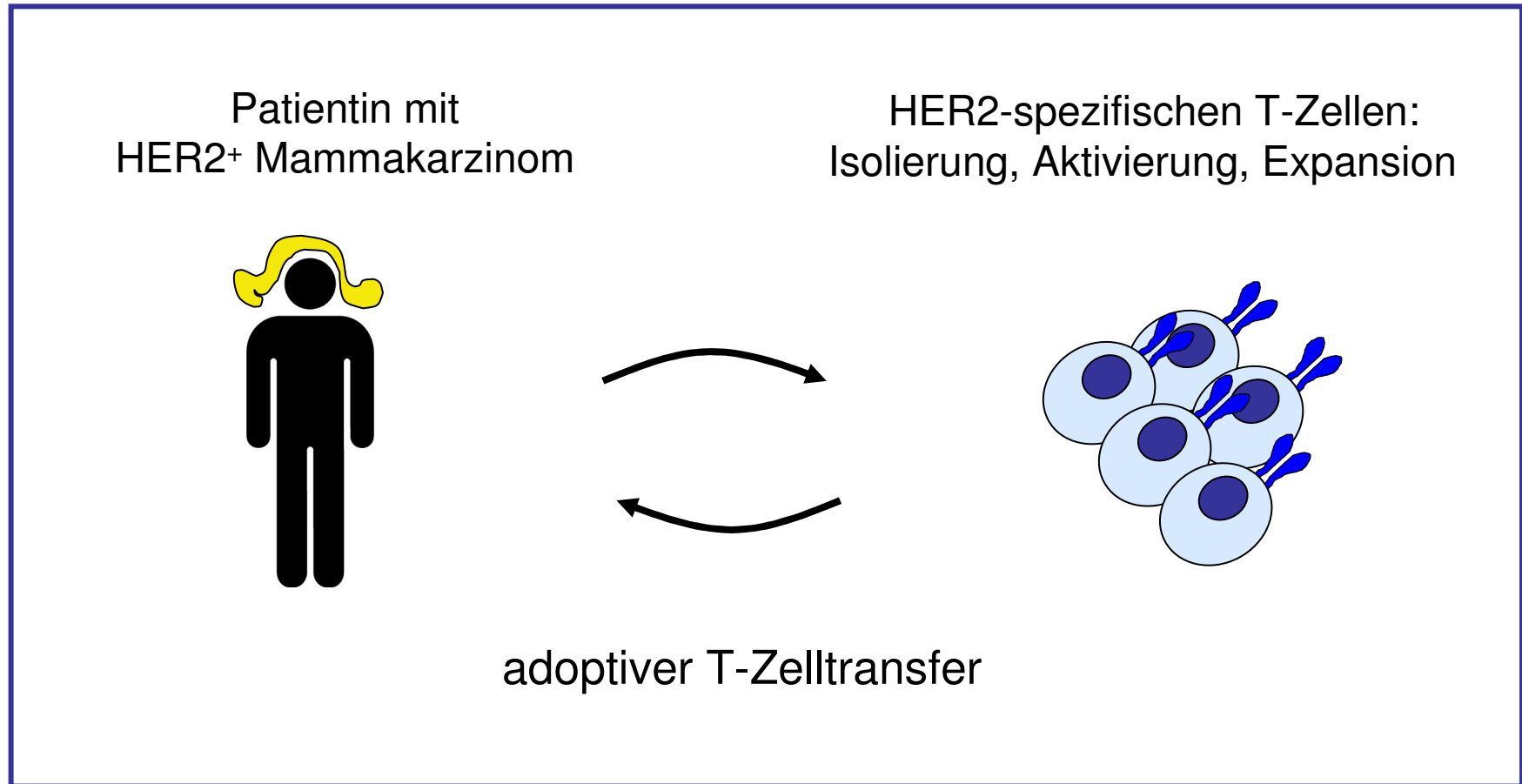


# EGF-R-Familie als Target für zytotoxische T-Lymphozyten

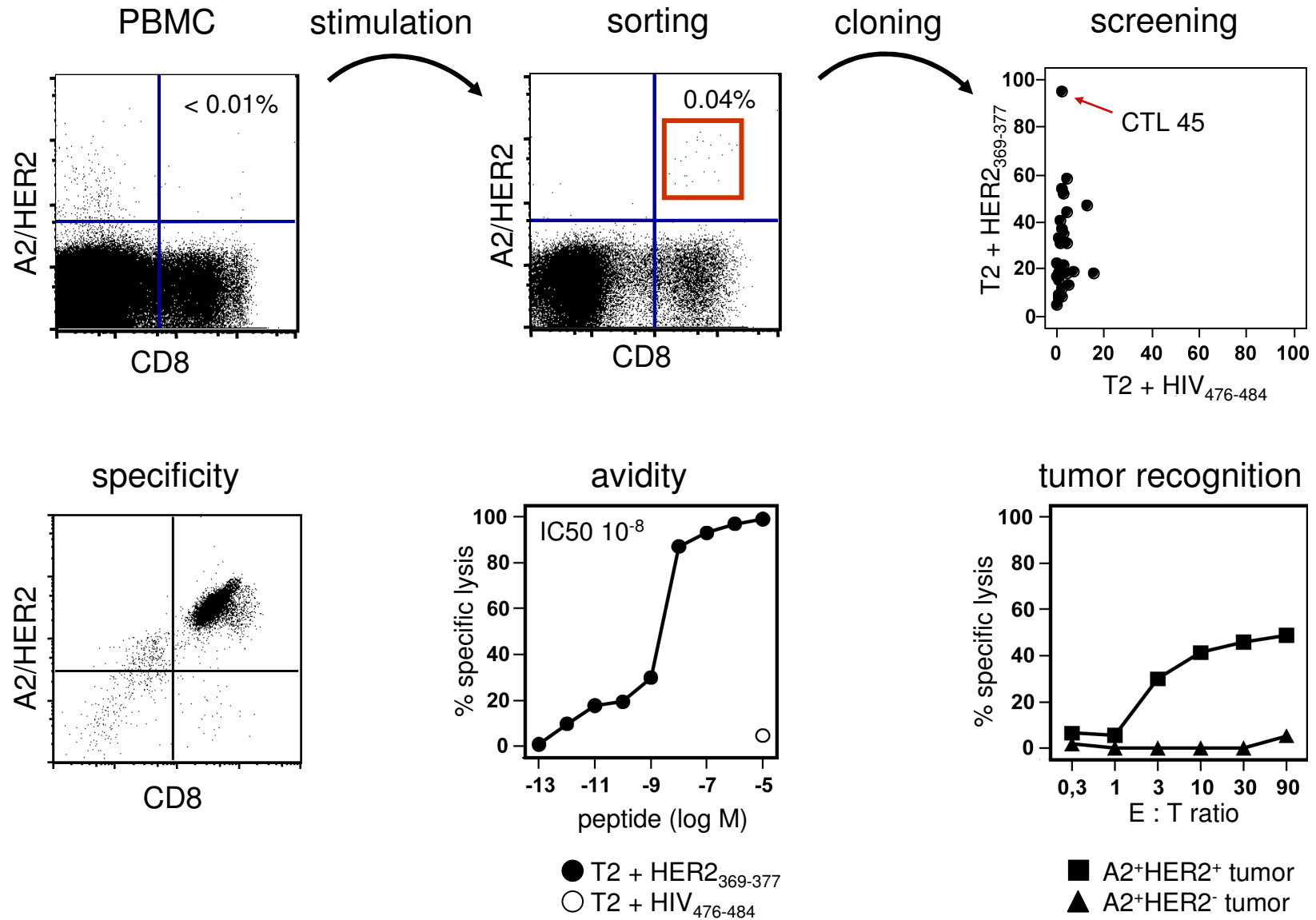
Helga Bernhard



# Adoptiver Transfer von HER2-spezifischen T-Zellen zur Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms



# Generierung von HER2-reaktiven zytotoxischen T-Zellklonen von einer Patientin mit HER2+++ Mammakarzinom



# Adoptiver Transfer von autologen HER2-spezifischen T-Zellklonen bei einer Patientin mit Mammakarzinom

## *Patienten-Charakteristika*

Progression nach Chemotherapie und Herceptin

HER2-positive Lebermetastasen

disseminierte HER2-positive Tumorzellen im Knochenmark

## *T-Zelltransfer*

5 x Infusion der HER2-spezifischen T-Zellklone

1 - 9 x 10<sup>8</sup> T-Zellen pro Transfer

Interleukin-2: 500.000 U/m<sup>2</sup> s.c. / Tag

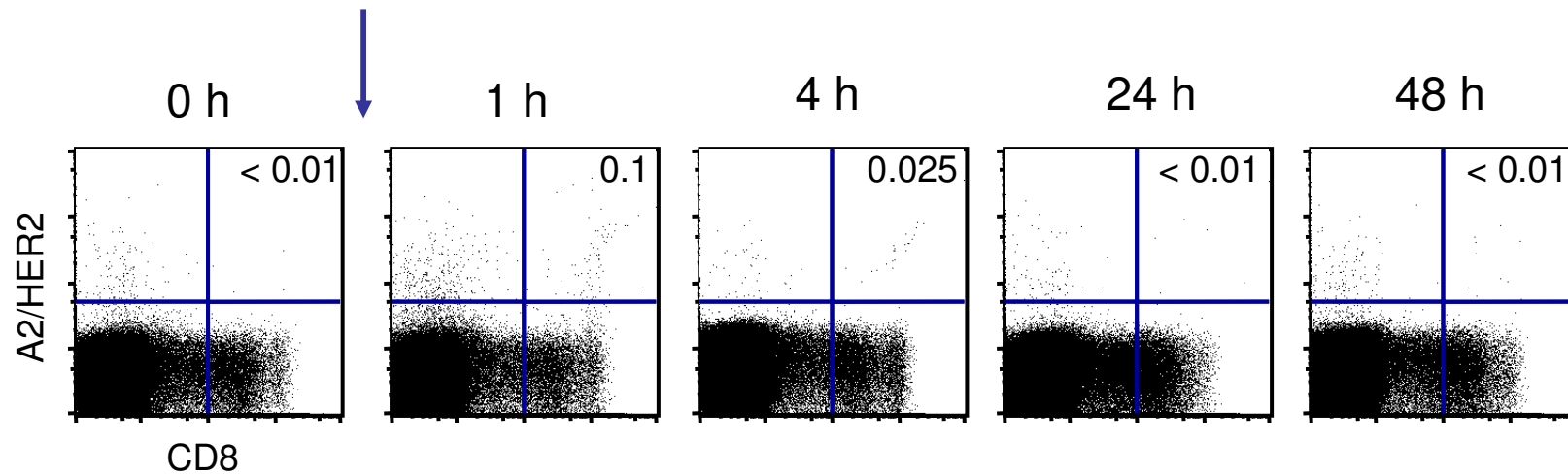
## *Monitoring*

Frequenzanalyse der T-Zellen im Blut und Knochenmark

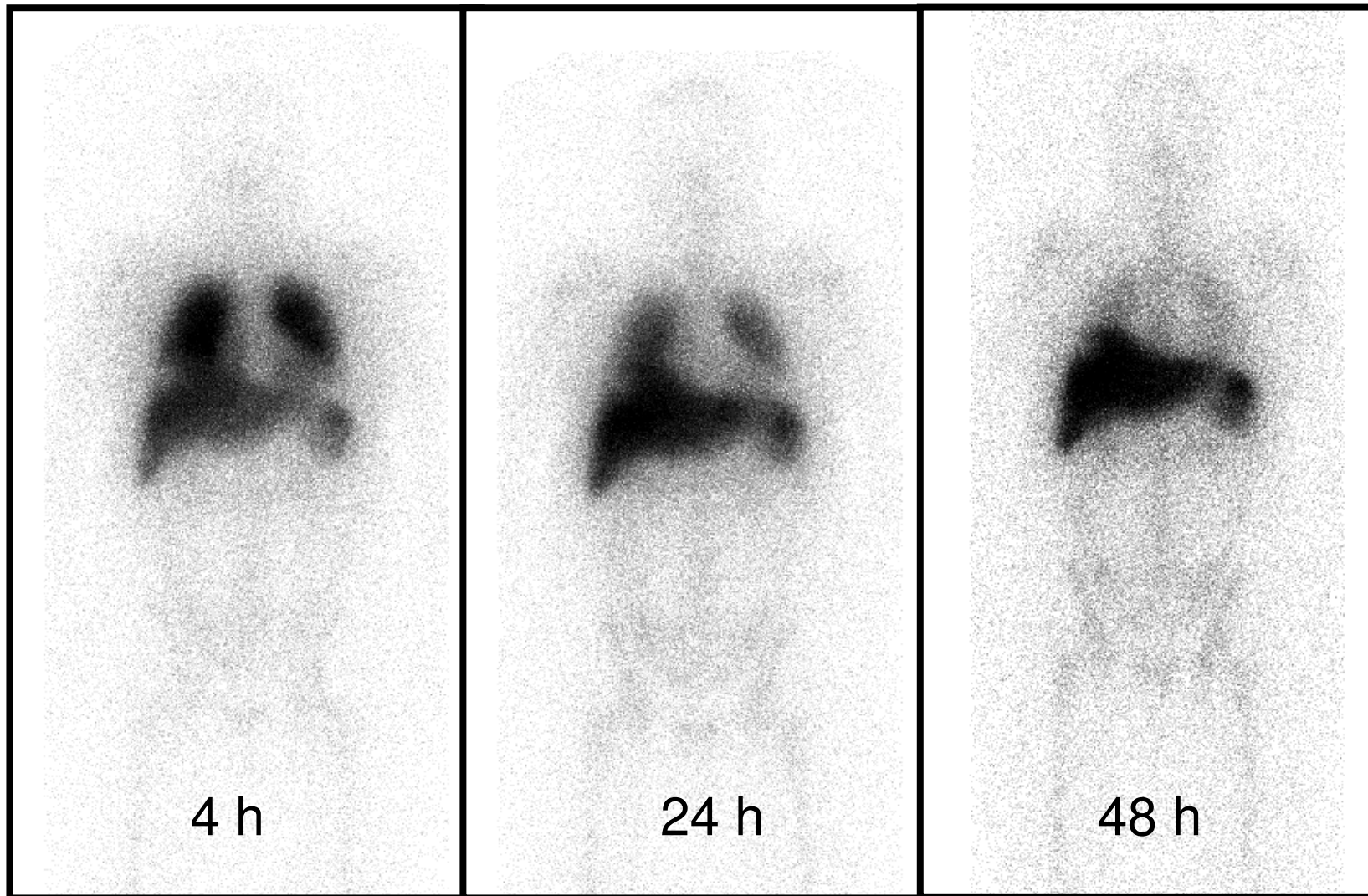
Migrationsverhalten: <sup>111</sup>Indium-markierte T-Zellen

# Frequenz-Analyse der HER2-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut nach dem adoptiven T-Zelltransfer

Transfer von  $1.2 \times 10^8$  HER2-spezifischen T-Zellen (CTL 3)

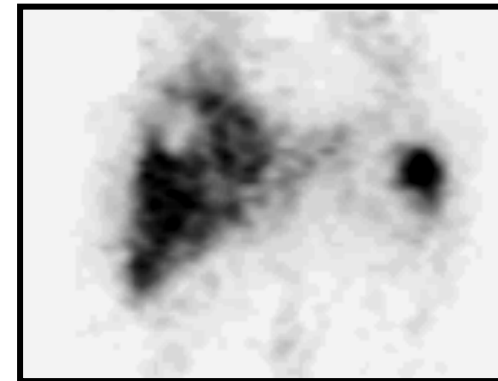
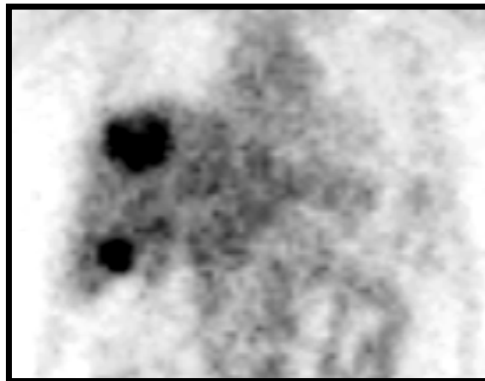
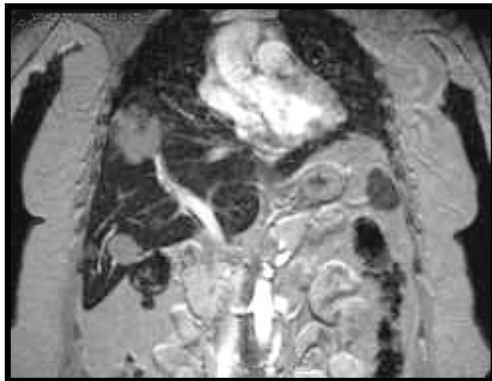
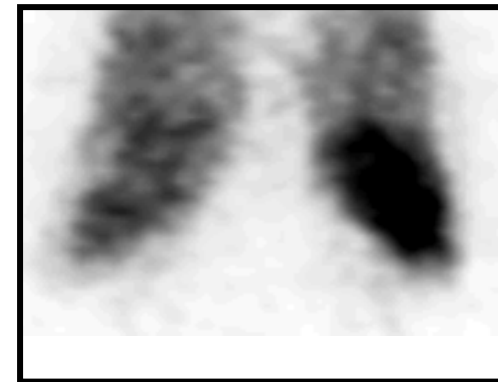
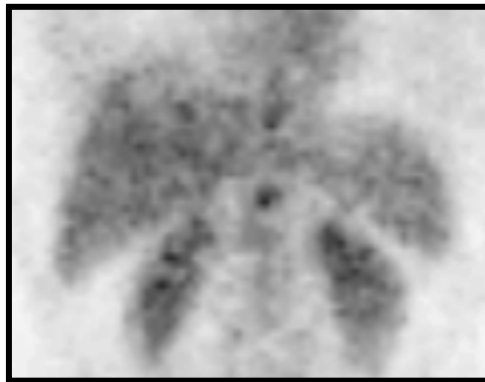
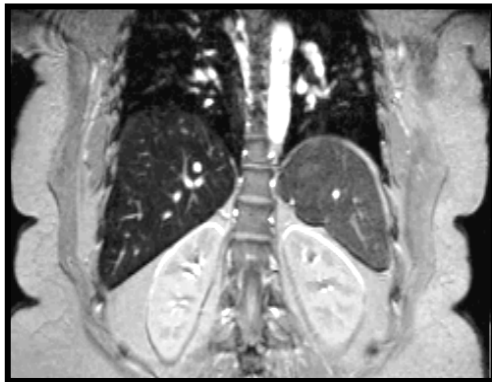


Wanderverhalten der autologen, HER2-spezifischen,  
CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Transfer



*<sup>111</sup>Indium-markierter CTL Klon #45; Transfer von  $7.1 \times 10^8$  T-Zellen i.v.*

# Barriere der soliden Metastasen gegenüber den transferierten HER2-spezifischen T-Zellen



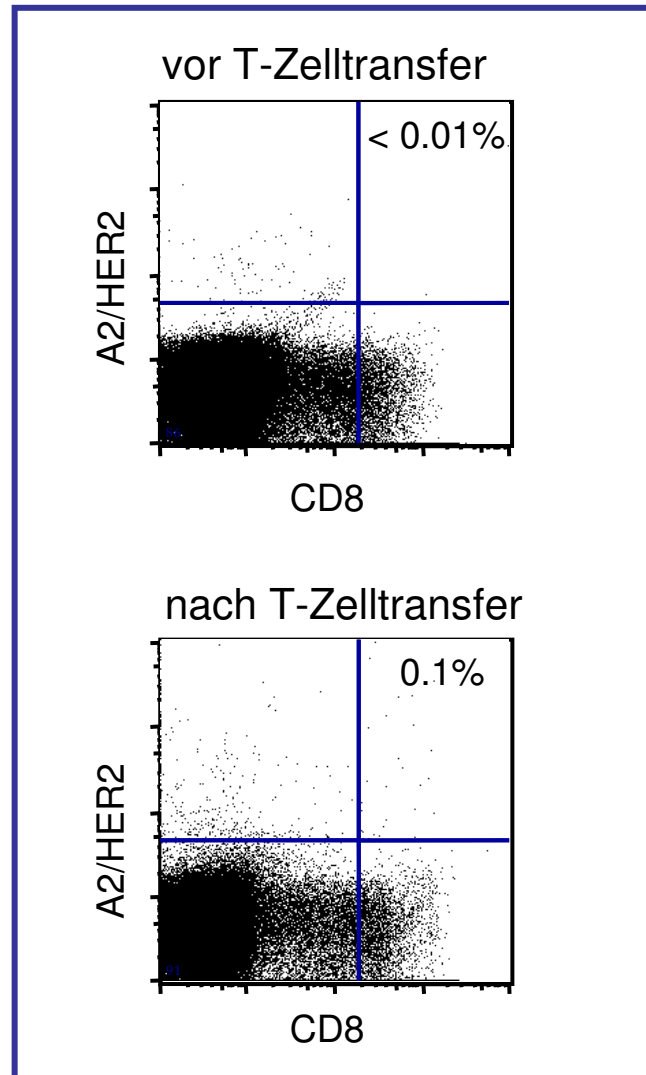
MRT

FDG-PET

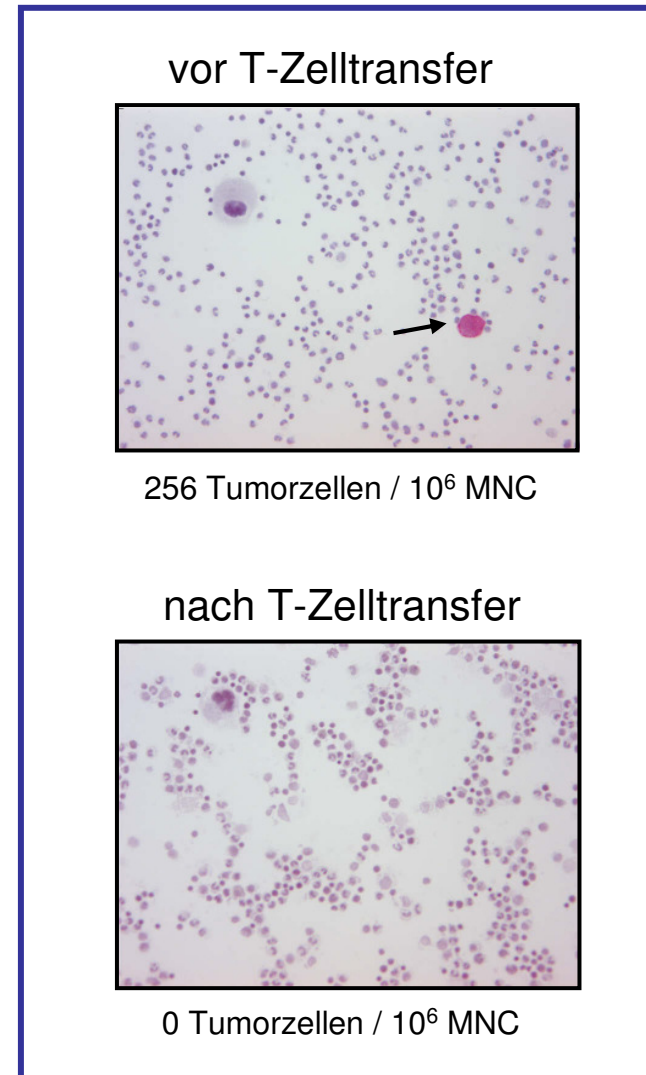
<sup>111</sup>In Lymphozyten

# „Monitoring“ von T-Zellen und Tumorzellen im Knochenmark

## HER2-spezifische T-Zellen



## HER2-positive Tumorzellen



## Zwischenbilanz - adoptiver T-Zelltransfer

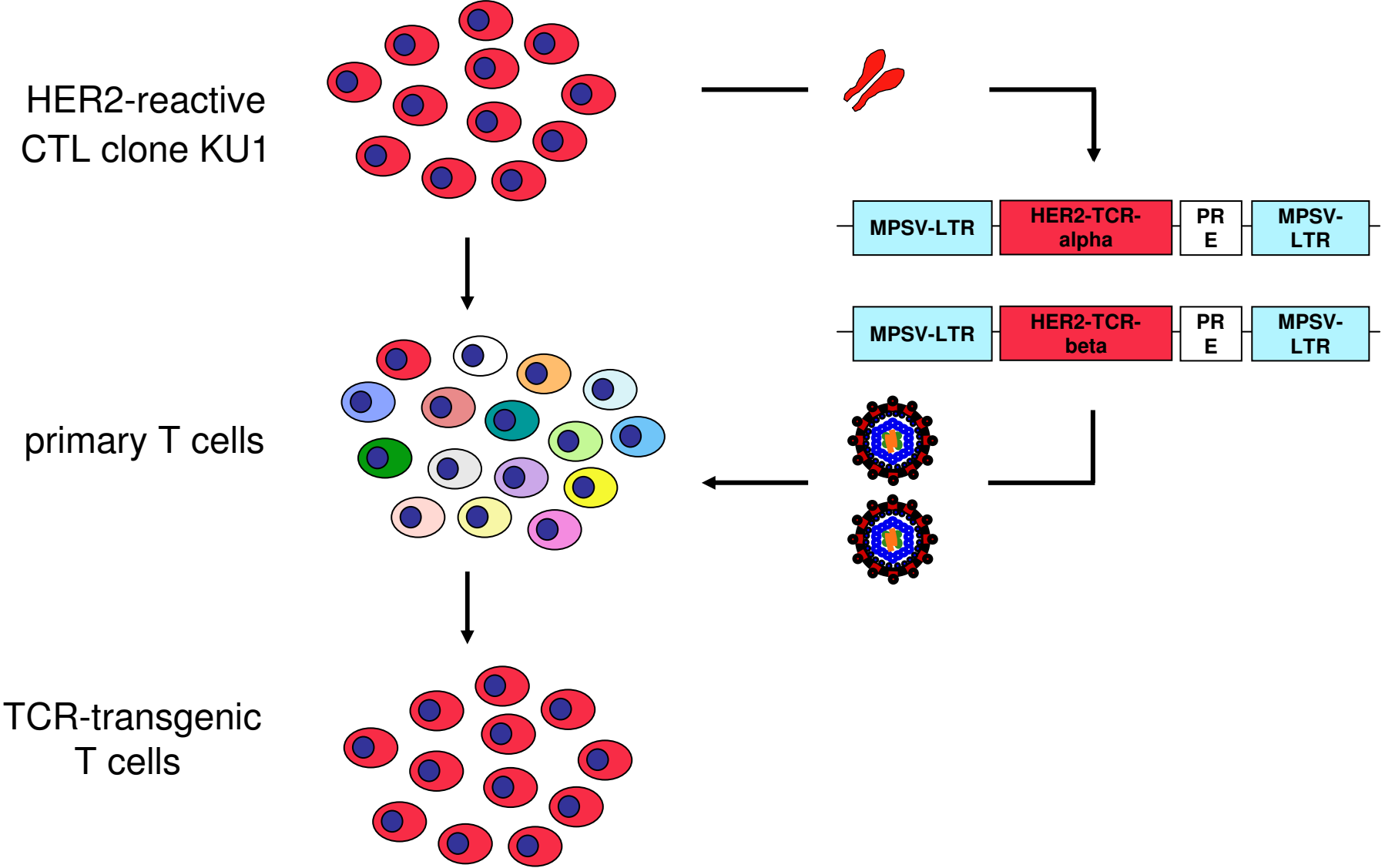
### *„Proof of Principle“*

- Generierung von tumorreaktiven T-Zellen
- Selektion, Klonierung und Expansion
- Spezifität gegen das Tumor-assoziiertes Antigen „HER2“

### *Limitationen*

- hoher Arbeitsaufwand
  - eingeschränkte Wiederholbarkeit
  - niedrige Avidität der T-Zellen
  - schlechte Tumorerkennung
  - kurzes Überleben der T-Zellen
  - unüberwindbare Tumorbarriere
- in vitro
- in vivo

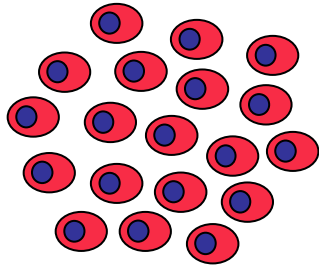
# T-Zellrezeptor Gentransfer



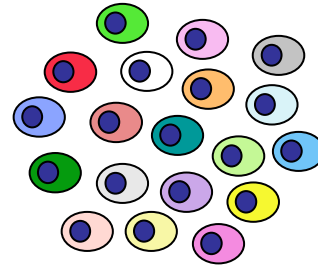
*Kooperation mit Wolfgang Uckert, MDC, Berlin*

# Expression des HER2-reaktiven TCRs nach Gentransfer

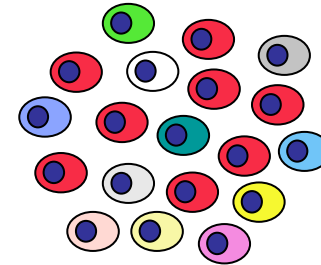
T-Zellklon KU1



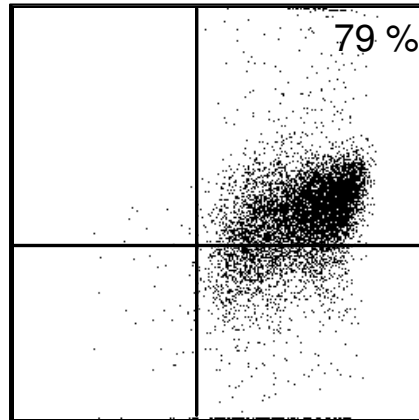
HER2-TCR wt



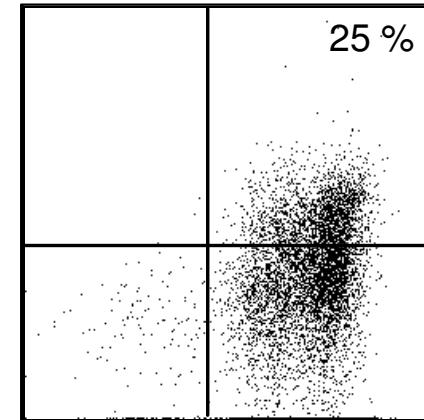
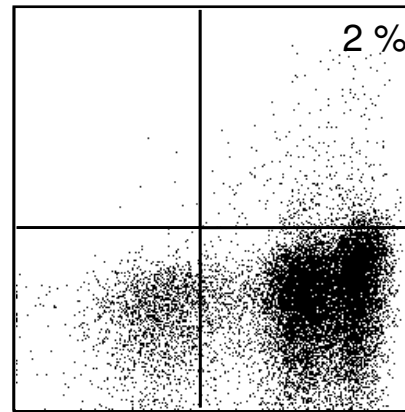
HER2-TCR opt



A2/HER2<sub>369-377</sub>

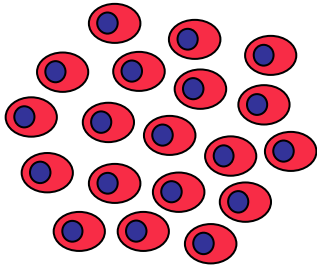


CD8

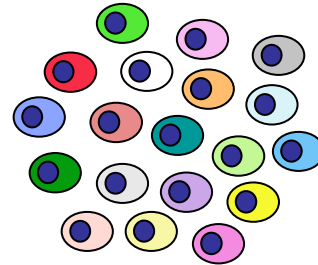


# HER2-spezifische Lyse durch primäre T-Zellen nach TCR-Transfer

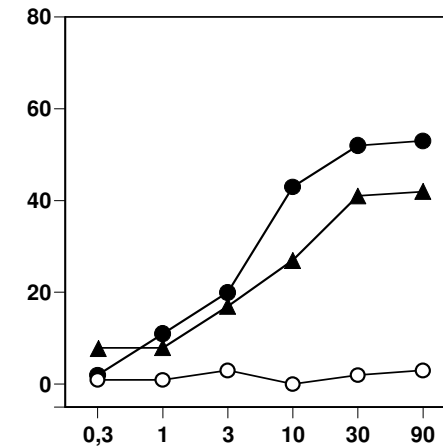
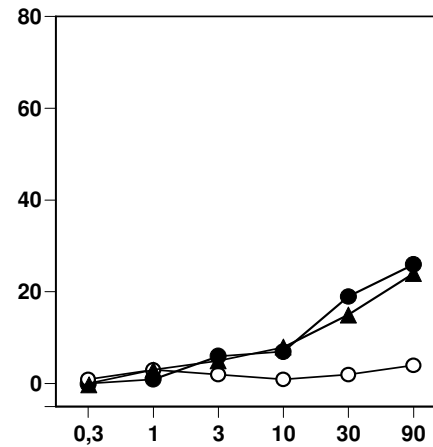
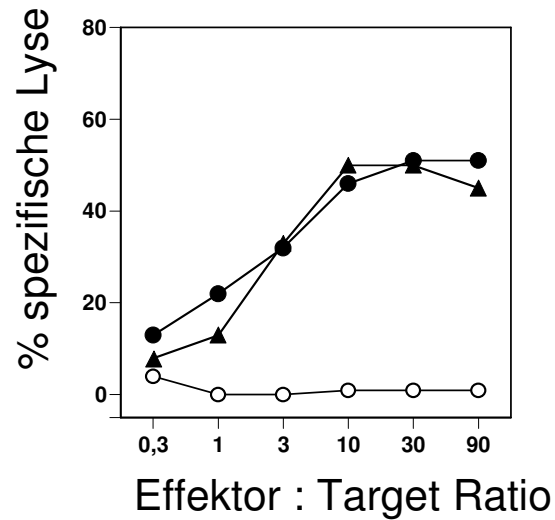
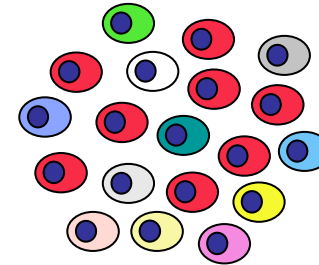
T-Zellklon KU1



HER2-TCR wt



HER2-TCR opt



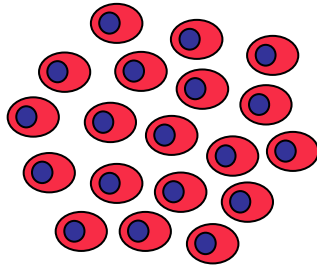
● K562tA2tMigR1tHER2

○ K562tA2tMigR1

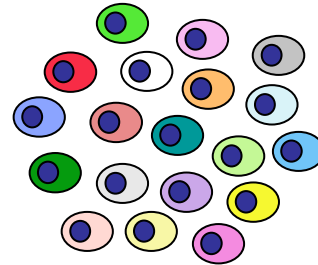
▲ HLA-A2+ HER2+ MCF7

# Erkennung von HER2+ Tumorzellen durch TCR-transgene -Zellen

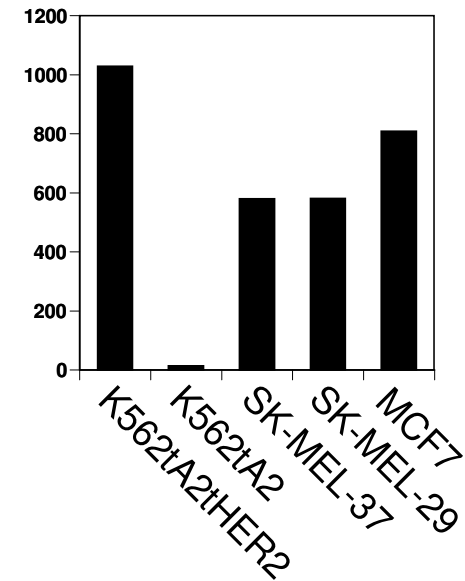
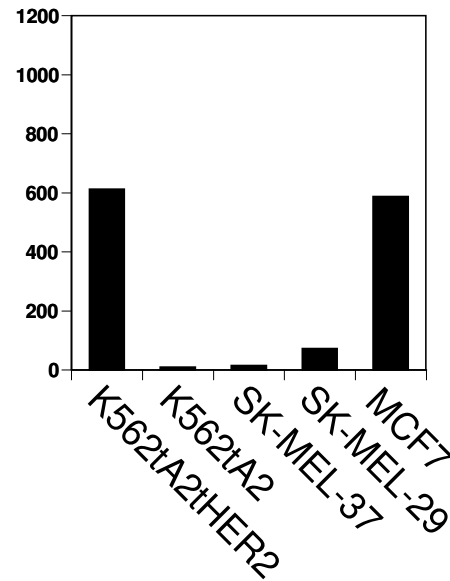
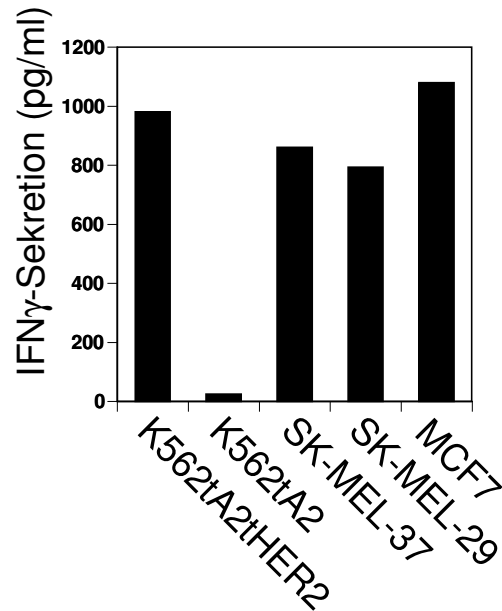
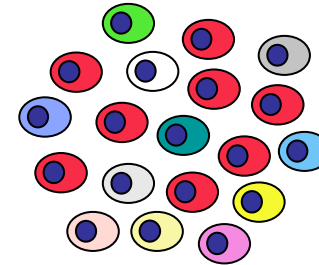
T-Zellklon KU1



HER2-TCR wt

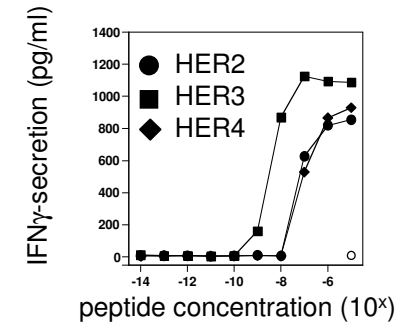
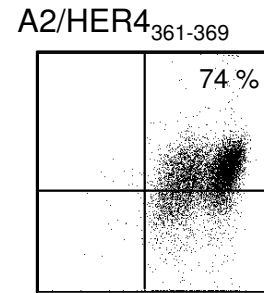
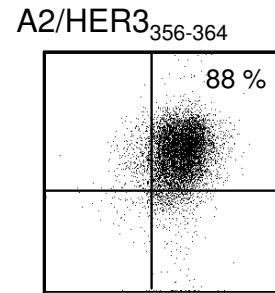
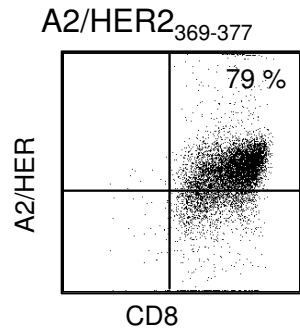


HER2-TCR opt

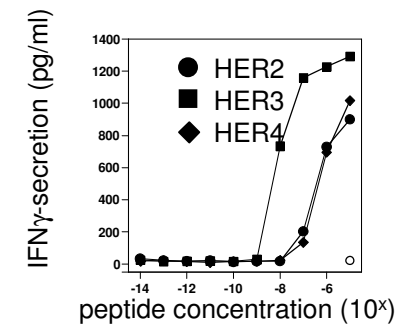
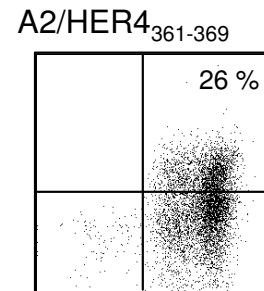
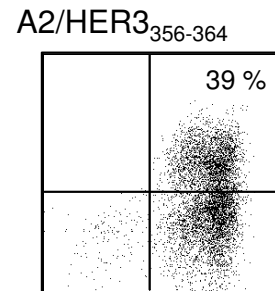
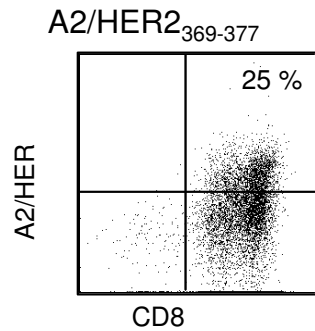


# „Kreuz-Spezifität“ von HER2-reaktiven T-Zellen mit HER3 und HER4

## CTL clone KU1



## HER2-TCR opt



Sequenzhomologie des dominanten  
HLA-A2/HER2-Peptidpitops p369-377

HER1 p364-372 **SISGDLHIL**

HER2 p369-377 **KIFGSLAFL**

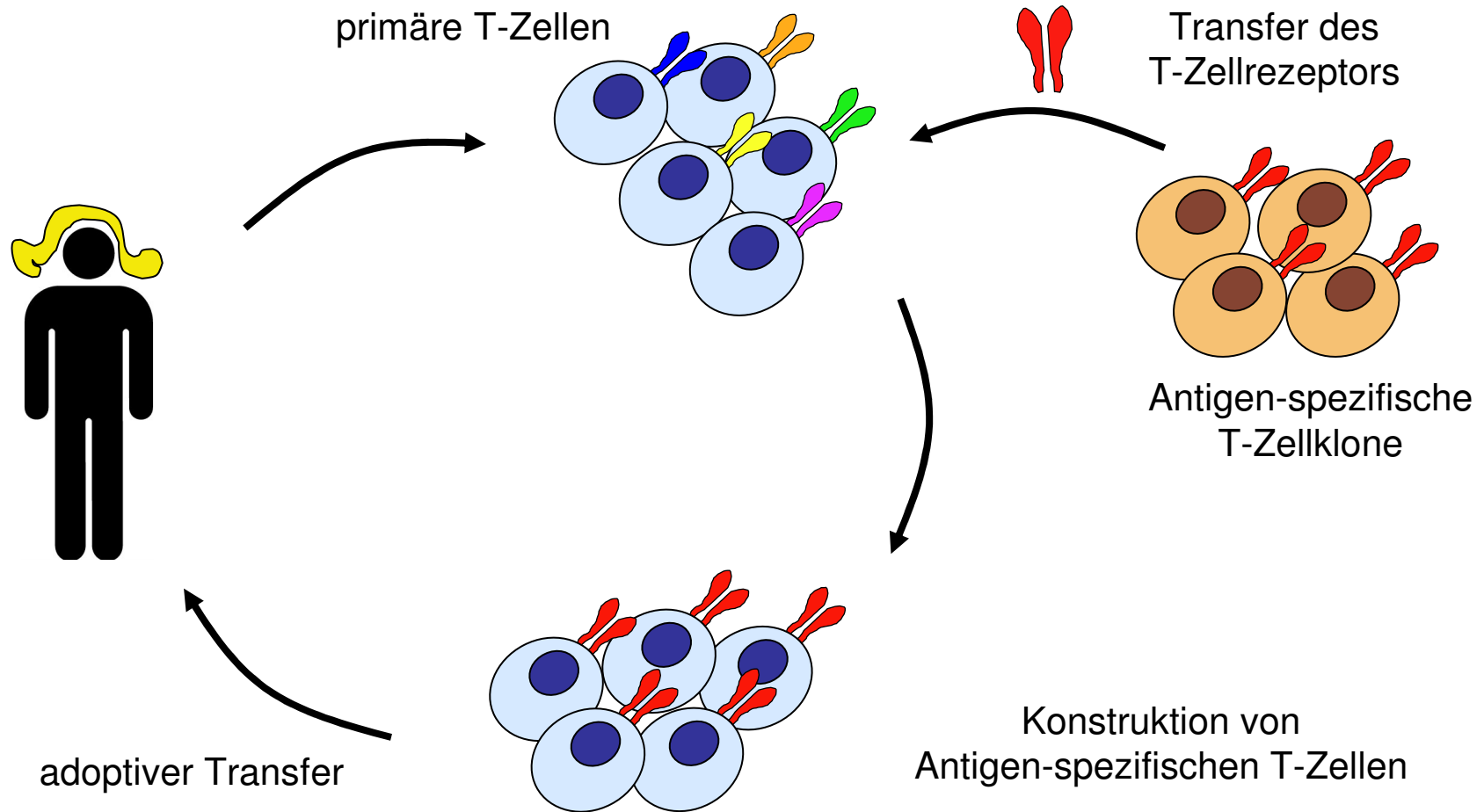
HER3 p356-364 **KILGNLDFL**

HER4 p361-369 **KINGNLIFL**

## Potentielle HER T-Zellrezeptoren

Clone	Priming Model	Restriction	Antigen Specificity	Function	TCR cloning	Function	Optimizing	Function
KU1	allo/HER2 <sub>369-377</sub>	CD8/A2	HER3>HER2,HER4	++	✓	+	✓	++
KU40	allo/HER2 <sub>369-377</sub>	CD8/A2	HER2	++	in progress			
KW63	auto/HER2-mRNA	CD8/A2	HER2>>>HER3	++	✓	+	in progress	
OG2	auto/HER2 <sub>883-899</sub>	CD4/DR4	HER2	+				
OG5	auto/HER2 <sub>883-899</sub>	CD4/DR4	HER2	++	in progress			
CM5	allo/HER3 <sub>356-364</sub>	CD8/A2	HER3>>>HER2	++				
CM30	allo/HER3 <sub>356-364</sub>	CD8/A2	HER3>>>HER2	++				
CM37	allo/HER3 <sub>356-364</sub>	CD8/A2	HER3>>>HER2	++				
CM42	allo/HER3 <sub>356-364</sub>	CD8/A2	HER3>>>HER2	++	✓	in progress		
CM56	allo/HER3 <sub>356-364</sub>	CD8/A2	HER3>>>HER2	++				

# Konstruktion von Antigen-spezifischen T-Zellen für den Transfer



# DANKSAGUNG

## *Labor Bernhard*

Heinke Conrad  
Bettina Brackertz  
Barbara Kast  
Kerstin Gebhard  
Julien Daniel  
Kathrin Julia Falchner  
Kathrin Hofer  
Melanie Kimm  
Holger Krönig  
Stephanie Mayer  
Julia Müller  
Maria Rosa Salvador

## *Kooperationen*

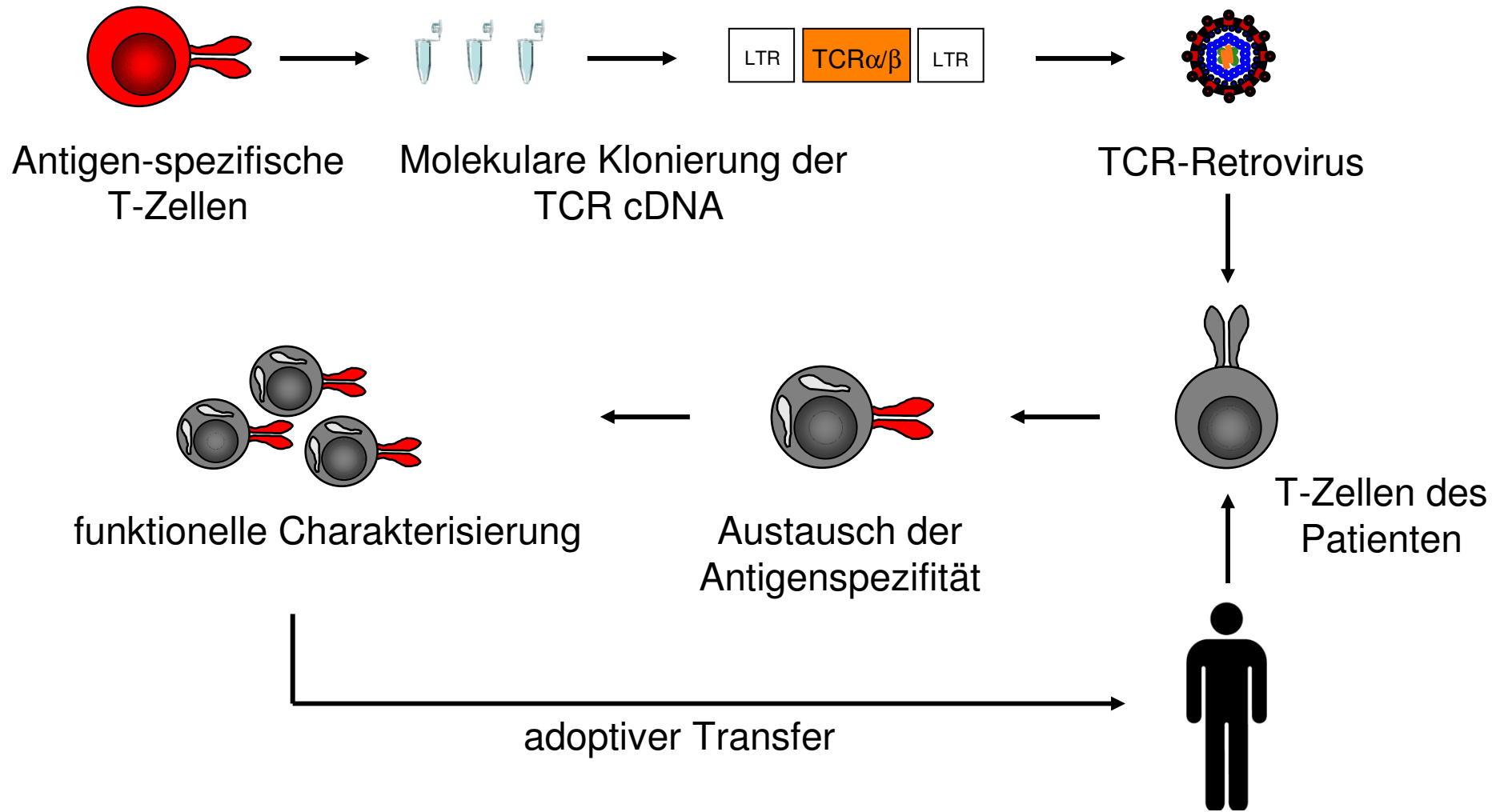
Technische Universität München  
Helmholtz-Allianz München  
Charité + MDC Berlin  
Ludwig Institute for Cancer Research  
Deutsches Krebsforschungszentrum

## *Förderung*

Deutsche Forschungsgemeinschaft  
Helmholtz Allianz  
José Carreras-Stiftung  
Wilhelm Sander-Stiftung  
Merck KGaA Darmstadt



# Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellrezeptoren



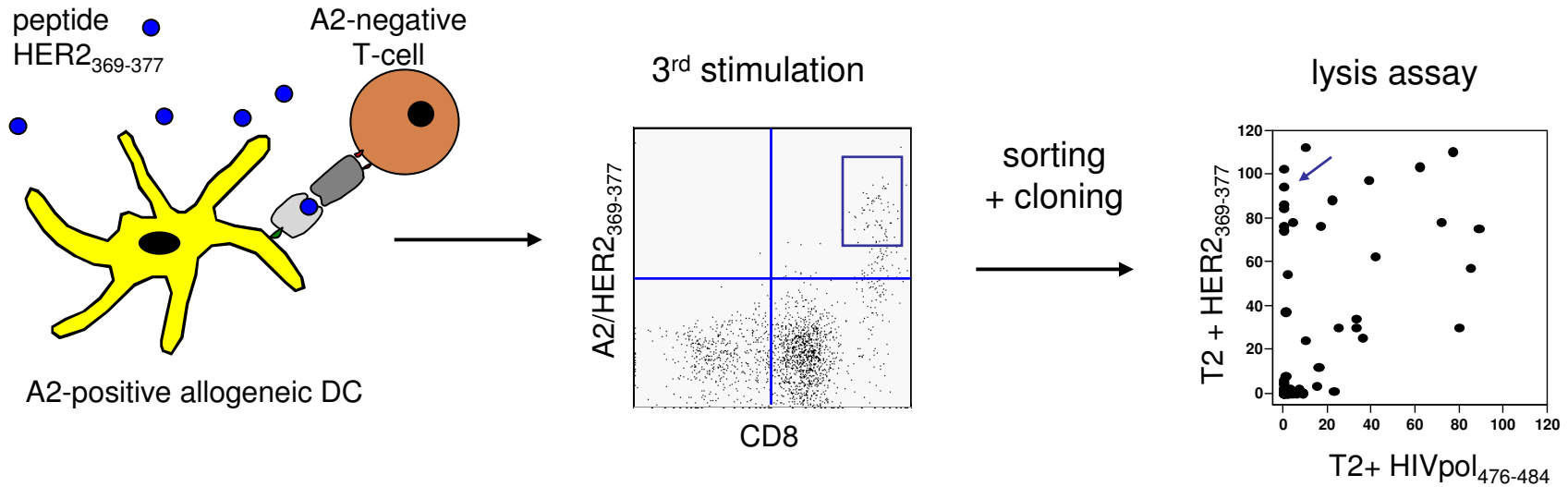
## Ziel: Breite Applikation von tumor-reaktiven T-Zellen durch TCR-Gentransfer

- Set von antigen-spezifischen T-Zellklonen
- hohe T-Zellrezeptor-Avidität
- gute Tumorerkennung
- Analyse der Kreuzreaktionen



- Klonierung der TCRs in retrovirale Vektoren
- TCR Gentransfer in primäre T-Lymphozyten
- Selektion von dominant exprimierten TCRs
- Optimierung der TCR-Expression
- Spezifität und Funktion der TCR transgenen T-Zellen

# Generierung von HER2-spezifischen CTL-Klonen aus HLA-A2- CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit allogenen HLA-A2<sup>+</sup> DC



## CTL clone KU #1

