experiments.

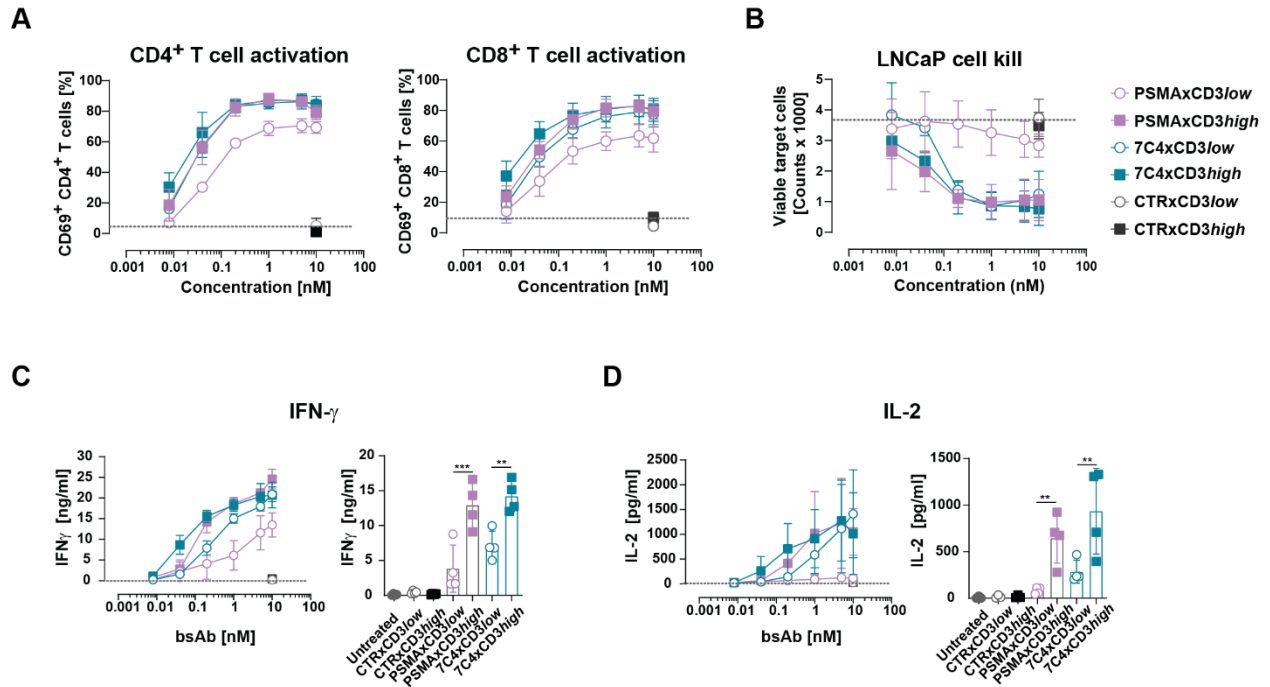


Figure S5. Comparative analysis of bsAb directed against different antigens.

(A-D) LNCaP cells (positive for both, B7-H3 and PSMA) were cocultured with monocyte-depleted PBMC in the presence of increasing concentrations of the indicated B7-H3xCD3 and PSMAxCD3 constructs at an E:T ratio 2:1. CD4⁺ and CD8⁺T cell activation (A) and target cell depletion (B) were analyzed by flow cytometry after 24 and 72 hours, respectively. Mean values and SD of four independent measurements are indicated. Dotted lines represent baseline T cell activation and tumor cell counts in the presence of CTRxCD3 bsAbs. (C, D) IFN- γ and IL-2 levels in culture medium were determined after 24 h of incubation using Legendplex multiplex assay. Left graphs represent cytokine measurements done with 0.2 nM of the indicated bsAbs. Data are shown as means \pm SD calculated from four independent experiments. *P* values were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Chi Chun Wong,
The Chinese University of Hong Kong,
China

REVIEWED BY

Lucia De Monte,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy
Christian Klein,
Roche Innovation Center Zurich,
Switzerland

*CORRESPONDENCE

Helmut R. Salih
✉ helmut.salih@med.uni-tuebingen.de

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 10 February 2023

ACCEPTED 30 March 2023

PUBLISHED 14 April 2023

CITATION

Lutz MS, Zekri L, Weßling L, Berchtold S,
Heitmann JS, Lauer UM, Jung G and
Salih HR (2023) IgG-based B7-H3xCD3
bispecific antibody for treatment of
pancreatic, hepatic and gastric cancer.
Front. Immunol. 14:1163136.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1163136

COPYRIGHT

© 2023 Lutz, Zekri, Weßling, Berchtold,
Heitmann, Lauer, Jung and Salih. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer

Martina S. Lutz^{1,2}, Latifa Zekri^{1,2,3}, Laura Weßling^{1,2},
Susanne Berchtold^{2,4,5}, Jonas S. Heitmann^{1,2},
Ulrich M. Lauer^{2,4,5}, Gundram Jung^{2,3} and Helmut R. Salih^{1,2*}

¹Department of Internal Medicine, Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK), University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, ²Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) "Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies", University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, ³Department of Immunology, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tuebingen, Germany, ⁴Department of Internal Medicine VIII, Medical Oncology & Pneumology, University Hospital Tübingen, Tuebingen, Germany, ⁵German Cancer Research Center (DKFZ), German Cancer Consortium (DKTK), Tübingen, Germany

T cell-based immunotherapy has significantly improved treatment options for many malignancies. However, despite these and other therapeutic improvements over the last decades, gastrointestinal cancers, in particular pancreatic, hepatic and gastric cancer, are still characterized by high relapse rates and dismal prognosis, with an accordingly high unmet medical need for novel treatment strategies. We here report on the preclinical characterization of a novel bispecific antibody in an IgG-based format termed CC-3 with B7-H3xCD3 specificity. In many cancer entities including pancreatic, hepatic and gastric cancers, B7-H3 (CD276) is overexpressed on tumor cells and also on the tumor vasculature, the latter allowing for improved access of immune effector cells into the tumor site upon therapeutic targeting. We demonstrate that CC-3 induces profound T cell reactivity against various pancreatic, hepatic and gastric cancer cell lines as revealed by analysis of activation, degranulation and secretion of IL2, IFN γ as well as perforin, resulting in potent target cell lysis. Moreover, CC-3 induced efficient T cell proliferation and formation of T cell memory subsets. Together, our results emphasize the potential of CC-3, which is presently being GMP-produced to enable clinical evaluation for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer.

KEYWORDS

immunotherapy, pancreatic cancer, hepatic cancer, gastric cancer, B7-H3 (CD276), CD3, bispecific antibody, gastrointestinal cancer

Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; bsAb, bispecific antibody; BSA, Bovine Serum Albumin; CAR, chimeric antigen receptor; CD, cluster of differentiation; DAPI, 4,6-Diamidin-2-phenylindol; E:T, effector to target; EU, endotoxin; GI, gastrointestinal; ICI, immune checkpoint inhibition; IFN γ , Interferon γ ; IgG1, Immunoglobulin G1; mAb, monoclonal antibody; MFI, mean fluorescence intensity; PFA, paraformaldehyde; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PE, phycoerythrin; SD, standard deviation.

Introduction

Malignancies of the gastrointestinal tract belong to the most prevalent cancers, accounting for 26% of global cancer incidence and 35% of all cancer-related deaths (1). Current treatment strategies include chemotherapy, surgery, radiotherapy and targeted therapies. Despite therapeutic improvements over the last decades, among others due to incorporation of antibody-based approaches like monoclonal antibodies (mAbs) targeting e.g. HER2 or VEGF (2, 3), the still high relapse rates and dismal prognosis underline the high medical need for new therapeutic strategies.

In the last decade, immunotherapeutic approaches to mobilize T cells against tumor cells have significantly improved oncological treatment options. In particular, immune checkpoint inhibition (ICI) has become a mainstay of treatment in many solid tumor entities (4, 5). However, long-term remissions are still rare and many patients do not respond to treatment. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy and bispecific antibodies (bsAbs) have shown remarkable success in the treatment of hematological malignancies (6, 7) but are so far not effective in solid tumors.

B7-H3 (CD276) is a type I transmembrane protein belonging to the B7 family of immune checkpoint proteins (8). Due to rather specific expression on a wide array of cancer entities, B7-H3 presently receives high interest as target for immunotherapeutic approaches (9, 10). Notably, B7-H3 is not only expressed on tumor cells but also on the tumor vasculature (11). The latter may facilitate improved access of immune effector cells to solid tumors upon therapeutic targeting, thereby overcoming the lacking access of immune effector cells to the tumor site, a major obstacle for T cell-based immunotherapy of solid tumors. Based on previous work including development of bsAbs with FLT3xCD3 (12) and PSMAxCD3 (13, 14) specificity until the stage of clinical evaluation (NCT05143996, NCT04104607 and NCT04496674), we here preclinically evaluated a B7-H3xCD3 bsAb termed CC-3, which is presently undergoing GMP production, for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer.

Materials and methods

Production and purification of bispecific antibodies

B7-H3xCD3 and its isotype control MOPCxCD3 were generated as described previously (13). In brief, the constructs were produced in ExpiCHO cells (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and purified from culture supernatant by affinity chromatography on Mabselect affinity columns (GE Healthcare, Munich, Germany) followed by analytical and preparative size exclusion chromatography using Superdex S200 Increase 10/300GL and HiLoad 16/60 columns (GE Healthcare). Endotoxin levels were measured with EndoZyme II (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions and < 0.5 EU/ml.

Cells

All cell lines were from ATCC (American Type Culture Collection) and were selected to best reflect the respective cancer entities. Hep3B and SNU387 represent hepatocellular carcinoma, the most common form of liver cancer. The pancreatic cancer cell lines were derived from adenocarcinomas, the most common type of pancreatic cancer. Of these, PANC-1 cells represent pancreatic ductal carcinoma, the most common subtype of pancreatic adenocarcinoma. Adenocarcinoma also is the most common type of gastric cancer, with NCI-N87 and MKN-45 cells representing well differentiated Lauren intestinal-type gastric adenocarcinoma and poorly differentiated Lauren diffuse-type gastric adenocarcinoma, respectively. Cells were tested routinely for mycoplasma contamination every three months. Authenticity was determined on a regular basis by validating the respective immunophenotype described by the provider using flow cytometry. Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) of healthy donors were isolated by density gradient centrifugation (Biocoll; Biochrom, Berlin, Germany), and monocytes within the PBMC were depleted for coculture experiments using human CD14 MicroBeads UltraPure kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Where indicated, T cells within PBMC were isolated by using either Pan T cell Isolation Kit, human CD4 Micro Beads or human CD8 Micro Beads (Miltenyi Biotec).

Relative gene expression of CD276 based on TCGA database analysis

Data on relative CD276 expression in tumor tissue of pancreatic, hepatic and gastric cancer patients was obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and the GTEx project utilizing the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server as described previously. The datasets PAAD LIHC and STAD were downloaded from TCGA (<http://www.oncolnc.org/>) and analyzed using the online web server GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Immunofluorescence

Tumor cells were incubated with monocyte-depleted PBMC of healthy donors (E:T 4:1), treated for 3 h and subsequently fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 10 min at -20°C. Cells were then blocked using 5% BSA, 0.2% Triton X-100, 0.1% Tween for 60 min, washed three times with PBST (PBS + 0.1% Tween20) and stained using a rabbit anti-human- α -Tubulin antibody (clone 11H10, Cell Signaling, Denver, MA) and a murine anti-human-Perforin antibody (clone δ G9, BD Pharmingen, Heidelberg, Germany), followed by an Alexa-Fluor 488 labelled anti-mouse and Alexa-Fluor 594 labelled anti-rabbit antibody (Invitrogen, Waltham, MA). Slides were mounted in fluorescent mounting medium; DAPI was used for counter-staining. Pictures were

acquired using a Zeiss 800 inverse laser scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and images were processed using ImageJ (15).

Flow cytometry

For analysis of B7-H3 surface expression and B7-H3xCD3 binding, cells were stained with a parental murine B7-H3 antibody (10 µg/mL) carrying the same B7-H3 binding clone as our construct (7C4), B-H3xCD3 or the corresponding isotype controls followed by a goat anti-mouse-PE conjugate (Dako, Glostrup, Denmark) or a donkey anti-human-PE conjugate (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), respectively. T cell activation, degranulation and proliferation were determined using CD69-PE, CD107a-PE (BD Pharmingen) as well as CD4-APC, CD8-FITC, CD62L-PB and CD45ro-PeCy7 (BioLegend, San Diego, CA) fluorescence conjugates. For flow cytometric analysis of target cell lysis, tumor cells were loaded with 2.5 µM CellTrace™ Violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and cultured with monocyte-depleted PBMC (E:T 4:1) in the presence or absence of B7-H3xCD3 or MOPCxCD3 (1 nM each). Standard calibration beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used to ensure analysis of equal assay volumes and to account for the number of target cells that had vanished from the culture. 7AAD (Biolegend) was used for live- and dead-cell discrimination. Measurements were performed using a FACS Canto II or FACS Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA) and data was analyzed using the software FlowJo (FlowJo LCC, Ashland, OR).

T cell activation and degranulation assays

To determine activation and degranulation in the presence of target cells, tumor cells were cultured with monocyte-depleted PBMC of healthy donors (E:T 4:1) in the presence or absence of B7-H3xCD3 or MOPCxCD3 (1 nM each). For analysis of T cell activation, CD69 expression was determined after 24 h. To compare activation of T cells within PBMC preparations to isolated T cell subpopulations in the absence of target cells, 1 µg/ml recombinant human B7-H3 was coated on 96-well plates overnight. Subsequently, PBMC preparations or isolated T cells and MOPCxCD3 or B7-H3xCD3 (5 nM each) were added, incubated for 72 h and analyzed by flow cytometry for CD69 expression. To analyze T cell degranulation, cells were cultured for 4 h in the presence of CD107a-PE (1:25), BD GolgiStop and BD GolgiPlug (1:1000, both BD Biosciences). Analysis was conducted using flow cytometry.

T cell proliferation assays

For long-term proliferation assays, monocyte-depleted PBMC were loaded with 2.5 µM CellTrace™ Violet cell proliferation dye (Thermo Fisher Scientific) and incubated with tumor cells (E:T 4:1) and the indicated bsAbs (1 nM each). On day 3, cells were

reincubated with fresh target cells and treatment was repeated. On day 6, proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed by flow cytometry. For T cell subset analysis, PBMC were incubated with tumor cells (E:T 1:1) and the indicated bsAbs (1 nM each). On day 3, cells were reincubated with fresh target cells and treatment. On day 6, T cell subsets were determined by flow cytometric analysis for expression of CD4, CD8, CD45ro and CD62L.

Analysis of cytokine secretion

Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were cultured with tumor cells (E:T ratio 4:1) in the presence or absence of bsAb or control (1 nM each). After 24 h, supernatants were collected and analyzed for IL-2, IFNγ, IL-10 and TNF using Legendplex assays (BioLegend).

Cytotoxicity assays

Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were cultured with tumor cells (E:T ratio 4:1) in the presence or absence of bsAb or control (1 nM each). Real-time cytotoxicity analysis was conducted using the xCELLigence RTCA system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

Statistics

If not otherwise indicated, values depict means ± standard deviation (SD). Student's t test, Mann-Whitney U test, one-way ANOVA and Friedman's test was used for continuous variables. If significant differences by ANOVA were found, group wise comparison was done (Tukey's multiple comparison test). If significant differences were found by Friedman's test, Dunn's multiple comparisons test was used. All statistical tests were considered statistically significant when *p* was below 0.05. Statistical analysis was performed using GraphPadPrism (v.8.1.0).

Results

Characterization of B7-H3 expression and binding of the B7-H3xCD3 bsAb CC-3 in pancreatic, hepatic and gastric cancer cell lines

As a first step, B7-H3 mRNA expression was studied by analysis of TCGA data sets of 178 pancreatic adenocarcinomas, 368 hepatocellular carcinomas and 408 gastric adenocarcinomas. Highest mRNA expression was observed in pancreatic adenocarcinoma, followed by gastric adenocarcinoma and hepatocellular carcinomas (Figure 1A). Next we characterized whether and to what extent B7-H3 was expressed on the surface of pancreatic, hepatic and gastric cancer cell lines. To this end we used the B7-H3 monoclonal antibody clone 7C4 that also served as

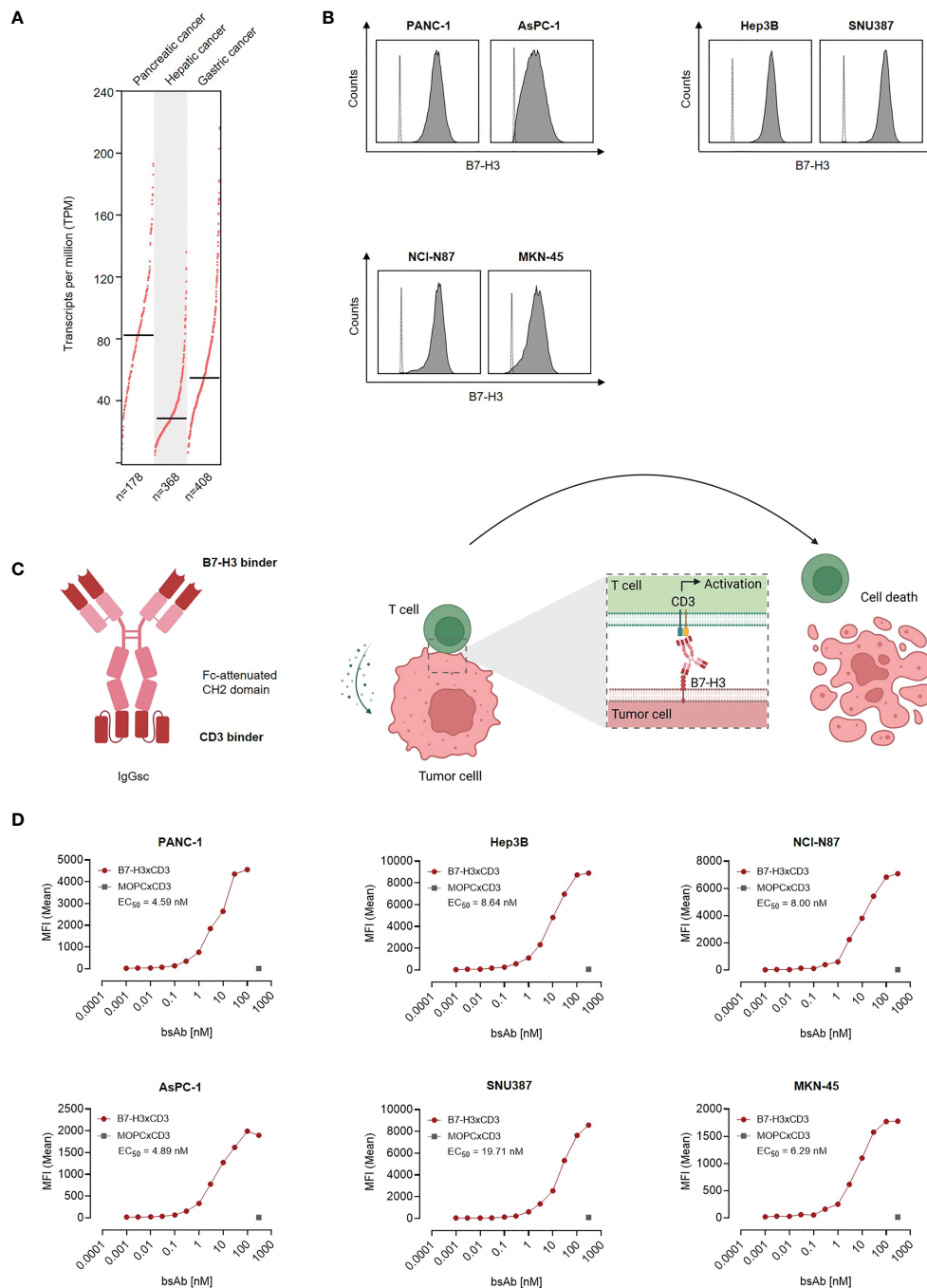


FIGURE 1

Characterization of B7-H3 expression and binding of CC-3 in gastrointestinal cancer cell lines. (A) CD276 gene expression profile in pancreatic, hepatic and gastric cancer was analyzed using the online web server GEPIA. (B) The indicated cancer cell lines were stained using a murine monoclonal B7-H3 antibody (clone 7C4) followed by an anti-mouse PE conjugate and analyzed using flow cytometry. B7-H3 expression on pancreatic cell lines AsPC-1 and PANC-1, hepatic cell lines Hep3B and SNU-387 and gastric cell lines MKN-45 and NCI-N87 is shown (shaded peaks, anti-B7H3; open peaks, control). (C) Schematic illustration and mechanism of action of the B7-H3xCD3 bsAb CC-3. The graphic was created by BioRender (BioRender.com, Toronto, Canada). (D) The indicated tumor cells were incubated with increasing concentrations of CC-3 or the respective isotype control MOPCxCD3, followed by an anti-human PE conjugate. Binding of the constructs to the indicated cell lines was analyzed by flow cytometry. MFI, mean fluorescence intensities.

target binder in our B7-H3xCD3 bsAb. Flow cytometric analysis revealed substantial B7-H3 expression in all tested cell lines (Figure 1B). Next we studied binding of our B7-H3xCD3 bsAb CC-3, which contains the variable domain of 7C4 cloned into our previously described IgGsc bsAb format (13), with the single chain

sequence of UCHT-1 carrying four mutations in the CDR-H2 and one mutation in the FR-H3 resulting in reduced affinity to CD3 (clone M18) as effector part (Figure 1C) (16). Binding titration experiments using the indicated pancreatic, hepatic and gastric cell lines revealed EC₅₀ values between 4.59 nM and 19.71 nM

(Figure 1D), whereas no unspecific binding to B7-H3-negative cells was observed (Figures S1A, B).

Induction of T cell activation

Next, we determined the capacity of CC-3 to induce T cell reactivity against pancreatic, hepatic and gastric cancer cell lines. PBMC of healthy donors were depleted of monocytes that can express substantial levels of B7-H3 upon activation (8, 9) and cultured with the indicated target cells in the presence or absence of increasing concentrations of CC-3 or the isotype control MOPCxCD3. Flow cytometric analysis of CD69 expression revealed maximal activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with CC-3 concentrations as low as 1 nM CC-3 (Figure 2A). Use of the above described PBMC preparations and analysis of the effects of CC-3 on T cells therein served to most closely reflect the physiological situation in patients, where other components of the blood may influence bsAb-induced T cell immunity (17, 18). Analyses evaluating the effect of immobilized CC-3 or isotype control in the absence of tumor targets revealed comparable activation of T cells within PBMC preparations and isolated T cells and excluded potential confounders by the tumor cells. (Figure S2). Analysis of T cell degranulation as determined by analysis of CD107a expression confirmed that CC-3 potently stimulated T cells with maximum effects observed already with doses of 1nM (Figure 2B). No effects were observed when the isotype control MOPCxCD3 or the B7-H3 negative HL-60 cells as targets were used, confirming strictly target antigen-restricted activity of our construct (Figures 2A, B; S1C, D). In line, analysis of culture supernatants by Legendplex assays showed a significant increase in IL-2, IFN γ , IL-10 and TNF secretion after treatment with 1 nM CC-3, but not with the isotype control or when target antigen negative tumor cells were used (Figures 2C, D; S1E, S3). When we used immunofluorescence staining to visualize induction of T cell reactivity against target cells, a significantly higher number of Perforin positive cells within the coculture was observed in samples treated with CC-3 compared to untreated samples. No effect was observed with the isotype control, again confirming target cell restricted activity of our bsAb CC-3 (Figures 3A–C; S4).

Induction of T cell proliferation

As induction of T cell proliferation is an important prerequisite to combat high tumor burden, we next labelled PBMC using CellTrace™ Violet and analyzed induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts (Figures 4A–C) and cell dye dilution (Figure S5) in cocultures with gastric, hepatic and pancreatic tumor cells upon treatment with 1 nM of CC-3 using flow cytometry. We observed profound T cell proliferation and significantly increased T cell counts in samples treated with CC-3, but not upon application of isotype control or when target cells were negative for B7-H3 (Figures 4A; S1F). As memory T cells constitute the subset most relevant for therapeutic success (19, 20), we next analyzed which T cell subsets were proliferating and found that CC-3 preferentially

induced expansion of effector memory and central memory T cells in a target cell restricted manner (Figures 4B, C; Figure S1G).

Induction of target cell lysis

Finally, we analyzed whether induction of T cell activation and proliferation by CC-3 treatment were mirrored by a corresponding effect regarding lysis of pancreatic, hepatic and gastric tumor cells. PBMC were cocultured with target cells and treated with CC-3 or isotype control (1 nM). Flow cytometry-based lysis assays revealed significant induction of cytotoxicity against pancreatic, hepatic and gastric tumor cells by CC-3 after 72 h. Again, isotype control had no effect, and analyses with the B7-H3xCD3 negative HL-60 cells confirmed target antigen-specific efficacy (Figures 5A; S1H, S6). Notably, analyses using the xCELLigence system confirmed the ability of CC-3 to mediate target efficacy of CC-3 over extended time periods, which indicates that CC-3 may induce sustained anti-tumor efficacy (Figure 5B).

Discussion

Although therapeutic options for solid tumors have overall improved over the last decades, treatment of gastrointestinal cancers remains still challenging. Several small molecule inhibitors have been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as therapeutic option for hepatic, gastric and pancreatic cancer, but the benefit of these therapies is limited (21–25). Antibody-based approaches targeting angiogenesis (e.g., Ramucirumab) or oncogenic signaling pathways (e.g., EGF Cetuximab or HER2 Trastuzumab) likewise show only limited benefit. T cell based-immunotherapy, especially ICI, which has revolutionized oncological treatment e.g. of lung and skin cancer, has also been evaluated for treatment of metastasized GI cancer, but except for the small group with microsatellite instability, achieves only limited efficacy (26–31). Especially in pancreatic cancer, ICI is far from being sufficiently effective, in large part likely due to an immunosuppressive tumor microenvironment (32). Moreover, the dense extracellular matrix of pancreatic cancer may act as physical barrier that prevents tumor infiltration by T and B lymphocytes (33). So far, limited evidence is available that ICI may be effective in some patients with hepatocellular carcinoma, but a reliable predictor for treatment response, e.g. characteristics of the tumor environment, has not been identified yet (34). Overall, new therapeutic concepts to improve treatment options of GI cancer patients are urgently needed. In the present study, we report on the preclinical characterization of a bsAb targeting B7-H3 and CD3 for treatment of gastric, hepatic and pancreatic cancer.

Compared to ICI, bsAbs and CAR T cells induce T cell antitumor immunity in a more targeted manner. Other than CAR T cells, bsAbs constitute readily available ‘off the shelf’ reagents, avoiding the delay of treatment that is required for the production of CAR T cells and contributes to their vast costs upon clinical application. CAR T cells and bsAbs share the shortcoming that their therapeutic success so far is limited to hematologic malignancies.

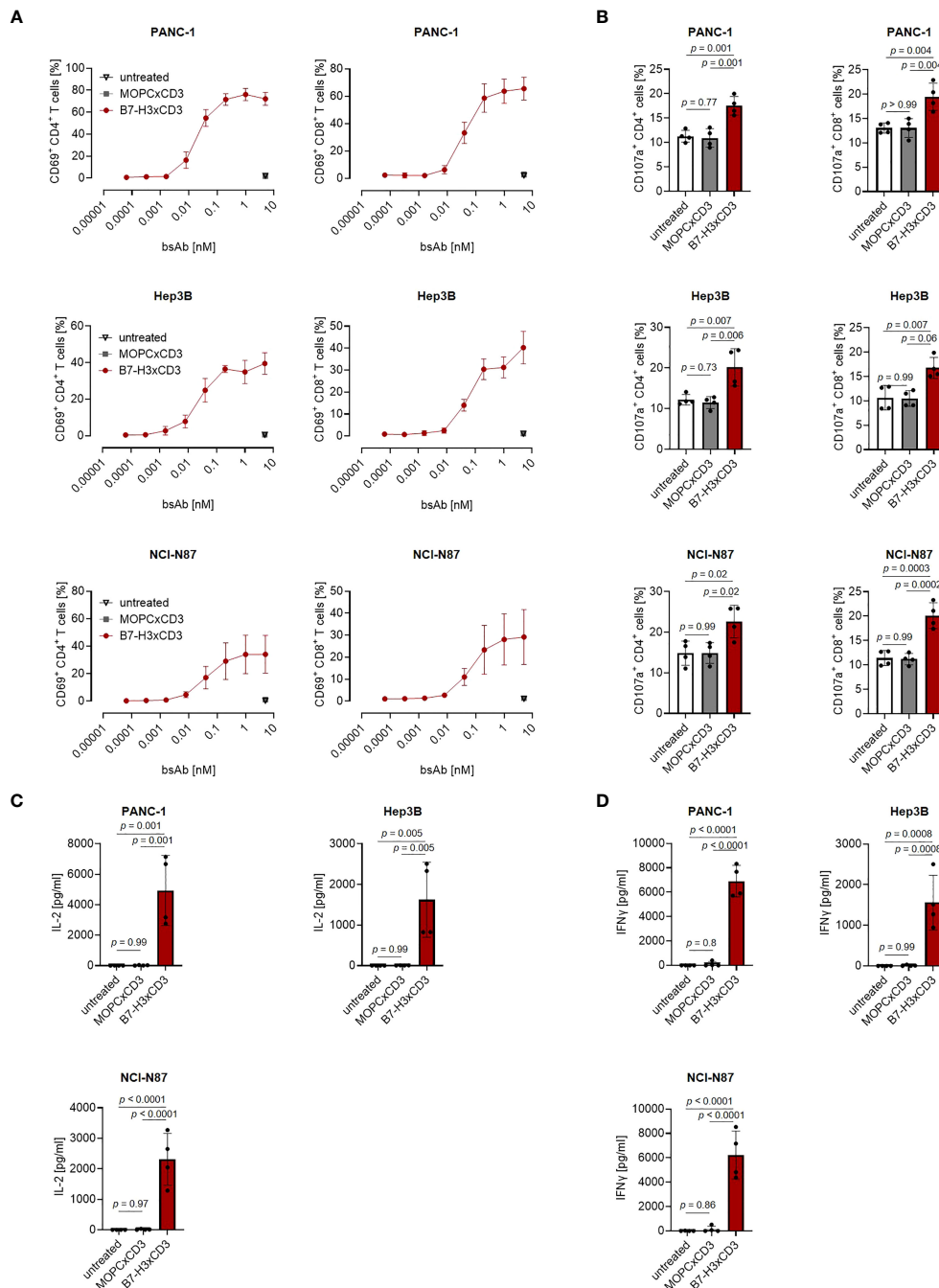


FIGURE 2

Induction of T cell activation against gastrointestinal cancer cell lines by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with the indicated tumor cell lines (E:T 4:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPCxCD3. If not stated otherwise, all constructs were used at 1 nM.

(A) Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by flow cytometric analysis for CD69 expression after 24 hours. Combined data obtained with PBMC of three independent donors are shown. (B) Degranulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by expression of CD107a after 4 h. Combined data obtained with PBMC of four independent donors are shown. (C) IL-2 and (D) IFN γ levels in culture supernatants were measured after 24 h using LEGENDplex assays. Combined data obtained with PBMC of four independent donors are shown. E:T, effector to target; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

The reasons are not yet fully understood, but limited access of T cells to the tumor site appears to constitute a major obstacle (35, 36). In our view, targeting both tumor cells and tumor vessels thus seems critical, the latter allowing for sufficient influx of immune cells to the tumor site across a damaged or inflamed endothelial barrier. This reasoning is supported by reports demonstrating that

even high numbers of tumor-specific T cells fail to induce sufficient antitumor responses unless a proinflammatory tumor environment has been generated (37, 38).

B7-H3 has attracted considerable interest as promising target for cancer immunotherapy because it is not only overexpressed on tumor cells in various types of cancer including GI cancer (9, 39,

40), but also on tumor-associated endothelial and stromal cells (41, 42). High expression of B7-H3 on tumor tissue is associated with poor clinical outcome and lymph node metastasis (43), and several studies report first evidence that B7-H3 positive tumor cell fractions may be enriched for cancer stem cells (44–46). In addition, B7-H3 is reported to act as coinhibitory receptor in the B7-CD28 pathway, suppressing T cell antitumor immunity (47–49). Specifically in pancreatic cancer, B7-H3 was reported to promote tumor progression, and its inhibition reduced cancer metastasis *in vivo* (39). In hepatocellular carcinoma, high B7-H3 expression was associated with adverse clinicopathologic features and poor

outcome (50). Another study demonstrated that B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion (51). We have recently reported on the preclinical characterization of an optimized B7-H3xCD3 bsAb and showed that targeting a membrane-proximal B7-H3 epitope allows for reduction of CD3 affinity while maintaining therapeutic efficacy. In analyses with colorectal cancer cells, our lead compound CC-3 demonstrated superior tumor cell killing, T cell activation, proliferation, and memory formation, while undesired cytokine release was reduced (16). Based on these characteristics and the aforementioned data on the expression and pathophysiological involvement of B7-H3 we

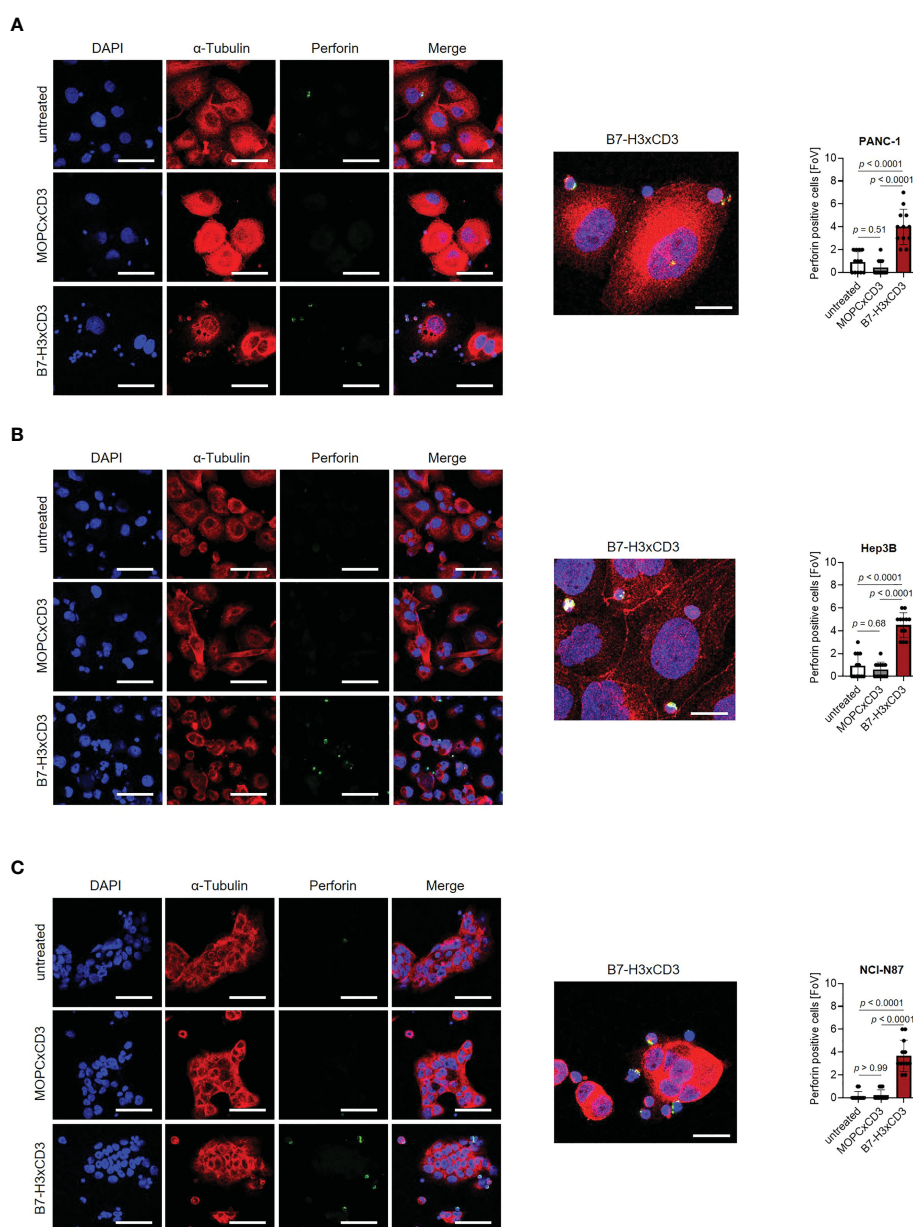


FIGURE 3

Induction of Perforin by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with target cells (E:T 4:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPCxCD3 (1 nM each) for 3 hours and subsequently stained for Perforin (green) and α -Tubulin (red). DAPI was used for counterstaining. Scale bars of left panels indicate 50 μ m, original magnification x40. Scale bar of exemplary immunofluorescence staining indicates 20 μ m, original magnification x63. Perforin positive cells were quantified per FoV (n=12) out of three independent experiments. Results obtained with (A) PANC-1, (B) Hep3B and (C) NCI-N87 cells are shown. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; E:T, effector to target; FoV, field of view.

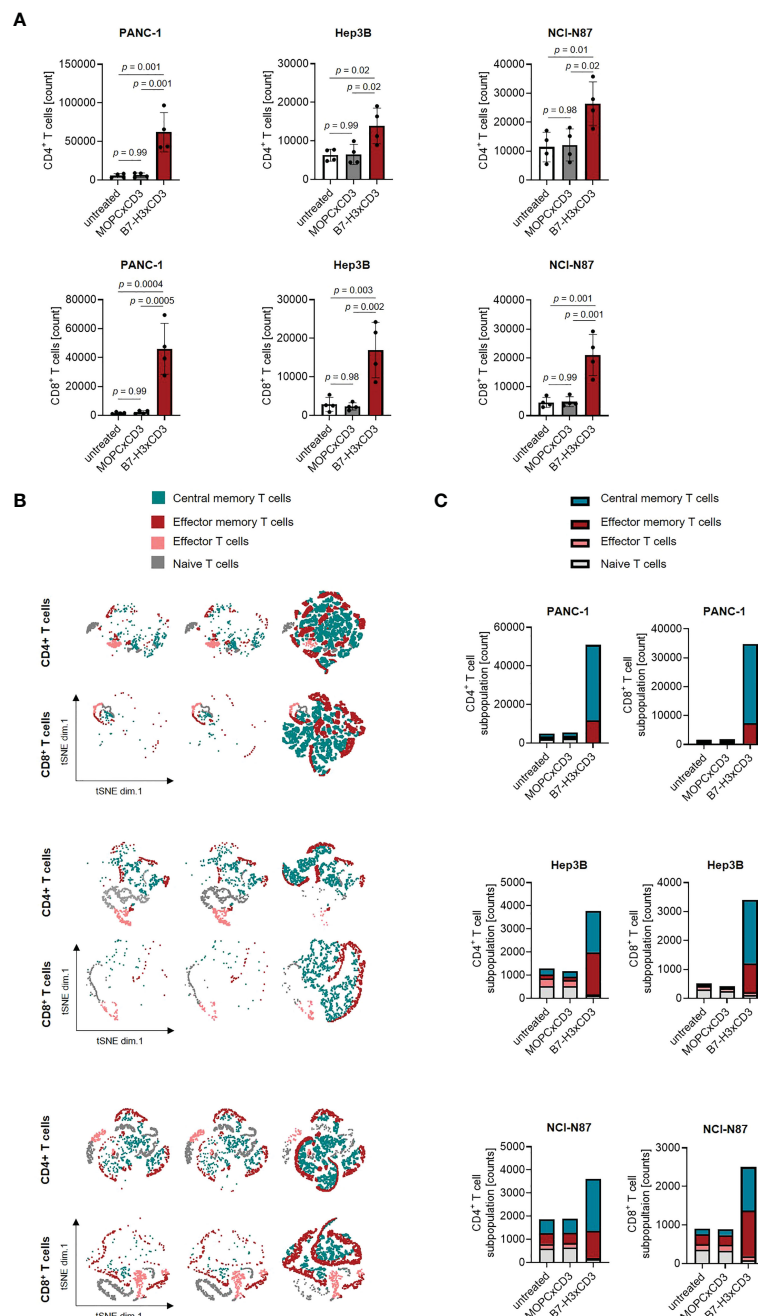


FIGURE 4

Induction of T cell proliferation and memory T cell populations by CC-3. **(A)** Monocyte-depleted PBMC of healthy donors ($n=4$) were labeled with CellTrace™ Violet cell dye and incubated with or without MOPCxCD3 or CC-3 (1 nM each) in the presence of PANC-1, Hep3B, or NCI-N87 cells (E: T 4:1). After 72 h, PBMC were reexposed to fresh target cells and the respective treatment for additional 72 h. On day 6, proliferation was determined by flow cytometry. **(B, C)** PBMC of healthy donors ($n=5$) were incubated with or without MOPCxCD3 or CC-3 (1 nM each) in the presence of PANC-1, Hep3B, or NCI-N87 cells (E:T 1:1). After 72 h, cells were reexposed to fresh target cells and the respective treatment. On day 6, subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were determined by flow cytometric analysis. Effector T cells were defined as CD62L⁻CD45ro⁻, naive T cells as CD62L⁺CD45ro⁺, effector memory T cells as CD62L⁻CD45ro⁺ and central memory T cells as CD62L⁺CD45ro⁺. **(B)** representative t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) plots and **(C)** pooled data are shown. E:T, effector to target. PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

reasoned that CC-3 would also constitute a promising compound for other gastrointestinal cancer entities. Initial flow cytometric analyses revealed that indeed high B7-H3 levels were expressed in all tested pancreatic, hepatic and gastric cancer cell lines, confirming suitability as therapeutic target. Subsequent functional

characterization documented strong induction of T cell activation, degranulation and secretion of the “antitumor cytokines” like IFN γ and IL-2 as well as potent induction of tumor cell lysis. In addition, we could demonstrate that CC-3 potently induces T cell proliferation, which is a critical prerequisite to enable treatment

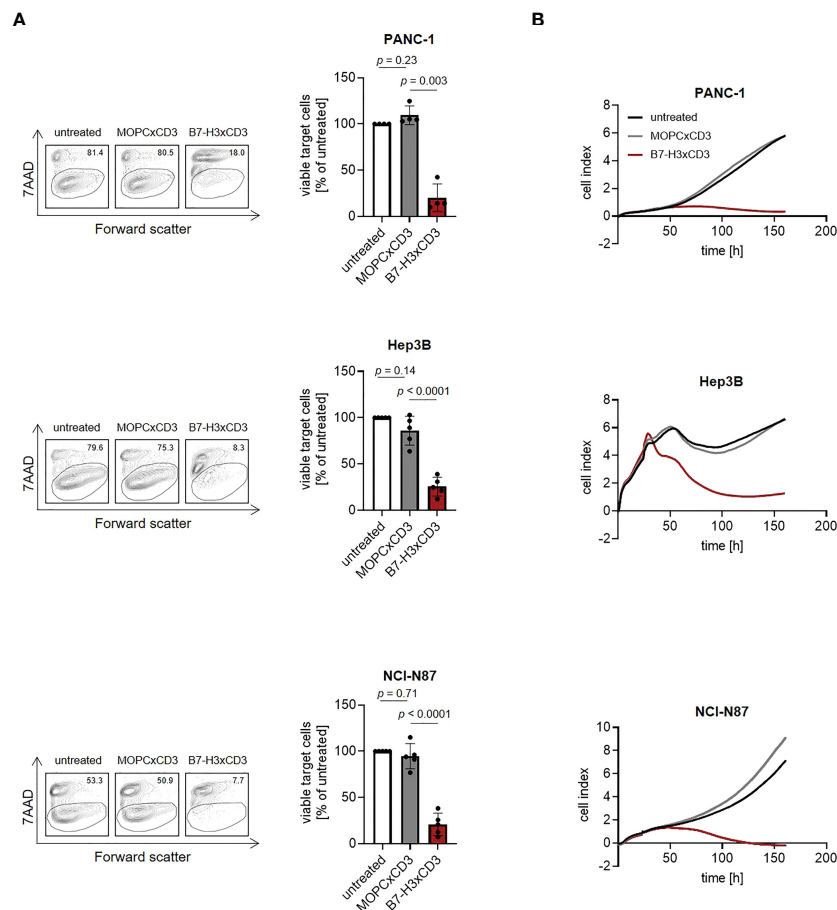


FIGURE 5

Induction of tumor cell lysis mediated by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with the indicated target cells at an E:T ratio of 4:1 in the presence or absence of MOPCxCD3 or CC-3 (1 nM each). (A) Lysis of PANC-1, Hep3B and NCI-N87 cells was determined by flow cytometry-based lysis assay after 72 h. Left panels depict exemplary results right panels show combined data obtained with PBMC of five independent donors. (B) Long-term cytotoxic effects of PBMC of healthy donors (n=4) against PANC-1, NCI-N87 and Hep3B cells was determined using xCELLigence system. E:T, effector to target.

of patients with higher disease burden. In this context it is particularly noteworthy that CC-3 triggered mainly the proliferation of memory T cells, which are considered to be crucial for therapeutic success (19, 20). These findings support and extend our recently reported data for CC-3 in CRC (16). Of note, various factors like the tumor microenvironment and T cell exhaustion influence the therapeutic success of bsAb treatment and are not accounted for in our experimental systems. Additional preclinical investigations to address the influence of these and other confounders of treatment efficacy are warranted, and eventually could be correlated with findings upon clinical evaluation.

Several approaches targeting B7-H3 are currently under clinical investigation, reflecting the growing interest in this target for antibody-based immunotherapy. This includes among others CAR T cell-based therapies (NCT04897321, NCT05211557, NCT05341492, NCT04483778, NCT05323201, NCT05241392, NCT05474378, NCT03198052, NCT04185038, NCT05366179, NCT04670068, NCT05143151) which are being evaluated in various tumor entities including hepatocellular carcinoma and advanced pancreatic carcinoma.

In conclusion, the preclinical data reported in this study documenting efficacy of CC-3 in pancreatic, hepatic and gastric cancer in our view clearly indicate that this B7-H3xCD3 bsAb constitutes a promising immunotherapeutic compound. GMP compliant production of CC-3 is presently ongoing to enable clinical evaluation.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by IRB (ethics committee of the Faculty of Medicine of the Eberhard Karls Universitaet Tuebingen) at the University Hospital Tuebingen and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; reference number 13/2007 V. Human

material was collected after obtaining informed consent. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

ML designed and performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. LZ designed experiments, provided critical reagents and contributed to the study design. LW designed and performed experiments. GJ, SB and UL provided critical reagents. JH wrote and critically revised the manuscript. HS contributed to the study design, critically revised the manuscript, and supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This project was supported by the Deutsche Krebshilfe (70113999), the Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.2), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy - EXC 2180 - 39090067 and DFG, project number SA 1360/9-3.

Acknowledgments

The authors thank Celine Reiß and Michael Beller for excellent technical assistance. Flow cytometry sample acquisition was

performed on shared instruments of the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen.

Conflict of interest

GJ, HS and LZ are listed as inventors on the patent application "Antibodies targeting, and other modulators of, the CD276 antigen, and uses thereof," EP3822288A1, applicant is German Cancer Research Center, Heidelberg, and Medical Faculty University of Tuebingen, Germany.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1163136/full#supplementary-material>

References

- Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* (2020) 159(1):335–349.e15. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.068
- Janjigian YY, Kawazoe A, Yanez P, Li N, Lonardi S, Kolesnik O, et al. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer. *Nature* (2021) 600(7890):727–30. doi: 10.1038/s41586-021-04161-3
- Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* (2020) 382(20):1894–905. doi: 10.1056/NEJMoa1915745
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* (1992) 11(11):3887–95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (1996) 271(5256):1734–6. doi: 10.1126/science.271.5256.1734
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* (2013) 5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930
- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* (2008) 321(5891):974–7. doi: 10.1126/science.1158545
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* (2001) 2(3):269–74. doi: 10.1038/85339
- Zhou WT, Jin WL. B7-H3/CD276: An emerging cancer immunotherapy. *Front Immunol* (2021) 12:701006. doi: 10.3389/fimmu.2021.701006
- Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al. B7-H3: An attractive target for antibody-based immunotherapy. *Clin Cancer Res* (2021) 27(5):1227–35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2584
- Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (2008) 14(16):5150–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0536
- Mehta NK, Pflueger M, Meetze K, Li B, Sindel I, Vogt F, et al. A novel IgG-based FLT3xCD3 bispecific antibody for the treatment of AML and b-ALL. *J Immunother Cancer* (2022) 10(3). doi: 10.1136/jitc-2021-003882
- Zekri L, Vogt F, Osburg L, Muller S, Kauer J, Manz T, et al. An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med* (2021) 13(2):e11902. doi: 10.15252/emmm.201911902
- Heitmann JS, Walz JS, Pflugler M, Kauer J, Schlenk RF, Jung G, et al. Protocol of a prospective, multicentre phase I study to evaluate the safety, tolerability and preliminary efficacy of the bispecific PSMAXCD3 antibody CC-1 in patients with castration-resistant prostate carcinoma. *BMJ Open* (2020) 10(10):e039639. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039639
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* (2012) 9(7):671–5. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, et al. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. *Mol Ther* (2023). doi: 10.1016/j.ymthe.2023.02.010
- Gaudino SJ, Kumar P. Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Front Immunol* (2019) 10:360. doi: 10.3389/fimmu.2019.00360
- Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. "Natural regulators": NK cells as modulators of T cell immunity. *Front Immunol* (2016) 7:235. doi: 10.3389/fimmu.2016.00235

19. Ando M, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol Med* (2020) 43(1):1–9. doi: 10.1080/25785826.2019.1698261
20. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* (2006) 211:214–24. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00391.x
21. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* (2008) 359(4):378–90. doi: 10.1056/NEJMoa0708857
22. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* (2018) 391(10126):1163–73. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1
23. Pavlakis N, Sjoquist KM, Martin AJ, Tsobanis E, Yip S, Kang YK, et al. Regorafenib for the treatment of advanced gastric cancer (INTEGRATE): A multinational placebo-controlled phase II trial. *J Clin Oncol* (2016) 34(23):2728–35. doi: 10.1200/JCO.2015.65.1901
24. Shlomai A, Leshno M, Goldstein DA. Regorafenib treatment for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib—a cost-effectiveness analysis. *PLoS One* (2018) 13(11):e0207132. doi: 10.1371/journal.pone.0207132
25. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the national cancer institute of Canada clinical trials group. *J Clin Oncol* (2007) 25(15):1960–6. doi: 10.1200/JCO.2006.07.9525
26. Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased alpha-fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2019) 20(2):282–96. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30937-9
27. Fuchs CS, Shitara K, Di Bartolomeo M, Lonardi S, Al-Batran SE, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab with cisplatin and fluoropyrimidine as first-line therapy in patients with metastatic gastric or junctional adenocarcinoma (RAINFALL): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2019) 20(3):420–35. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30791-5
28. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* (2010) 376(9742):687–97. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X
29. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: Phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol* (2018) 4(5):e180013. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.0013
30. Calderaro J, Rousseau B, Amadeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, et al. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship with clinical and pathological features. *Hepatology* (2016) 64(6):2038–46. doi: 10.1002/hep.28710
31. Ratti M, Lampis A, Hahne JC, Passalacqua R, Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci* (2018) 75(22):4151–62. doi: 10.1007/s00018-018-2906-9
32. Karamitopoulou E. Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features. *Br J Cancer* (2019) 121(1):5–14. doi: 10.1038/s41416-019-0479-5
33. Li HB, Yang ZH, Guo QQ. Immune checkpoint inhibition for pancreatic ductal adenocarcinoma: limitations and prospects: a systematic review. *Cell Commun Signal* (2021) 19(1):117. doi: 10.1186/s12964-021-00789-w
34. Mohr R, Jost-Brinkmann F, Ozdirik B, Lambrecht J, Hammerich L, Loosen SH, et al. Lessons from immune checkpoint inhibitor trials in hepatocellular carcinoma. *Front Immunol* (2021) 12:652172. doi: 10.3389/fimmu.2021.652172
35. Pishvaian M, Morse MA, McDevitt J, Norton JD, Ren S, Robbie GJ, et al. Phase I dose escalation study of MEDI-565, a bispecific T-cell engager that targets human carcinoembryonic antigen, in patients with advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *Clin Colorectal Cancer* (2016) 15(4):345–51. doi: 10.1016/j.clcc.2016.07.009
36. Kebeke M, Goebeler ME, Wolf M, Hasenburger A, Seggewiss-Bernhardt R, Ritter B, et al. A multicenter phase 1 study of solitomab (MT110, AMG 110), a bispecific EpCAM/CD3 T-cell engager (BiTE(R)) antibody construct, in patients with refractory solid tumors. *Oncoimmunology* (2018) 7(8):e1450710. doi: 10.1080/2162402X.2018.1450710
37. Morris ZS, Guy EI, Francis DM, Gressett MM, Werner LR, Carmichael LL, et al. *In situ* tumor vaccination by combining local radiation and tumor-specific antibody or immunocytokine treatments. *Cancer Res* (2016) 76(13):3929–41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2644
38. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hammerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* (2002) 62(5):1462–70. doi: 10.3892/ijmm.2012.1212
39. Zhao X, Li DC, Zhu XG, Gan WJ, Li Z, Xiong F, et al. B7-H3 overexpression in pancreatic cancer promotes tumor progression. *Int J Mol Med* (2013) 31(2):283–91. doi: 10.3892/ijmm.2012.1212
40. Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, Yanagita S, Ishigami S, Natsugoe S. B7-H3 expression in gastric cancer: a novel molecular blood marker for detecting circulating tumor cells. *Cancer Sci* (2011) 102(5):1019–24. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01877.x
41. Seaman S, Zhu Z, Saha S, Zhang XM, Yang MY, Hilton MB, et al. Eradication of tumors through simultaneous ablation of CD276/B7-H3-Positive tumor cells and tumor vasculature. *Cancer Cell* (2017) 31(4):501–515.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2017.03.005
42. Qin X, Zhang H, Ye D, Dai B, Zhu Y, Shi G. B7-H3 is a new cancer-specific endothelial marker in clear cell renal cell carcinoma. *Onco Targets Ther* (2013) 6:1667–73. doi: 10.2147/ott.S53565
43. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(49):19458–63. doi: 10.1073/pnas.0709802104
44. Bin Z, Guangbo Z, Yan G, Huan Z, Desheng L, Xueguang Z. Overexpression of B7-H3 in CD133+ colorectal cancer cells is associated with cancer progression and survival in human patients. *J Surg Res* (2014) 188(2):396–403. doi: 10.1016/j.jss.2014.01.014
45. Liu Z, Zhang W, Phillips JB, Arora R, McClellan S, Li J, et al. Immunoregulatory protein B7-H3 regulates cancer stem cell enrichment and drug resistance through MVP-mediated MEK activation. *Oncogene* (2019) 38(1):88–102. doi: 10.1038/s41388-018-0407-9
46. Zhang Y, He L, Sadagopan A, Ma T, Dotti G, Wang Y, et al. Targeting radiation-resistant prostate cancer stem cells by B7-H3 CAR T cells. *Mol Cancer Ther* (2021) 20(3):577–88. doi: 10.1158/1535-7163.Mct-20-0446
47. Yonesaka K, Haratani K, Takamura S, Sakai H, Kato R, Takegawa N, et al. B7-H3 negatively modulates CTL-mediated cancer immunity. *Clin Cancer Res* (2018) 24(11):2653–64. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-17-2852
48. Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(30):10277–8. doi: 10.1073/pnas.0805458105
49. Brustmann H, Igaz M, Eder C, Brunner A. Epithelial and tumor-associated endothelial expression of B7-H3 in cervical carcinoma: relation with CD8+ intraepithelial lymphocytes, FIGO stage, and phosphohistone H3 (PHH3) reactivity. *Int J Gynecol Pathol* (2015) 34(2):187–95. doi: 10.1097/pgp.0000000000000116
50. Sun TW, Gao Q, Qiu SJ, Zhou J, Wang XY, Yi Y, et al. B7-H3 is expressed in human hepatocellular carcinoma and is associated with tumor aggressiveness and postoperative recurrence. *Cancer Immunol Immunother* (2012) 61(11):2171–82. doi: 10.1007/s00262-012-1278-5
51. Li Y, Yang X, Wu Y, Zhao K, Ye Z, Zhu J, et al. B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* (2017) 8(42):71725–35. doi: 10.18632/oncotarget.17847

Supplementary Figures

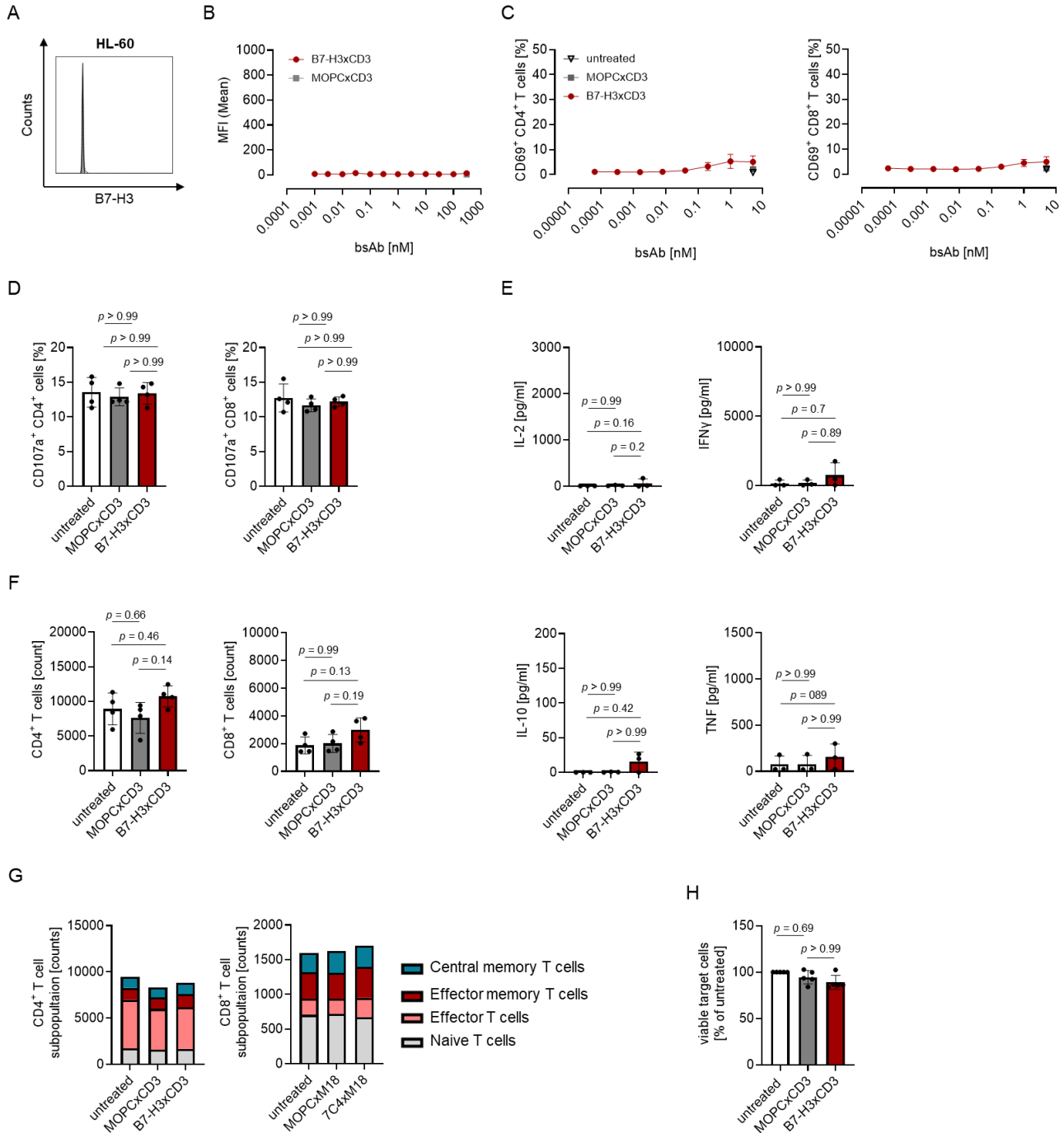


Figure S1: Dependence of CC-3 activity on target antigen-binding. **A** HL-60 cells were stained using a monoclonal B7-H3 antibody (clone 7C4) followed by an anti-mouse PE conjugate and analyzed using flow cytometry, documenting negativity for B7-H3. **B** HL-60 cells were incubated with increasing concentrations of the B7-H3xCD3 bsAb or the respective isotype control MOPCxCD3,

followed by an anti-human PE conjugate and analyzed by flow cytometry, documenting absence of unspecific binding. **C-H** Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with the B7-H3 negative HL-60 cells in the presence or absence of CC-3 or MOPCxCD3. If not indicated otherwise, constructs were used at 1 nM. **C** Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (E:T 4:1) was determined by flow cytometric analysis for CD69 expression after 24 hours. Combined data obtained with PBMC of three independent donors are shown. **D** Degranulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (E:T 4:1) was determined by analyzing expression of CD107a after 4 h. Combined data obtained with PBMC of four independent donors are shown. **E** IL-2, IFN γ , IL-10 and TNF levels in culture supernatants were measured after 24 h using LEGENDplex assays. **F-G** After 72 h, PBMC were reexposed to fresh HL-60 cells and the respective treatment for additional 72 h. **F** Proliferation of CTV labelled CD4⁺ and CD8⁺ T cells (E:T 4:1) was determined by flow cytometric analysis of cell counts. **G** Subpopulations within CD4⁺ and CD8⁺ T cells were determined by flow cytometric analysis. Effector T cells were defined as CD62L⁻CD45ro⁻, naive T cells as CD62L⁺CD45ro⁻, effector memory T cells as CD62L⁻CD45ro⁺ and central memory T cells as CD62L⁺CD45ro⁺. **H** Lysis of HL-60 cells was determined by flow cytometric analysis. E:T, effector to target; MFI, mean fluorescence intensities; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

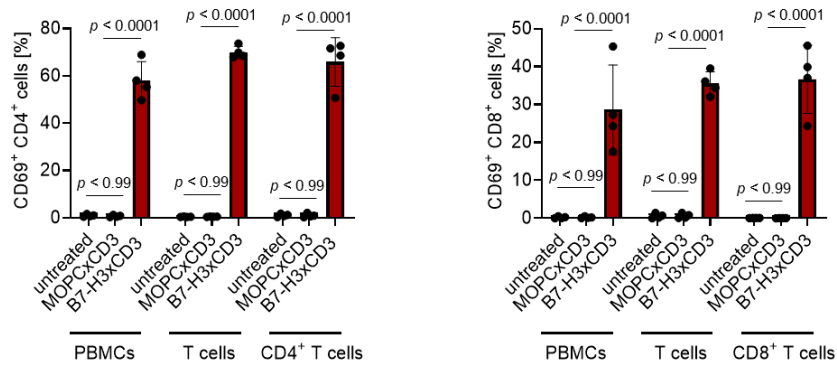
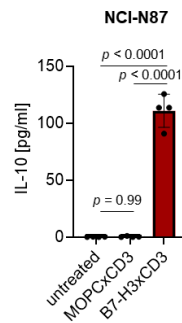
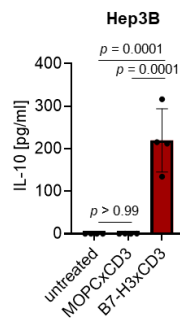
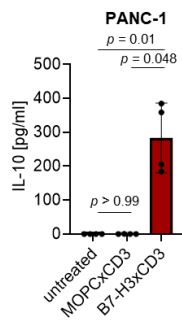


Figure S2: Activation of T cells within PBMCs and isolated T cell subsets by CC-3. Recombinant B7-H3 protein was immobilized to plastic and incubated with PBMC preparations or isolated T cells of healthy donors and MOPCxCD3 or CC-3 (5nM each). Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by flow cytometric analysis for CD69 expression after 72 h. PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

A



B

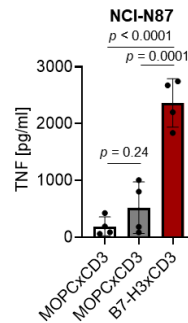
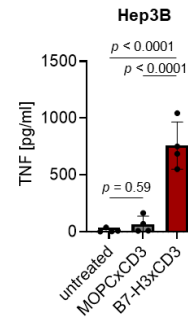
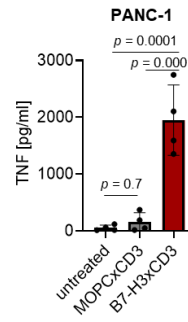


Figure S3: Induction of cytokine secretion by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with the indicated tumor cell lines (E:T 4:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPCxCD3 (1 nM each). IL-10 and TNF levels in culture supernatants were measured after 24 h using LEGENDplex assays. Combined data obtained with PBMC of four independent donors are shown. E:T, effector to target; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

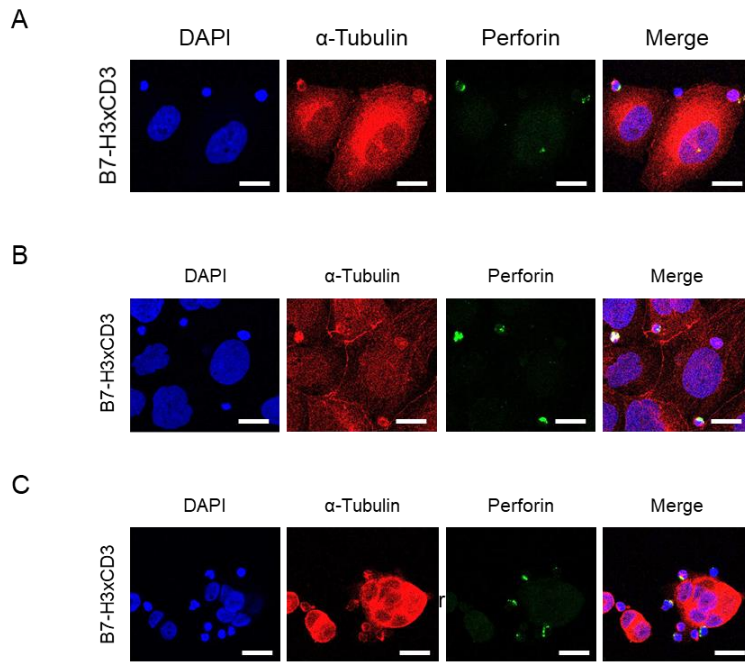


Figure S4 Induction of Perforin expression by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors were incubated with the target cell lines **A** PANC-1, **B** Hep3B or **C** NCI-N87 (E:T 4:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPCxCD3 (1 nM each) for 3 h and subsequently stained for Perforin (green) and α -Tubulin (red). DAPI was used for counterstaining. Scale bars indicate 20 μ m, original magnification x63. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; E:T, effector to target.

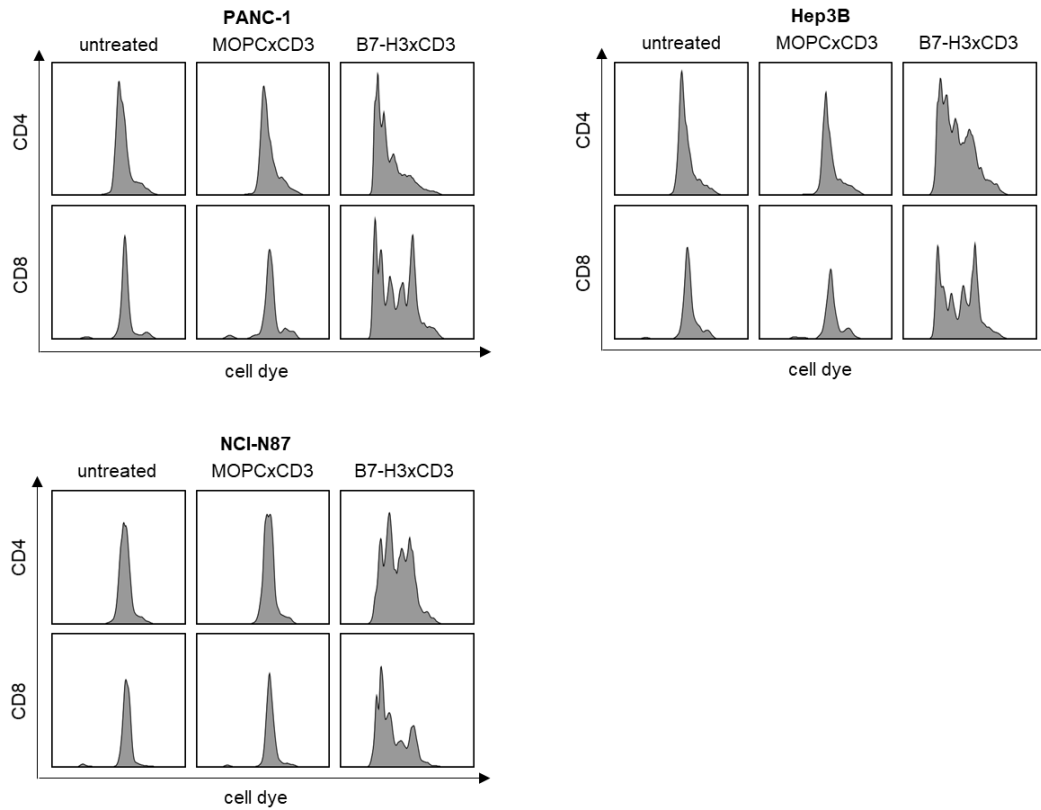


Figure S5 Induction of T cell proliferation by CC-3. Monocyte-depleted PBMC of healthy donors (n=4) were labelled with CellTrace™ Violet cell dye and incubated with or without MOPCxCD3 or CC-3 (1 nM each) in the presence of the indicated target cell lines (E:T 4:1). After 72 h, cells were reexposed to fresh target cells and the respective treatment. After additional 24 h, cell dye dilution was determined by flow cytometry. E:T, effector to target; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

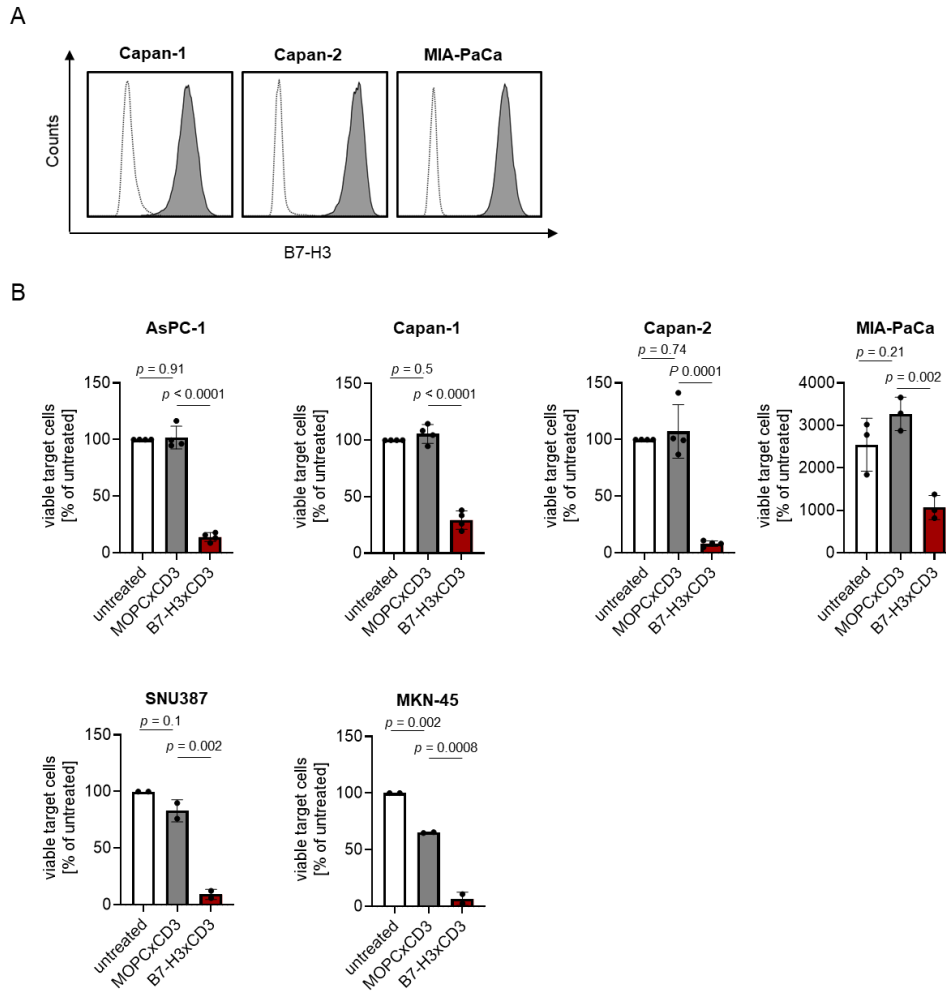



Figure S6 Extended functional characterization of CC-3. **A** The indicated cancer cell lines were stained using a murine monoclonal B7-H3 antibody (clone 7C4) followed by an anti-mouse PE conjugate and analyzed using flow cytometry. B7-H3 expression on pancreatic cell lines Capan-1, Capan-2 and MIA-PaCa is shown (shaded peaks, anti-B7H3; open peaks, control). **B** Monocyte-depleted PBMC of healthy donors (at least 2 donors) were incubated with the indicated target cells at an E:T ratio of 4:1 in the presence or absence of MOPCxCD3 or CC-3 (1 nM each). Lysis of Capan-1, Capan-2, MIA-PaCa, SNU387 and MKN-45 was determined by flow cytometry-based lysis assay after 72 h. E:T, effector to target; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies

Martina Svenja Lutz ^{1,2}, Boris Klimovich,^{1,2} Stefanie Maurer,^{1,3} Jonas S Heitmann,^{1,2} Melanie Märklin,^{1,2} Latifa Zekri,^{1,4} Gundram Jung,^{2,4} Helmut R Salih,^{1,2} Clemens Hinterleitner^{2,5}

To cite: Lutz MS, Klimovich B, Maurer S, *et al.* Platelets subvert antitumor efficacy of T cell-recruiting bispecific antibodies. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;**10**:e003655. doi:10.1136/jitc-2021-003655

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2021-003655>).

Accepted 13 December 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

¹CCU Translational Immunology, Department of Internal Medicine, UKT, Tübingen, Germany

²Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies, University of Tübingen, Tübingen, Germany

³Department of Radiology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, New York, USA

⁴Immunology, University of Tübingen Interfaculty Institute of Cell Biology, Tübingen, Germany

⁵Department of Medical Oncology and Pneumology (Internal Medicine VIII), UKT, Tübingen, Germany

Correspondence to
Professor Helmut R Salih;
helmut.salih@med.uni-tuebingen.de

ABSTRACT

T cell-based immunotherapy, for example, with T cell-recruiting bispecific antibody (bsAb), has revolutionized oncological treatment. However, many patients do not respond to treatment, and long-term remissions are still rare. Several tumor immune evasion mechanisms have been reported to counteract efficiency of T cell-engaging therapeutics. Platelets largely affect cancer pathophysiology by mediating tumor invasion, metastasis, and immune evasion. On treatment of patients in a clinical trial with a PSMA×CD3 bsAb (NCT04104607), we observed profound treatment-associated platelet activation, mirrored by a decrease of total platelet count. On modeling the treatment setting, we found that platelet activation significantly reduced bsAb-mediated CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reactivity as revealed by impaired T-cell degranulation, secretion of perforin, and ultimately, inhibition of target cell lysis. This effect occurred in a transforming growth factor beta (TGF-β)-dependent manner and was not restricted to PSMA×CD3 bsAb, but rather observed with various CD3-directed bispecific constructs, including the approved CD19×CD3 bsAb blinatumomab. BsAb-mediated T-cell reactivity could be restored by platelet inhibition and specifically by blocking the TGF-β axis. Together, our findings demonstrate that platelets undermine the efficacy of T cell-recruiting bsAb and identify modulation of platelet function as a means to reinforce the effectiveness of bsAb treatment.

BACKGROUND

Immunotherapeutic strategies such as T cell-recruiting bispecific antibodies (bsAbs), chimeric antigen receptor (CAR) T cells, and immune checkpoint inhibition demonstrate remarkable efficacy in cancer treatment.^{1–4} However, long-term remissions are still rare, and many patients do not respond at all to treatment.^{5,6} Various immune escape mechanisms have been identified to undermine the efficacy of T cell-engaging therapeutics.^{6,7} Particularly in solid tumors, immunosuppressive cells in the tumor microenvironment (TME), including cancer-associated fibroblasts, regulatory T cells, and myeloid-derived suppressor cells, have been described to suppress antitumor immunity.^{7,8} In addition, numerous studies demonstrated that elevated

platelet counts and expression of certain platelet surface markers are associated with an advanced disease stage and worse outcome.^{9–11} Platelets mediate tumor cell survival and tumor growth, among others, by secretion or expression of P-selectin, platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, and several others.¹² Notably, platelets may also promote tumor immune evasion by impairing natural killer (NK) and T-cell function.^{13–16} However, data documenting the effect of platelet–tumor–immune cell interaction in humans that elucidate the underlying mechanisms are largely lacking. We report here our clinical observation that patients treated with a bispecific PSMA×CD3 antibody in a multicenter phase I study (NCT04104607)^{17,18} display treatment-related platelet activation and transient decrease of platelet count. Based on this observation, we modeled the effect of platelets on bsAb-induced T-cell antitumor reactivity and demonstrate that activated platelets undermine bsAb-mediated T-cell reactivity in a transforming growth factor beta (TGF-β)-dependent manner, indicating that therapeutic modulation of platelet function may serve to reinforce efficacy of bsAb treatment.

METHODS

Cell lines

The tumor cell lines LNCaP, SaOS-2, and SEM were purchased from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Mycoplasma contamination was excluded via a PCR-based method. Authenticity was determined by validating the respective immunophenotype described by the provider using flow cytometry.

Primary patient material

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors were isolated by density gradient centrifugation using Biocoll cell separation solution (Biochrom,

Berlin, Germany). Platelets were isolated from blood of healthy donors and patients with prostate cancer receiving PSMA×CD3 (CC-1) in our multicenter phase I study (NCT04104607) treated at the University Hospital Tuebingen. Written informed consent in accordance with the Helsinki protocol was given in all cases.

Preparation of platelets

Citrated blood was briefly centrifuged for 20 min at 120×g. After harvesting platelet-rich plasma, platelets were washed with citrate wash buffer (128 mmol/L NaCl, 11 mmol/L glucose, 7.5 mmol/L Na₂HPO₄, 4.8 mmol/L sodium citrate, 4.3 mmol/L NaH₂PO₄, 2.4 mmol/L citric acid, and 0.35% bovine serum albumin) and resuspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI1640) containing 10% fetal calf serum (FCS).

For platelet activation *ex vivo* and generation of platelet releasate (PR), 10 μM of thrombin receptor activator peptide 6 (TRAP-6) was added to the platelets. In the next step, platelet suspensions were stirred for 1 min and subsequently centrifuged for 15 min at 2200×g. The supernatant was used as PR. For platelet blocking, washed platelets were incubated with dabigatran (5 mg/mL) or indomethacin (10 μg/mL). For blocking of TGF-β receptor signaling, a combination of an ALK5 inhibitor (20 μM, SB431542; Selleckchem, Houston, Texas, USA) and anti-TGF-β antibody (2 μg/mL, clone MAB1835; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) was used.

Platelet aggregation

Platelet aggregation was analyzed using the four-channel light transmission platelet aggregometer APACT 4004 (Elitech, Puteaux, France) according to the manufacturer's instructions. For platelet stimulation, the bsAb PSMA×CD3 (CC-1),¹⁸ NKG2D×CD3,^{19 20} or CD19×CD3 (blinatumomab) were used. TRAP-6 (10 μM) served as positive control.

Analysis of cytokine secretion

To analyze cytokine secretion, supernatant of platelets and PR was collected and analyzed for interleukin (IL)-2, tumor necrosis factor, TGF-β1, interferon gamma, IL-6 and CXCL8 using LEGENDplex assays (BioLegend, San Diego, California, USA).

Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, tumor cells, PBMCs, and platelets were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS), (pH 7.4) for 10 min at -20°C. Cells were blocked using 5% BSA, 0.2% Triton X-100, and 0.1% Tween for 60 min. Blocking buffer was aspirated and cells were washed three times with phosphate-buffered saline with Tween® detergent (PBST), (PBS+0.1% TWEEN 20). Staining was conducted using unlabeled primary antibodies against CD41 (clone HIP8; Invitrogen, Carlsbad, California, USA), CD61 (clone SJ19-09, Invitrogen), CD62P (clone AK4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), tubulin (clone 11H10), and perforin (clone δG9); Alexa-Fluor

594 labeled anti-rabbit or Alexa-Fluor 488 labeled anti-mouse (both Invitrogen) were used as secondary antibodies. For staining of actin, fluorescein-conjugated phalloidin (Abcam, Cambridge, Great Britain) was used according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted in fluorescent-mounting medium. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for counterstaining. Image acquisition was performed using an Olympus BX63 microscope and a DP80 camera (Olympus, Shinjuku, Japan). Images were processed using ImageJ.²¹

Flow cytometry

To determine their activation status, platelets were stained using the directly fluorescence-labeled mAbs CD41-PE or CD41-PECy5 (both clone HIP8) and CD62P-FITC (clone AK-4) or the corresponding isotype control (all from BD Biosciences, San Diego, California, USA). For analysis of surface expression levels, unlabeled antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA), (clone 10B3),¹⁸ CD3 (clone UCHT-1; BioCell Technology, Newport Beach, California, USA), ADAM10 (clone 163003, R&D Systems), and a biotinylated NKG2D-Fc²² were used followed by a goat anti-mouse PE conjugate (Dako, Glostrup, Denmark) or a streptavidin-conjugated phycoerythrin (PE) conjugate (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and a CD19-PE mAb (BD Biosciences). For detection and blocking of CD40L, the CD40L antibody clone MK13A4 (Enzo Life Sciences, Lausen, Swiss) was used. For studies on T-cell activation and degranulation, the mAbs CD69-PE and CD107a-PE (BD Pharmingen) as well as CD3-APC/Fire750, CD4-APC, CD8-FITC, and CD56-BV711 (BioLegend) were used. For flow cytometric analysis of target cell lysis, LNCaP cells were loaded with 2.5 μM CellTrace Violet cell proliferation dye (Thermo Fisher Scientific) and cultured with PBMC (effector to target (E:T) ratio 2.5:1) in the presence or absence of PSMA×CD3 (200 ng/mL) and platelets (platelet to target (P:T) 100:1). Standard calibration beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were used to ensure the analysis of equal assay volumes and therefore to account for the number of target cells that had vanished from the culture. Dead cells were excluded from analysis by 7-AAD (BioLegend). Measurements were performed using a FACS Canto II or FACS Fortessa (BD Biosciences), and data were analyzed using the software FlowJo V.10 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

T-cell activation and degranulation assays

To determine activation and degranulation in the presence of target cells, tumor cells were cultured with allogenic PBMCs of healthy donors and with or without platelets or PR in the indicated E:T:P ratios for 4 and 24 hours, respectively. For analysis of degranulation after 4 hours, CD107a-PE (1:25), BD GolgiStop, and BD GolgiPlug (1:1000, both BD Biosciences) were added to the coculture. Analysis was conducted using flow cytometry.

Cytotoxicity assays

Long-term cytotoxicity analyses were performed using the IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Essen BioScience, Sartorius, Göttingen). Tumor cells were cultured with PBMCs of healthy donors (E:T ratio of 5:1) in the presence or absence of PSMA×CD3 (200 ng/mL) or PR. The TGF- β axis was blocked using the combination of an ALK5 inhibitor (SB431542, 20 μ M) (Selleckchem) and anti-TGF- β antibody (clone MAB1835, 2 μ g/mL) (R&D Systems). Live cell imaging pictures were taken every 4 hours with $\times 10$ magnification. To quantify living cells, confluences were normalized to the respective measurement at $t=0$ hour.

Statistics

Student's *t* test, Mann-Whitney *U* test, one-way analysis of variance (ANOVA) and Friedman's test were used for continuous variables. If significant differences by ANOVA were found, groupwise comparison was done (Tukey's multiple comparison test). If significant differences were found by Friedman's test, Dunn's multiple comparisons test was used. Bars and error bars represent means of results and SE of the mean, respectively. All statistical tests were considered statistically significant when the *p* value was below 0.05. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism V.8.1.0. Raw data can be found in online supplemental file 2.

RESULTS

Treatment with T cell-recruiting bsAbs induces platelet activation

Although it has been shown that platelets, within the TME, allow for tumor immune escape,^{13 15 16} their role in the context of immunotherapy is largely unknown. When we monitored platelet counts in patients with prostate cancer treated with the bispecific PSMA×CD3 antibody CC-1,^{17 23} we observed a treatment-associated decrease in all study subjects (figure 1A,B). Platelet counts were inversely related to serum levels of soluble IL-2 receptor, indicating an association with T-cell activation induced by bsAb. Application of the PSMA×CD3 bsAb further was associated with upregulation of the activation marker P-selectin (CD62P) on platelets (figure 1C,D). Since we also observed a negative association of platelet count and platelet activation (CD62P expression) (figure 1E), we hypothesized that tumor-T cell interaction induced by the bsAb caused platelet activation, which in turn led to the decrease of total platelet count.

After excluding that the PSMA×CD3 bsAb alone induced platelet activation or aggregation (figure 1F-H), we established a coculture system using PSMA-expressing prostate cancer cells (LNCaP) and PBMC to mimic tumor-platelet-immune cell interactions in the presence or absence of the bsAb CC-1. As observed in patients, presence of the bsAb during tumor-platelet-immune cell interaction (figure 1I) resulted in profound platelet activation (figure 1J-L). Since platelet activation was most

prominent when platelets were coincubated with stimulated immune cells (figure 1L), we hypothesized that activated T cells might trigger platelet activation in our experimental setting. In line with published data that T cells can stimulate platelets via the CD40-CD40L axis,²⁴ we observed upregulation of CD40L preferentially on activated CD4⁺ T cells (online supplemental figure 2A,B), and blocking CD40-CD40L interaction reduced platelet activation with the effect closely failing to reach statistical significance (online supplemental figure 2C). Overall, we conclude that platelets represent so far underestimated players that can affect the efficacy of T cell-engaging bsAb.

Platelets impair bsAb-induced T-cell activity

To further characterize the influence of platelets on PSMA×CD3 induced T cell reactivity, we cultured LNCaP cells with PBMCs and platelets at different platelet-immune cell ratios in the presence or absence of the PSMA×CD3 bsAb. CC-1-mediated activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (CD69 expression) was inversely associated with effector to platelet ratios (figure 2A,B). To exclude that this effect exclusively occurred with the target antigen PSMA and/or specifically with the employed tumor cells, we extended our model system by using a recently described treatment model for sarcoma using a NKG2D×CD3 bispecific fusion protein (BFP)²⁰ (figure 2D) as well as a leukemia model employing a B-ALL cell line treated with the CD19×CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) blinatumomab (figure 2E). The inhibitory effect of platelets on CD3-mediated T-cell activation was found to be independent from the format of the T cell-recruiting compound (bsAb, BFP, and BiTE) (figure 2C), tumor entity, and target antigen (figure 2D,E), with none of the constructs inducing platelet activation or aggregation in the absence of effector cells (online supplemental figure 1A-C). Alike in patients treated with the PSMA×CD3 bsAb, a treatment-associated decrease of total platelet counts was observed in two patients with B-ALL treated with blinatumomab (online supplemental figure 3), providing further evidence that platelets might affect T-cell activation independently of tumor entity, target antigen or T cell-recruiting agent. Further analyses in our prostate cancer model using the bsAb PSMA×CD3 revealed a reduction of bsAb-induced degranulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (CD107a expression) on co-incubation with platelets (figure 2F).

Impairment of bsAb-induced T-cell reactivity is mediated via the TGF- β axis

Next, we analyzed how platelet-mediated inhibition of T-cell activation and degranulation affected bsAb-induced tumor cell lysis. Treatment with the bsAb PSMA×CD3 significantly increased the number of perforin-secreting immune effector cells (figure 3A-C) and was significantly reduced by the presence of platelets. This was mirrored by profound platelet-mediated inhibition of target cell lysis quantified by flow cytometry-based cytotoxicity assays (figure 3D).

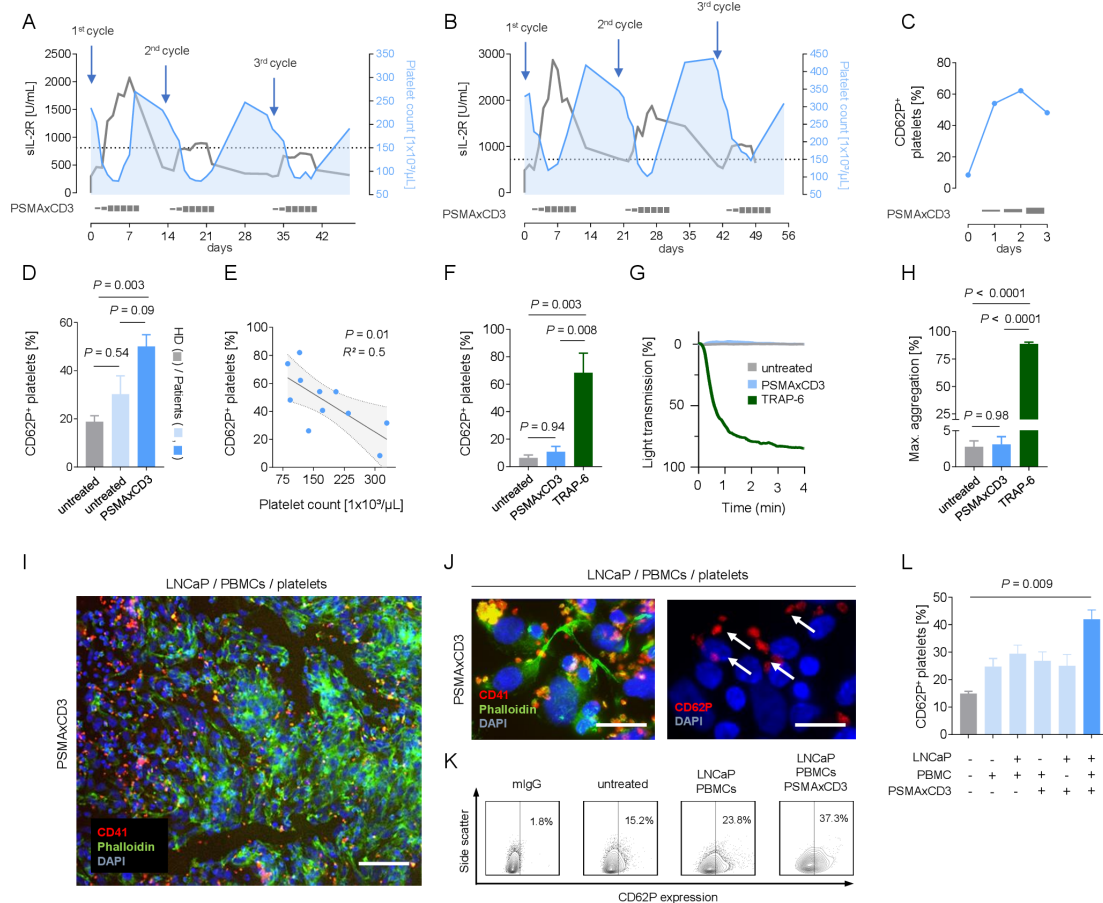


Figure 1 Treatment with bispecific antibody leads to platelet activation. (A,B) Association of platelet count and sIL-2R concentration in two patients with prostate cancer receiving bispecific PSMA×CD3 (CC-1) antibody. (C) Time course of platelet activation (CD62P expression) on CC-1 treatment. (D) Platelet activation (CD62P expression) in untreated healthy donors (gray, n=5), untreated patients with prostate cancer (light blue, n=4) and in patients with prostate cancer receiving PSMA×CD3 (dark blue, n=5). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (E) Association of CD62P expression and total platelet count. Statistical significance was calculated using simple linear regression analysis. (F) Lack of platelet activation on PSMA×CD3 treatment (200 ng/mL) (n=4). Classical platelet agonist TRAP-6 (10 μM) served as a positive control. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (G) Platelet aggregation (percentage of light transmission during the indicated time interval) was studied in the presence or absence of PSMA×CD3 (200 ng/mL) and TRAP-6. (H) Maximum aggregation levels on PSMA×CD3 and TRAP-6 treatment (n=3). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (I) Representative immunofluorescence staining of LNCaP cells coincubated with human PBMCs, platelets and PSMA×CD3 (scale bar indicates 100 μm, original magnification ×20). (J) Representative staining for platelet activation (CD62P expression) after incubating platelets for 30 min with LNCaP cells and PBMCs (effector to target ratio of 4:1) and PSMA×CD3 (scale bar indicates 20 μm, original magnification ×63). (K,L) Platelets of healthy donors (n=3) were analyzed for CD62P expression after culturing them for 2 hours in the presence or absence of LNCaP cells alone or in combination with PSMA×CD3 and/or PBMCs of healthy donors. (K) Exemplary plots and (L) pooled data are shown. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. ANOVA, analysis of variance; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; HD, healthy donor; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; sIL-2R, soluble interleukin-2 receptor; TRAP-6, thrombin receptor activator peptide 6.

As platelet activation results in secretion of immunomodulatory factors,^{15 16} we next investigated whether inhibition of platelet activation with anticoagulant drugs would prevent their inhibitory effect on bsAb-mediated T cell activation. Treatment with dabigatran, an oral anticoagulant, efficiently restored CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation whereas indomethacin had no relevant effect (figure 3E). Next, we compared the influence of platelets and PR on T cell reactivity and found that both reduced T cell activation to the same extent (figure 3F). This indicates that soluble factors released from activated

platelets impair bsAb-induced T cell reactivity, which is in line with previous observations.^{16 25} Remarkably, live cell imaging revealed that PR efficiently reduced bsAb-mediated tumor cell lysis (figure 3G). To unravel the factor within PR that inhibits T cell activity, we quantified several key immunomodulatory cytokines in PR preparations (figure 3H). Of all tested cytokines, active TGF-β1 was found to be most elevated and modulated on platelet activation (figure 3H,I).

To functionally validate that indeed platelet-derived TGF-β subverts the efficacy of T cell-engaging

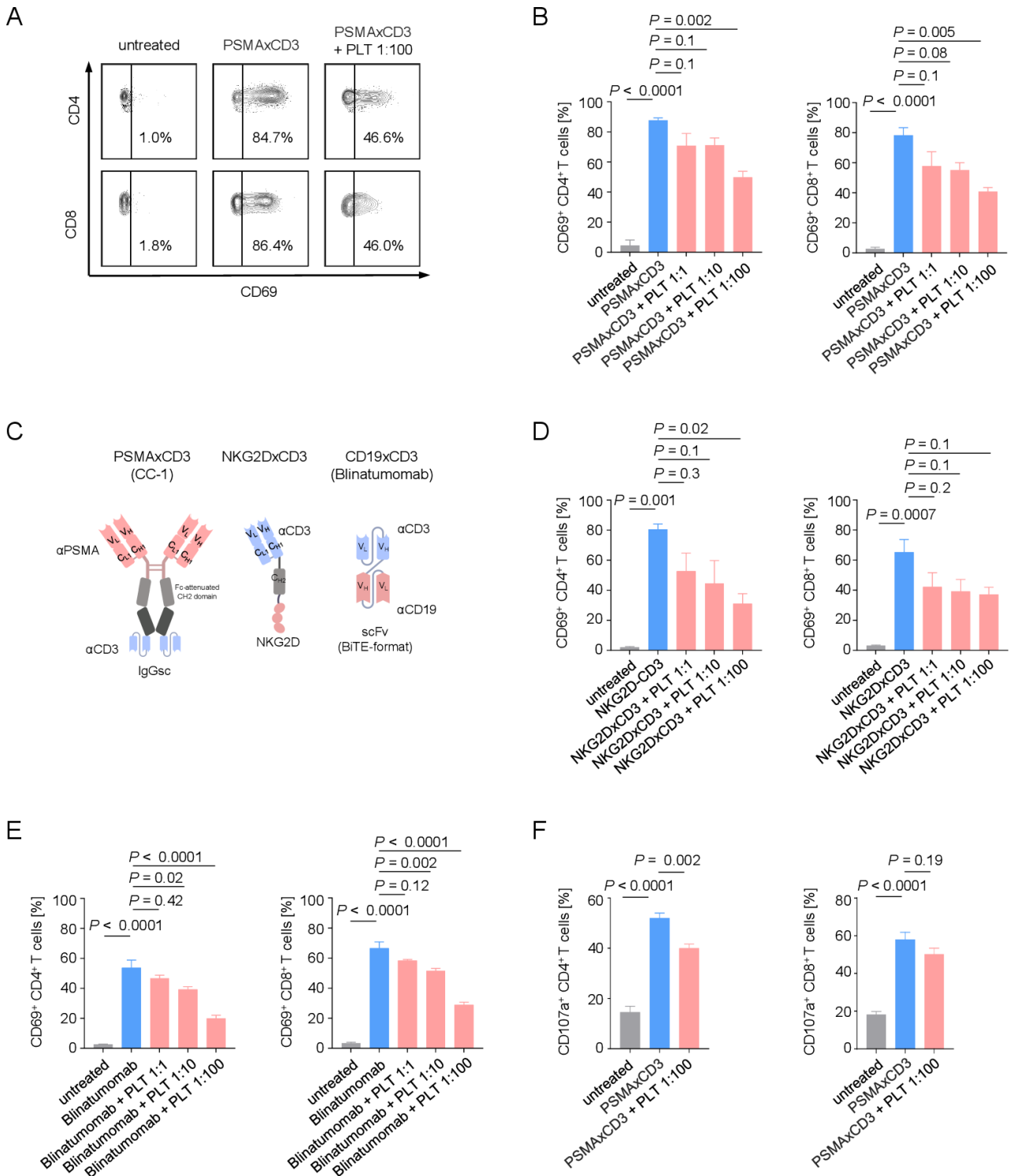


Figure 2 Platelets impair the therapeutic T-cell activation capacity of bispecific antibodies. (A,B) Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by analysis of CD69 expression after 24 hours. PBMCs of healthy donors were incubated with LNCaP cells (E:T 4:1) in the presence or absence of PSMAxCD3 (200 ng/mL) and with the indicated E:P ratios. (A) Exemplary flow cytometry results and (B) combined data are shown (n=3). (C) Schematic illustration of the different bispecific T cell-engaging formats used in our study. (D,E) Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed on coculture of PBMCs of healthy donors with target cells at an E:T ratio of 2.5:1.0 and the indicated E:P ratios for 24 hours. (D) The sarcoma cell line SaOS-2 was cultured with PBMCs (n=3) and NKG2DxCD3 (2.5 μg/mL). (E) The B-ALL cell line (SEM) was cultured with PBMCs (n=4) and CD19xCD3 (blinatumomab, 200 pg/mL). (F) Degranulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by analysis of CD107a expression after 4 hours. PBMCs of healthy donors were cultivated with LNCaP cells at an E:T ratio of 4:1 in the presence or absence of PSMAxCD3 (200 ng/mL) or platelets (E:P 1:100). Pooled data (n=5) are shown. (B,D–F) Statistical significance was calculated by one-way analysis of variance and Tukey's multiple comparisons test. E:P, effector to platelet; E:T, effector to target; PLT, platelets; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

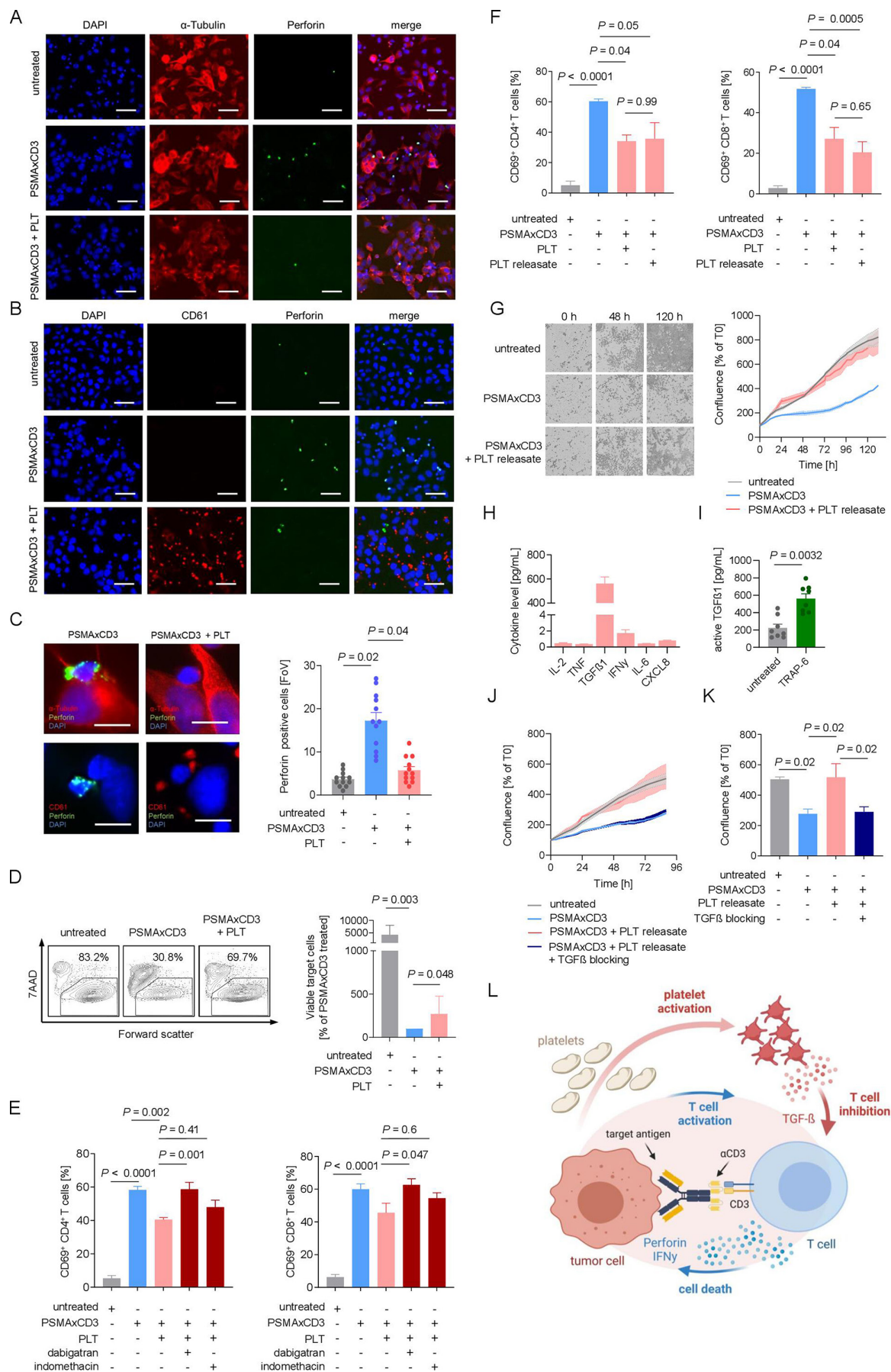


Figure 3 (Continued)

Figure 3 Platelets undermine treatment efficacy of bsAb via the TGF- β axis. (A–C) Immunofluorescent staining after 2.5 hours of coincubation of LNCaP cells and PBMCs (E:T ratio of 4:1) in the presence of PSMA \times CD3 (200 ng/mL) and platelets (E:P ratio of 10:1). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (A) Cells were stained for tubulin (red) and perforin (green). Nuclei were stained using DAPI (blue). Scale bar indicates 100 μ m, original magnification \times 20. (B) Platelets were stained for CD61 (red); nuclei were stained using DAPI (blue) and perforin (green). Scale bar indicates 100 μ m, original magnification \times 20. (C) Exemplary immunofluorescence staining of tumor–platelet immune cell interactions (left). Scale bar indicates 20 μ m, original magnification \times 63. Quantification of perforin-positive cells per FoV (n=12) (right). (D) PBMCs of healthy donors (n=7) were incubated with LNCaP cells (E:T ratio of 2.5:1.0) with and without PSMA \times CD3 in the presence or absence of platelets (E:P 100:1) as indicated for 72 hours. Then target cell lysis was analyzed by flow cytometry to determine the percentage of 7-aminoactinomycin (7AAD)-positive LNCaP cells. Left panel: exemplary plots obtained with a single donor; right panel: combined data obtained with seven independent donors displayed as percentage of viable target cells after bsAb treatment. Statistical significance was calculated by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test. (E) Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by expression of CD69 after 24 hours of treatment with PSMA \times CD3 and platelets (E:T ratio of 4:1, E:P ratio of 100:1). Platelets were preincubated with dabigatran (0.5 mM) or indomethacin (0.05 mM) for 30 min before adding to the assay. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (F) Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed after incubation with LNCaP cells (E:T ratio of 4:1) and treatment with anti-PSMA \times CD3, platelets (E:P ratio of 100:1) or PR (n=4). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. (G) PSMA \times CD3-induced cell death of LNCaP cells was determined using live cell imaging. Cells were incubated with PBMCs and platelets. In the left panel, representative pictures at 0, 48, and 120 hours are displayed. In the right panel, pooled data are shown (n=8). (H) PR has been generated as described in the Methods section, and the indicated cytokines were measured using LEGENDplex assay (n=8). (I) The concentration of active TGF- β in the platelet supernatant before and after stimulation with TRAP-6 is shown (n=8). Statistical significance was calculated using Student's t-test. (J,K) Cytotoxicity of PBMC against LNCaP cells after treatment with PSMA \times CD3, and platelet release with or without blocking of the TGF- β axis using the combination of SB431542 (20 μ M) and anti-TGF- β antibody (2 μ g/mL) is shown (n=8). (K) Pooled data of cell confluence measured after 88 hours of treatment. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test. (L) Schematic illustration of the proposed model of an inhibitory loop driven by platelets and platelet-released TGF- β , undermining the efficacy of T cell-recruiting bsAbs. The graphic was created by BioRender (BioRender.com, Toronto, Canada). ANOVA, analysis of variance; bsAb, bispecific antibody; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; E:P, effector to platelet; E:T, effector to target; FoV, field of view; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PR, platelet releasate; TGF- β , transforming growth factor beta.

therapeutics, we determined the effect of TGF- β blockade on bsAb-induced cytotoxicity on exposure to platelet release, which resulted in restoration of T cell reactivity (figure 3J,K). We provide here a new model showing that an inhibitory loop driven by platelet-derived TGF- β limits the efficacy of T cell-recruiting bsAb (figure 3L).

DISCUSSION

Tumor immune escape mechanisms are limiting the efficacy of immunotherapy. Especially, in solid tumors, the TME has been shown to be crucial for diminishing anti-tumor immune responses.²⁶ Although it has been shown that platelets, as parts of the TME, possess the ability to modulate tumor immune escape,^{13 16} the importance in the context of immunotherapy is poorly investigated so far. We observed that treatment with the novel bispecific PSMA \times CD3 antibody CC-1^{17 18} leads to a significant platelet activation and a transient decrease of total platelet count in vivo. Since a similar effect was observed in patients with acute lymphocytic leukemia (ALL) treated with the CD19 \times D3 BiTE blinatumomab, we hypothesize that platelets represent so far underestimated players affecting the efficacy of T cell-engaging bsAb, which is in line with data that platelets impair NK cell-mediated tumor immunosurveillance and antitumor T-cell reactivity in a model of adoptive T-cell transfer.^{15 16}

In our preclinical setting, we were able to show that bsAb-mediated tumor–immune cell interactions efficiently

induce platelet activation, while the T cell-engaging therapeutics alone do not bind or activate platelets. The bsAb-induced T-cell activation was accompanied by an upregulation of CD40L preferentially on CD4⁺ T cells, and the induced platelet activation was partly diminished on blocking CD40–CD40L interaction. This is in line with published data that T cells stimulate platelets via the CD40–CD40L axis.²⁴ However, further data are needed to validate the involvement of CD40–CD40L interaction.

When investigating the influence of activated platelets on the PSMA \times CD3-induced effector cell reactivity, we observed a significant inhibition of T-cell reactivity. Of note, this phenomenon was not restricted to the format of the bispecific T cell-recruiting agents (IgGsc, BFP, or BiTE), the tumor entity, or target antigen (PSMA, NKG2DL, or CD19). This observation suggests that the immunomodulating effect of platelets might be a general mechanism of platelet-mediated tumor-immune escape on treatment with T cell-engaging therapies. This hypothesis is further supported by our finding that soluble factors, secreted via activated platelets, efficiently subvert bsAb induced T-cell cytotoxicity, which is in line with observations reported for adoptive T-cell therapies and immune checkpoint blockade.^{16 25}

Our finding that only the reversible thrombin inhibitor dabigatran, but not indomethacin, abrogated the inhibitory effect of platelets is supported by data showing that dabigatran can block thrombin-induced TGF- β activation

via platelet-bound glycoprotein A repetitions predominant.²⁵ Considering that pharmacological inhibition of platelets restores efficacy of bsAb treatment, our data not only emphasize the role of platelets in tumor-immune cell interaction in general and bsAb-based immunotherapy in particular, but also indicate that blocking platelet activation with clinically already available drugs or neutralization of TGF- β may serve to increase efficacy of T cell-recruiting bsAb.

Bearing in mind that CAR T cells use a similar mechanism to induce cytotoxicity, a platelet-mediated inhibition of CAR T-cell reactivity is probable. However, further data are needed to investigate such an assumption. In conclusion, our study provides further important data supporting the evidence of an inhibitory loop driven by platelets undermining antitumor T-cell cytotoxicity and thus facilitating tumor immune escape on treatment with T cell-engaging agents.

Acknowledgements We thank Celine Reiß, Hannah Zug, Sabrina Sauter, Michael Beller, and the Flow Cytometry Core Facility Berg of the University Hospital Tuebingen for their excellent technical support.

Contributors MSL and CH designed, performed, and interpreted the experiments. MSL, CH, BK, SM, JSH, MM, and LZ provided analysis and interpretation of data. MSL, BK, MM, CH, and HRS wrote the manuscript. HRS, GJ, and CH designed the study. All authors contributed to the writing of the paper and approved the final manuscript.

Funding This project was supported by the Deutsche Krebshilfe (70113999), the Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.2), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy (EXC 2180-39 090 067) and DFG (project number SA 1360/9-3 and 374031971 - TRR 240/project B05).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval This study involves human subjects and was approved by Medical Faculty of the Eberhard Karls University and the University Hospital Tuebingen (13/2007 V). Subjects gave informed consent to participate in the study before taking part.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information. The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

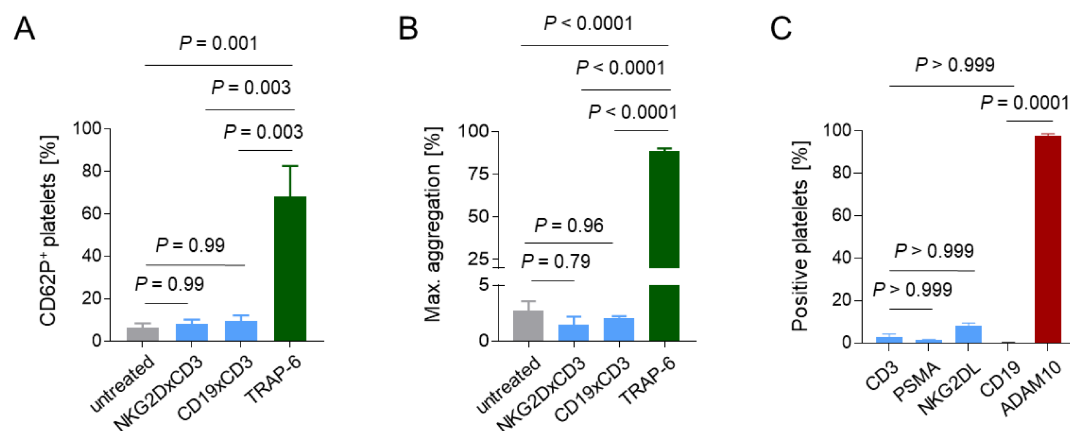
ORCID iD

Martina Svenja Lutz <http://orcid.org/0000-0003-2576-2442>

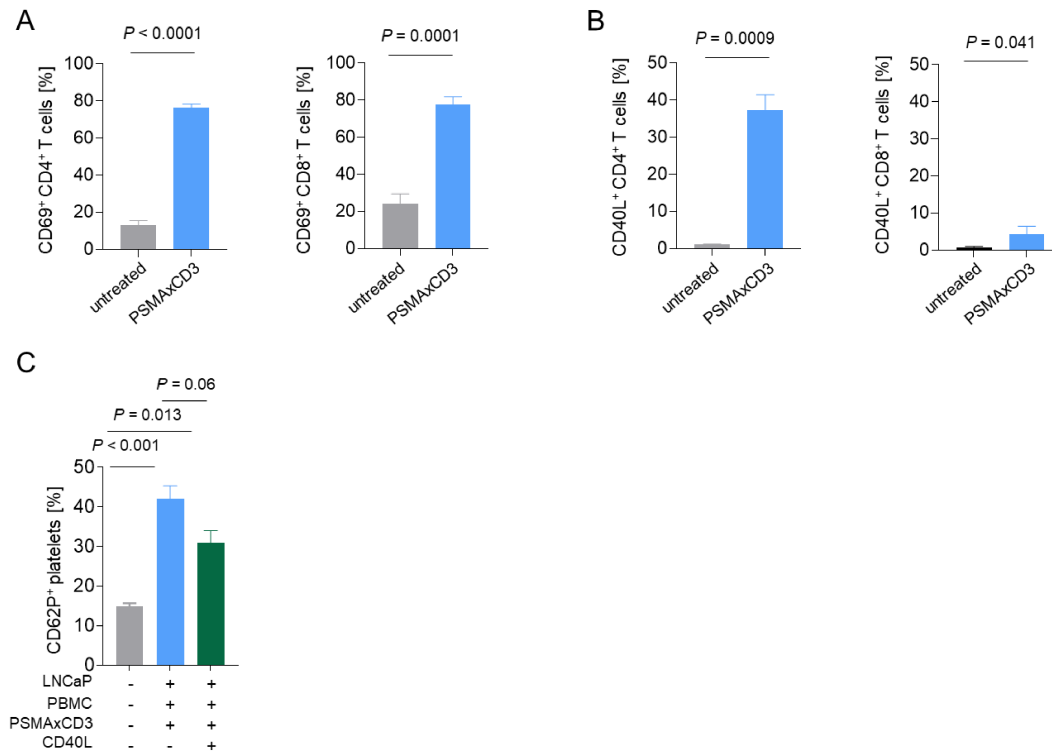
REFERENCES

- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, *et al.* Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008;321:974-7.
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013;5:177ra38.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;271:1734-6.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 1992;11:3887-95.
- Kantarjian H, Stein A, Gökbuğet N, *et al.* Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2017;376:836-47.
- Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:372-85.
- Singh A, Dees S, Grewal IS. Overcoming the challenges associated with CD3+ T-cell redirection in cancer. *Br J Cancer* 2021;124:1037-48.
- Roma-Rodriguez C, Mendes R, Baptista P, *et al.* Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2019;20:840.
- Erpenbeck L, Schön MP. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 2010;115:3427-36.
- Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011;11:123-34.
- Hinterleitner C, Zhou Y, Tandler C, *et al.* Platelet-Expressed TNFRSF13B (TACI) predicts breast cancer progression. *Front Oncol* 2021;11:642170.
- Leblanc R, Peyruchaud O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood* 2016;128:24-31.
- Placke T, Salih HR, Kopp H-G. G1TR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J Immunol* 2012;189:154-60.
- Placke T, Örgel M, Schaller M, *et al.* Platelet-Derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 2012;72:440-8.
- Kopp H-G, Placke T, Salih HR. Platelet-Derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009;69:7775-83.
- Rachidi S, Metelli A, Riesenberger B, *et al.* Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGF β axis. *Sci Immunol* 2017;2. doi:10.1126/sciimmunol.aai7911. [Epub ahead of print: 05 May 2017].
- Heitmann JS, Walz JS, Pflügler M, *et al.* Protocol of a prospective, multicentre phase I study to evaluate the safety, tolerability and preliminary efficacy of the bispecific PSMAxCD3 antibody CC-1 in patients with castration-resistant prostate carcinoma. *BMJ Open* 2020;10:e039639.
- Zekri L, Vogt F, Osburg L, *et al.* An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med* 2021;13:e11902.
- Märklin M, Hagelstein I, Koerner SP, *et al.* Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer* 2019;7:143.
- Hagelstein I, Lutz MS, Schmidt M, *et al.* Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins as novel treatment option in advanced soft tissue sarcomas. *Front Immunol* 2021;12:653081.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. Nih image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-5.
- Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, *et al.* Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* 2019;572:254-9.
- Kauer J, Hörner S, Osburg L, *et al.* Tocilizumab, but not dexamethasone, prevents CRS without affecting antitumor activity of bispecific antibodies. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000621.
- Danese S, de la Motte C, Reyes BMR, *et al.* Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol* 2004;172:2011-5.
- Metelli A, Wu BX, Riesenberger B, *et al.* Thrombin contributes to cancer immune evasion via proteolysis of platelet-bound GARP to activate LTGF- β . *Sci Transl Med* 2020;12. doi:10.1126/scitranslmed.aay4860. [Epub ahead of print: 08 Jan 2020].
- Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res* 2020;30:507-19.

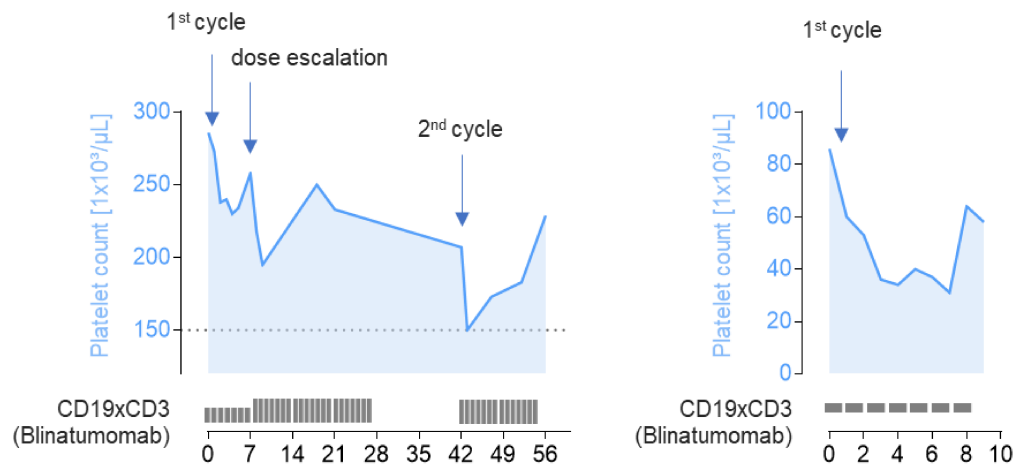
Supplemental Figures



Supplemental Figure 1: A-B Induction of **A** platelet activation and **B** aggregation upon NKG2DxCD3 and Blinatumomab (CD19xCD3) treatment. 10 μ M TRAP-6 served as a positive control. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. **C** Platelet surface expression of target antigens used for the bispecific constructs (CD3, PSMA, NKG2DL and CD19); ADAM10 served as a positive control (n=4). Statistical significance was calculated by Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test.



Supplemental Figure 2: A-B Induction of **A** CD69 expression and **B** CD40L expression upon PSMAxCD3 treatment. PBMCs of healthy donors were incubated with LNCaP cells (E:T 4:1 in the presence or absence of PSMAxCD3 (200 ng/ml). Statistical significance was calculated by students two-tailed t-test. **C** Platelets of healthy donors (n=3) were analyzed for CD62P expression after culturing them for 2 h in the presence or absence of LNCaP cells in the combination with PSMAxCD3 and PBMCs of healthy donors with or without a CD40L blocking antibody (10 µg/ml). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test.



Supplemental Figure 3: Correlation of platelet count and treatment with Blinatumomab (CD19xCD3) in two B-ALL patients.