

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Entwicklung einer modularen adoptiven T-Zell-Plattform, basierend auf einem
anti-P329G chimären Antigenrezeptor, für das Screening von Antikörpern im IgG1
Format und zur Anwendung für die adoptive T-Zell-Therapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diana Darowski

aus Heilbronn

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. Christian Klein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2020

Für meine Großeltern

Bruno und Renate Darowski

«In the present moment, all possibilities exist»

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebsimmuntherapie und adoptiver T-Zell-Transfer.....	1
1.2	Antikörper und Antikörperderivate in der Immuntherapie.....	1
1.2.1	Aufbau von Antikörpern und Interaktion von Fc und FcγRIII.....	1
1.2.2	Bispezifische T-Zell-Antikörper.....	3
1.3	CAR-T-Zellen in der Immuntherapie.....	3
1.3.1	Aufbau von CAR-T-Zellen und konventionelles Design des CAR.....	3
1.4	Klinische Erfolge und Nebenwirkungen von CAR-T-Zellen.....	5
1.5	Modulare CAR-T-Zell-Systeme.....	5
1.6	Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit.....	6
2	Material	8
2.1	Geräte.....	8
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	8
2.3	Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	8
2.4	Medien für die Zellkultur.....	9
2.5	Supplementierte Basismedien und deren Zusammensetzung.....	9
2.6	Medienzusätze.....	9
2.7	Zelllinien, Bakterien und Enzyme.....	10
2.7.1	Primäre Zellen und Zelllinien.....	10
2.8	Enzyme.....	10
2.9	Antikörper und Kits.....	10
2.9.1	Antikörper zur Etablierung des anti-P329G-CAR.....	10
2.9.2	Kits.....	11
2.10	Software.....	11
3	Methoden	12
3.1	Zellkultur Techniken.....	12
3.1.1	Kultivierung, Auftauen, Zählen und Einfrieren von Zellen.....	12
3.1.2	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	12
3.1.3	Lentivirale Viruspartikel Produktion und Transduktion humaner Zellen.....	12
3.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	13
3.2.1	Klonierung von chimären Antigenrezeptoren.....	13
3.3	Funktionale Assays.....	13
3.3.1	CAR-Jurkat-Assay.....	13
3.3.2	Jurkat-NFAT-Assay.....	14
3.3.3	Tumorzelllyse-Assay.....	14
3.4	Durchflusszytometrie.....	14
3.5	Zytokin-Bestimmung.....	15
3.6	Statistische Analyse.....	15
4	Ergebnisse	16
4.1	Etablierung der anti-P329G-CAR-T Reporterzelllinien.....	16
4.1.1	Konstruktion und Expression der Fab- oder scFv-CAR-in Jurkat-Reporterzellen.....	16
4.1.2	Spezifische Erkennung der P329G Mutation durch anti-P329G-CAR-J-Zellen am Beispiel von CD20 ⁺ Tumorzelllinien in Kombination mit anti-CD20 P329G LALA IgG1 CAR-Adaptoren... ..	17
4.1.3	Anwendbarkeit der anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinien unter Verwendung diverser Tumorzelllinien.....	17
4.1.4	Der anti-P329G-CAR-J-Assay ermöglicht die Einschätzung der Bindung und der biologischen Aktivität eines Binders im 2+1 TCB-Format.....	20
4.1.5	Vergleich der Aktivierbarkeit von anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen und FcγRIIIa-CAR-J-Reporterzellen.....	22
4.1.6	Einfluss von Serum IgG auf die Aktivierung des anti-P329G-CAR.....	23
4.2	Etablierung des anti-P329G-CAR für den adoptiven T-Zell-Transfer.....	24
4.2.1	Expression des anti-P329G-CAR im scFv-Format in primären T-Zellen.....	24
4.2.2	Einfluss verschiedener Antikörper Konzentrationen auf das Tumorzelllyse-Verhalten von anti-P329G-CAR-T-Zellen.....	25
4.2.3	Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf anti-P329G-CAR-T-Zellen.....	27

5	Diskussion	29
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse und Erkenntnisse	29
5.2	Etablierung einer modularen anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinie mit Antigenerkennungsdomäne im scFv- und Fab-Format	29
5.3	Anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen und Alternativen für das Selektieren von Bindern	32
5.4	Evaluierung von anti-P329G-CAR-T-Zellen für die therapeutische Anwendung als Alternative zu konventionellen CAR-T-Zellen	35
5.5	Regulierung anti-P329G-CAR-T-Zellen und modCAR-T-Zellen über CAR-Adapter	36
5.6	anti-P329G-CAR-T-Zellen erlauben simultanes erkennen verschiedener Antigene	38
5.7	Das Verhältnis von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen entscheidet über erfolgreiche Tumorzelllyse	40
5.8	Ausblick und weiterführende Anwendungen des anti-P329G-CAR.....	41
6	Zusammenfassung	43
7	Summary	44
8	Abkürzungsverzeichnis mit Glossar	45
9	Literaturverzeichnis	46
10	Appendix	58
10.1	Publikationen	58
10.2	Patentanmeldungen	58
10.3	Vorträge	59
10.4	Posterpräsentationen	59
10.5	Danksagungen.....	60
10.6	Eidesstattliche Versicherung.....	61

1 Einleitung

1.1 Krebsimmuntherapie und adoptiver T-Zell-Transfer

Krebs zählt zu den führenden Todesursachen weltweit und wird zukünftig sehr wahrscheinlich noch vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache darstellen (Dagenais et al. 2019). Um dem entgegenzuwirken wurden über die Jahre verschiedene Therapieansätze wie Chirurgie, Radio- und Chemotherapie stetig weiterentwickelt. Als Ergänzung zu diesen etablierten Behandlungsmethoden hat sich ein weiterer vielversprechender Ansatz hervorgetan, die Immuntherapie. Bei der Krebsimmuntherapie wird das Immunsystem des Patienten manipuliert und zur Bekämpfung von Tumorzellen genutzt (Kruger et al. 2019). Zu den derzeitigen Strategien, die klinische Anwendung finden und zugelassen sind, zählen Immuncheckpoint-Blocker, adoptiver-Zelltransfer und T-Zell-rekrutierende Antikörper (Kobold et al. 2015, Kueberuwa et al. 2018, Lesch et al. 2019).

1.2 Antikörper und Antikörperderivate in der Immuntherapie

1.2.1 Aufbau von Antikörpern und Interaktion von Fc und FcγRIII

Antikörper werden im Zuge einer Abwehrreaktion des Körpers von Plasmazellen gebildet und sind Teil der adaptiven Immunantwort. Antikörper sind spezifisch gegen ein Antigen und lassen sich in fünf Immunglobulin (Ig)-Klassen – IgG, IgM, IgA, IgD und IgE – unterteilen. Die Grundstruktur ist Y-förmig und besteht aus zwei identischen schweren Polypeptidketten (H) und zwei identischen leichten Polypeptidketten (L). Diese einzelnen Polypeptidketten werden über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten. Weiterhin lassen sich die Polypeptidketten in eine konstante (C) und eine variable Region (V) unterscheiden, wobei die V_H und die V_L für die Antigenerkennung zuständig sind (Abbildung 1). Die konstanten Regionen der schweren Ketten bilden den Fc-Teil (*fragment crystallizable*) des Antikörpers. Der Fc-Teil von Antikörpern reguliert die Antikörper abhängigen zytotoxischen Aktivitäten und bestimmt die Serum-Halbwertszeit (Leabman et al. 2013). Rituximab, ein monoklonaler anti-CD20 Antikörper, war der erste Antikörper der von der amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Food and Drug Administration, FDA) 1997 für die Krebsimmuntherapie zugelassen wurde (Maloney et al. 1994, McLaughlin et al. 1998). Der klinische Erfolg von Rituximab legte den Grundstein für die Anwendung von monoklonalen Antikörpern in der Krebsimmuntherapie und führte zur Entwicklung weiterer therapeutischer Antikörper (Weiner et al. 2010). Die Wirkmechanismen dieser Antikörpern basieren auf der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, (ADCC)), der komplementvermittelten Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, (CDC)), Neutralisierung des Targets oder auf immunmodulatorischen Effekten auf T-Zellen (Suzuki et al. 2015). Immunmodulatorische Antikörper, aktivieren die Tumorabwehr, indem aktivierende T-Zell-Rezeptoren stimuliert werden oder inhibitorische Interaktionen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen blockiert werden. Gerade bei solchen antagonistischen Antikörpern wie anti-programmed death-1 (PD-1)-Antikörper oder anti-PD-1 Ligand-Antikörper ist die Funktion hauptsächlich von den Fab-Fragmenten abhängig (Jutz et al. 2017). Um den Erfolg einer solchen Therapie zu gewährleisten und potentielle ADCC oder CDC Effekte zu vermeiden,

müssen diese immunmodulatorischen Antikörper eine geringe oder bestenfalls keine Bindung zu Fc γ -R besitzen (Schlothauer et al. 2016). Da sonst unerwünschte Nebeneffekte wie das Schädigen von gesundem Gewebe, das Aggregieren von Thrombozyten (Worthington et al. 1990) oder die Eliminierung von Effektor-T-Zellen auftreten können (Chen et al. 2019). In präklinischen Studien in denen PD-1-Inhibitoren getestet wurden, kam es zur Eliminierung von PD-1⁺ T-Zellen die aufgrund von ADCC durch Fc γ RI⁺ Makrophagen phagozytiert wurden (Lo Russo et al. 2019). Dies hatte die Hyperprogression des Tumors zur Folge. Hyperprogression des Tumors ist ein häufiger Nebeneffekt der bei einem von fünf Patienten auftritt, die mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt werden und in kürzester Zeit zum Tod des Patienten führt (Lo Russo et al. 2019). Deshalb werden Antikörper benötigt, bei denen die Fc-Fragment-vermittelten Effektorfunktion abgeschwächt oder komplett eliminiert sind (Leabman et al. 2013, Lund et al. 1992). Eine Möglichkeit, dies zu erreichen ist das Einführen von Mutationen im Fc-Teil des Antikörpers. Die Kombination dreier Mutationen nämlich die Leucin (L) zu Alanin (A) Substitutionen an den Positionen 234 und 235 (LALA) sowie die Prolin (P) zu Glycin (G) Substitution an der Position 329 (P329G) führt zu einem solchen Effekt (Sondermann et al. 2000). Das Prolin an der Position 329 des humanen IgG1 Fc bildet van-der-Waals-Interaktionen mit zwei Tryptophanen 108 und 131 des Fc γ RIII aus und sichert so die Bindung des IgG1 an den Rezeptor (Sondermann et al. 2000). Dieses Motiv der Prolin-Tryptophan Interaktion ist zwischen den meisten Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren und den vier humanen IgG-Isotypen sowie den humanen IgE Sequenzen konserviert (Garman et al. 2000, Radaev et al. 2001). Durch die P329G Substitution kann die Fc-Fc γ R Interaktion aufgehoben werden. Das Recycling über FcRn wird allerdings nicht beeinträchtigt. Das Einführen der P329G LALA Mutationen in den Fc-Teil des Antikörpers, führt somit zu kompletten Inhibierung der Fc- γ R abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität und zur Inhibierung der Interaktion mit dem Komplement Protein C1q (Hezareh et al. 2001, Schlothauer et al. 2016). Therapeutische Anwendung finden die P329G LALA Mutationen beispielsweise in bispezifischen Antikörpern, deren Funktion ausschließlich über die Fab-Fragmente vermittelt werden soll (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016, Brunker et al. 2016, Herter et al. 2018, Klein et al. 2016).

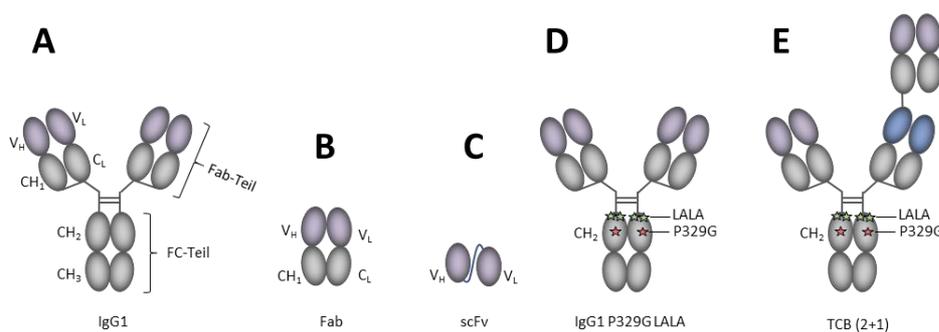


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines IgG1 Antikörpers sowie verschiedener Antikörpervariationen, modifiziert nach Klein et al. (Klein et al. 2016). A: zeigt eine schematische Darstellung eines IgG1 und seine einzelnen Komponenten, bestehend aus einem Fc-Teil und einem Fab-Fragment. B: zeigt ein Fab-Fragment, bestehend aus einer konstanten schweren (C_{H1}) und einer konstanten leichten Kette (C_L) sowie einer variablen leichten (V_L) und einer variablen schweren (V_H) antigenerkennenden Domäne. C: zeigt ein Einzelketten (scFv)-Fragment bestehend aus einer (V_L) und einer variablen schweren (V_H) Domäne, wobei diese über einen Linker verbunden sind. Die Abbildung ist modifiziert nach Ha et al (Ha et al. 2016). D: zeigt einen IgG1 mit schematischer Kennzeichnung der P329G Mutation in der CH₂ Region und den beiden L234A, L235A Substitutionen in der oberen hinge-Region der CH₂ Domäne (Schlothauer et al. 2016). E: zeigt einen bispezifischen Antikörper im 2+1 Format. Dieser besteht aus zwei Fab-Bindern gegen das Tumorantigen und einem Fab-Binder (blau), der gegen CD3 auf der T-Zelle gerichtet ist.

1.2.2 Bispezifische T-Zell-Antikörper

Weitere Antikörperformate, die klinische Anwendung finden, sind bi- oder multispezifische T-Zell-Antikörper (Klein et al. 2016, Thakur et al. 2018). Hierbei handelt es sich um artifizielle Antikörper mit differenzierter Antigenspezifität, die seriell T-Zellen rekrutieren und antigenvermittelte Tumorzelllyse induzieren (Wolach et al. 2015). Diese bispezifischen Antikörper stellen den Kontakt zwischen T-Zelle und Tumorzelle her, indem sie simultan an das gewünschte Tumorantigen und eine CD3 Untereinheit des TCR binden (Klein et al. 2019, Smits et al. 2016). Daraus resultiert eine Kreuzvernetzung von Tumorzelle und T-Zelle. Diese Kreuzvernetzung führt zum Ausbilden einer immunologischen Synapse und hat die Aktivierung der T-Zelle zur Folge. Die aktivierte T-Zelle proliferiert und vermittelt eine antigenabhängige Tumorzelllyse (Wolach et al. 2015). Generell werden zwei Kategorien an T-Zell-spezifischen Formaten (TCB) unterschieden, (i) Fc-freie TCB und (ii) IgG-basierte TCB. Der zur ersten Kategorie gehörende, bispezifische T-Zell-Engager (BiTE) Blinatumomab wurde 2014 von der FDA zugelassen (Przepiorka et al. 2015). Blinatumomab setzt sich aus zwei scFv zusammen und ist gegen CD19 und CD3 gerichtet (Przepiorka et al. 2015, Suresh et al. 2014). Dadurch, dass dieser BiTE keinen Fc-Teil besitzt, konnten anfängliche Produktionsschwierigkeiten und unerwünschte, Fc-vermittelte Nebenwirkungen vermieden werden (Lo et al. 2017). Blinatumomab wurde so zu einer erfolgreichen Behandlungsmethode für wiederkehrende oder refraktäre akute lymphatische B-Zell Leukämie (Przepiorka et al. 2015). Ein Nachteil dieser Fc-freien bispezifischen Antikörper ist allerdings die kurze Halbwertszeit, die eine kontinuierliche Infusion des Moleküls erfordert (Portell et al. 2013). Neuere TCB Generationen sind IgG-basierte Formate und besitzen einen Fc-Teil mit verminderter oder komplett inhibierter Fc γ R Bindung, jedoch IgG-ähnliche Pharmakokinetik (Bacac et al. 2016, Klein et al. 2019, Sun et al. 2015). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TCB Formate sind potente Antikörper im 2+1 Format und bestehen aus einem nicht-funktionalen Fc-Teil, zwei Fab-Bindern gegen das Tumorantigen und einem Fab-Binder, der gegen CD3epsilon (CD3 ϵ) auf der T-Zelle gerichtet ist (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016, Klein et al. 2016). Durch Bindung des Tumorantigens mittels den beiden antigenspezifischen Fab-Bindern und die simultane monovalente Bindung des anti-CD3 Fab-Binders an die T-Zelle kommt es zur Aktivierung und Freisetzung von Zytokinen (Kobold et al. 2018, Strohl et al. 2019). Diese TCB besitzen die P329G Mutation und vermitteln somit keine Fc-Effektorfunktion. Dennoch besitzen sie aber den Vorteil einer langen Halbwertszeit und eignen sich somit für die therapeutische Anwendung (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016). Eine weitere Anwendung, die sich ebenfalls die Rekrutierung von T-Zellen zu Nutze macht, sind chimäre Antigenrezeptoren (CAR) (Eshhar et al. 1993). Diese werden stabil in das T-Zell-Genom integriert und erkennen das Antigen direkt (Holzinger et al. 2019).

1.3 CAR-T-Zellen in der Immuntherapie

1.3.1 Aufbau von CAR-T-Zellen und konventionelles Design des CAR

Besonders die adoptive T-Zell-Immuntherapie mit chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) hat bei weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen in den letzten Jahren vielversprechende Resultate gezeigt. Im Zuge der CAR-T-Zell-Therapie werden Patienten-autologe T-Zellen mittels Leukapherese entnommen und ex vivo mit einem rekombinanten Oberflächenmolekül, dem CAR, ausgerüstet (Tyagarajan et al. 2019). Der

CAR ist stabil in das T-Zell-Genom integriert und kann bei der Zellteilung an die nächste Zelle weitergegeben werden. Die Antigenerkennung durch CAR-T-Zellen erfolgt im Gegensatz zu natürlich vorkommenden T-Zellen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) unabhängig (Murphy et al. 2005). Außerdem ist es möglich, durch die Wahl der extrazellulären Antigenerkennungsdomäne des CAR die Affinität zum Antigen zu modulieren, um so die Antigenselektivität zu erhöhen. Eine der ersten Versionen von CAR-T-Zellen, wurde von Zelig Eshhar et al. zu Beginn der 1990er beschrieben (Eshhar et al. 1993). Hierbei handelt es sich um CAR-T-Zellen, bei der die variable Region (Fv) eines Antikörpers mit der aktivierenden Domäne des T-Zellrezeptors (TCR) fusioniert wurde. Dieses Konzept wurde weiter ausgearbeitet und dabei die variable schwere und die variable leichte Antikörper Einzelketten (*single-chain*) (scFv) (Abbildung 2) mit einem Proteinlinker mit der CD3 ζ Signaldomäne des TCR fusioniert. Es konnte gezeigt werden, dass diese CAR-T-Zellen (1. Generation) Interleukin 2 (IL-2) sekretieren und spezifisch Targetzellen lysieren (Eshhar et al. 1993). Über die Jahre wurden verschiedene Parameter identifiziert, um die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen zu optimieren. Hierzu zählen beispielsweise die Integration unterschiedlicher einzelner (2. Generation CAR) oder Kombinationen ko-stimulatorischer Domänen (3. Generation CAR) wie CD28, CD134 oder CD137 (Scarfo et al. 2017). Mittlerweile existieren durch konstantes Optimieren des CAR-Designs verschiedene weitere Formen (Holzinger et al. 2019). Diese CAR-T-Zellen sind in der Lage Zytokine und andere transgene Produkte zu produzieren, welche beispielsweise die CAR-T-Zell-Proliferation verbessern oder eine sekundäre Immunantwort induzieren (Chmielewski et al. 2012). Letzteres kann durch die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunantwort wie beispielsweise Makrophagen oder NK-Zellen erfolgen (Chmielewski et al. 2012, Chmielewski et al. 2015, Kueberuwa et al. 2018). In klinischen Studien werden vorwiegend CAR der 2. Generation verwendet, die das Antigen auf der Zelloberfläche direkt binden (Hartmann et al. 2017). Primär setzen sich diese CAR aus drei Domänen zusammen: einer intrazellulären Signaldomäne (ICD), welche über eine Transmembrandomäne (TMD) mit einer extrazellulären Antigenerkennungsdomäne (AED) verbunden ist (Hartmann et al. 2017). In den meisten CAR ist die AED ein scFv, wobei es verschiedene andere Ansätze gibt, bei denen der scFv-AED beispielsweise durch eine Fc γ RIII-AED substituiert ist (Darowski et al. 2019).

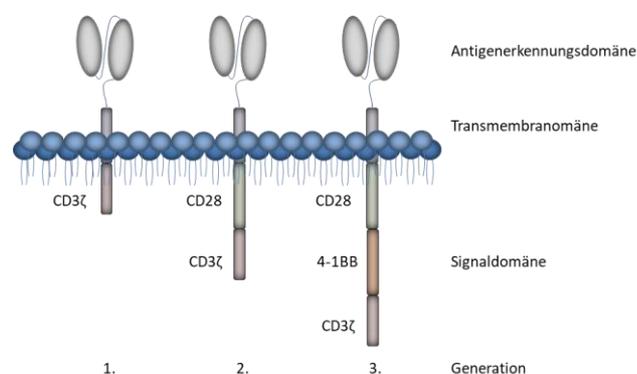


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von CAR der 1—3. Generation, modifiziert nach Scarfo et al. (Scarfo et al. 2017). CAR bestehen aus einer Antigenerkennungsdomäne, die über eine Transmembrandomäne mit der Signaldomäne verbunden ist. CAR der 1. Generation enthalten eine intrazelluläre CD3 ζ Signaldomäne. CAR der 2. Generation besitzen zusätzlich zu der CD3 ζ Signaldomäne eine ko-stimulatorische Domäne, in diesem Beispiel als CD28 gekennzeichnet. CAR der 3. Generation enthalten zusätzlich zu der CD3 ζ Signaldomäne und der CD28 Domäne noch eine weitere ko-stimulatorische Domäne, hier als 4-1BB gekennzeichnet.

1.4 Klinische Erfolge und Nebenwirkungen von CAR-T-Zellen

Zurzeit entwickeln sich CAR-T-Zellen zu einem der vielversprechendsten immunonkologischen Therapieansätze für die Behandlung von Blutkrebs. Aufgrund der klinischen Erfolge wurden bisher zwei CD19-spezifische CAR-T-Zell-Therapien, Kymriah™ (tisagenlecleucel) (FDA et al. 2018) und Yescarta® (axicabtagene ciloleucel) (FDA et al. 2018) in den USA und der EU zugelassen. Allerdings kommt es bei der klinischen Anwendung von CAR-T-Zellen nicht selten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen (Yanez et al. 2019). Zu diesen zählen das erhöhte Freisetzen von Zytokinen (*cytokine release syndrom, (CRS)*) und das Makrophagen-Aktivierungssyndrom (MAS) (Ali et al. 2019, Bishop et al. 2019). Durch die massive Aktivierung des Immunsystems werden Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Makrophagen-Kolonie Stimulierungsfaktor (GM-CSF), Interleukin-6 (IL-6) und IL-10 freigesetzt (Morgan et al. 2010). CAR-T-Zellen können Tumorzellen repetitiv lysieren, gleichzeitig kommt es zur Expansion der CAR-T-Zellen. Dies kann eine Kettenreaktion in Gang setzen, die zur unkontrollierten Lyse von gesundem Gewebe führt, wenn das Zielantigen auch dort präsent ist (*On-target, off-tumor effect*) (Yu et al. 2019). Um solchen Nebenwirkungen entgegenzuwirken, wurden die beiden anti-CD19-CAR-T-Zell-Therapien zusätzlich mit einem Marker ausgestattet, der es ermöglicht diese Zellen selektiv zu eliminieren. (FDA et al. 2018, FDA et al. 2018, Philip et al. 2014). Dies hat dann allerdings einen vollständigen Verlust der Zellen zur Folge, weshalb diese gegebenenfalls erneut verabreicht werden müssten (Tokarew et al. 2019). Ein neuer Ansatz, der es ermöglicht CAR-T-Zellen besser zu steuern und nicht vollständig aus dem System zu eliminieren, sind sogenannte universelle oder modulare CAR-T-Zellen (modCAR-T) (Cartellieri et al. 2016, Cho et al. 2018, Darowski et al. 2019).

1.5 Modulare CAR-T-Zell-Systeme

Durch die Integration von CAR in T-Zellen, sind diese in der Lage beliebige Antigenstrukturen zu erkennen, in Abhängigkeit der genutzten Antigenerkennenden Domäne (Eshhar et al. 1993). Dabei können CAR nicht nur gegen konventionelle Tumorantigene, sondern auch gegen neo-Epitope wie Fluorescein isothiocyanate (FITC) oder andere Haptene generiert werden (Darowski et al. 2019, Minutolo et al. 2019). Gekoppelt an ein Adapter-Molekül, welches das Tumorantigen erkennt, können sogenannte universelle oder modularer CAR-T-Zellen (modCAR-T-Zellen) entwickelt werden (Cartellieri et al. 2016). Das bedeutet, dass die modCAR-T-Zellen nicht direkt gegen ein Tumoroberflächenantigen gerichtet sind, sondern stattdessen einen CAR-Adapter binden; der dann wiederum an das Tumorantigen bindet (Darowski et al. 2019). Die Bildung der immunologischen Synapse kann deshalb nur zustanden kommen, wenn der entsprechende Tumorantigen-spezifische CAR-Adapter vorhanden ist. Dadurch wird das flexible Binden verschiedener Tumorantigene mit einer nur einmalig transduzierten CAR-T-Zelle ermöglicht (Cho et al. 2018). Über die Wahl des CAR-Adapters in Bezug auf die Halbwertszeit, hoch oder niedrigaffine Binder, sowie das zu bindende Tumorantigen, kann die Effektivität der modCAR-T-Zellen moduliert werden und potentielle Nebenwirkungen minimiert werden (Cho et al. 2018). Die Mehrheit der CAR-Adapter, die in der Literatur beschrieben werden, basieren auf IgG Molekülen oder IgG-Derivaten wie beispielsweise scFv, Fab oder Nanobodies (Darowski et al. 2019, Minutolo et al. 2019).

Ein weiterer Ansatz der modCAR-T-Zellen sind CD16-CAR-T-Zellen (D'Aloia et al. 2016). Diese nutzen vorwiegend den hoch affinen Fc γ RIIIa-Rezeptor als extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne und sind somit in der Lage an die Fc-Domäne von IgG zu binden (Rataj et al. 2019). In Kombination mit verschiedenen therapeutischen Antikörpern wie Rituximab (anti-CD20) (Clemenceau et al. 2006) oder Trastuzumab (anti-HER2) (Ochi et al. 2014) können CD16-CAR-T-Zellen die Tumorzelllyse induzieren (Caratelli et al. 2017, Rataj et al. 2019). Allerdings besitzen CD16-CAR-T-Zellen eine niedrige micromolare Affinität, so dass endogene Antikörper um die CD16-ECD-Bindung kompetieren können. Dadurch sind CD16-modCAR-T-Zellen auch potentiell in der Lage endogene Antikörper wie autoimmun-Antikörper zu erkennen und gesundes Gewebe zu zerstören (Caratelli et al. 2017).

1.6 Rationale und Zielsetzung der Promotionsarbeit

Derzeitig verfügbare CAR-basierte Ansätze sind so konzipiert, dass sie konstitutiv exprimiert werden und in Gegenwart des Antigens aktiv sind (Holzinger et al. 2019). Die stetige Proliferation der CAR-T-Zellen nach Antigenerkennung führt zu stetig steigenden Zytokin-Spiegeln, die unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Derzeitige Ansätze, um diese Nebenwirkungen zu kontrollieren, basieren auf der Gabe von anti-inflammatorischen Medikamenten oder auf der Eliminierung der CAR-T-Zellen. Dadurch wird der therapeutische Effekt eingeschränkt oder komplett inhibiert. Um dem entgegenzuwirken werden modCAR-T-Zell-Ansätze verwendet, bei denen CAR-Adapter benötigt werden, um die immunologische Synapse auszubilden. Dies ermöglicht flexible Antigenerkennung und das „An/Ab-schalten“ von CAR-T-Zellen. Diese modularen Ansätze bedienen sich allerdings CAR-Adaptoren, die beispielsweise durch die Fusion eines Hapten oder Peptid-Tags modifiziert sind. Dadurch können unerwünschte immunogene Reaktionen im Patienten hervorgerufen werden (Lohmueller et al. 2017). CD16-CAR-T-Zellen als weiterer Ansatz, nutzen bereits klinisch validierte Antikörper (Tanaka et al. 2016). Ein Nachteil dieser CD16-CAR-T-Zellen ist jedoch die niedrige mikromolare Affinität, so dass endogene Antikörper um die CD16-Bindung kompetieren können und es zur Zerstörung von gesundem Gewebe kommen kann (Caratelli et al. 2017). Um die genannten Probleme zu umgehen war es Ziel dieser Arbeit, einen neuartigen CAR zu entwickeln, der die Punktmutation P329G erkennt (Sondermann et al. 2000). P329G wird in 2+1 TCB therapeutischen Antikörpern eingesetzt (Bacac et al. 2016, Bacac et al. 2016) um die Fc-Effektorfunktion zu eliminieren und kommt nicht in endogen-vorkommenden Antikörper vor. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunogenität des Antikörpers durch das Einführen der P329G Mutation nicht erhöht ist (Roche, unveröffentlicht). Daher ist die P329G Mutation für die Antigenerkennung durch einen CAR geeignet.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es eine neuartige modulare CAR-T-Zell-Plattform zu entwickeln, die auf der Erkennung der P329G Mutation basiert. Um eine solche Plattform zu entwickeln, die sich sowohl für die Selektion von Bindern im IgG1 Format als auch für den adoptiven T-Zell-Transfer eignet, wurden folgende Punkte bearbeitet:

Teil I: Selektion und Screening von Antikörpern

- (i) Konstruktion eines CAR mit einer anti-P329G Erkennungsdomäne im scFv- und Fab-Format
- (ii) Generierung einer modularen anti-P329G-CAR-Jurkat Reporterzelllinie

- (iii) Etablierung der anti-P329G-CAR-Reporterzelllinie zur Selektion von Bindern im IgG1-Format
- (iv) Evaluieren der Funktionalität selektionierter Binder nach Konvertierung in das 2+1 TCB-Format

Teil II: Adoptiver T-Zell-Transfer

- (v) Generierung modularer primärer anti-P329G-CAR-T-Zellen
- (vi) Verwendung von P329G CAR-Adapter zur Induktion der Tumorzelllyse
- (vii) Charakterisierung der anti-P329G-CAR-T-Zellen

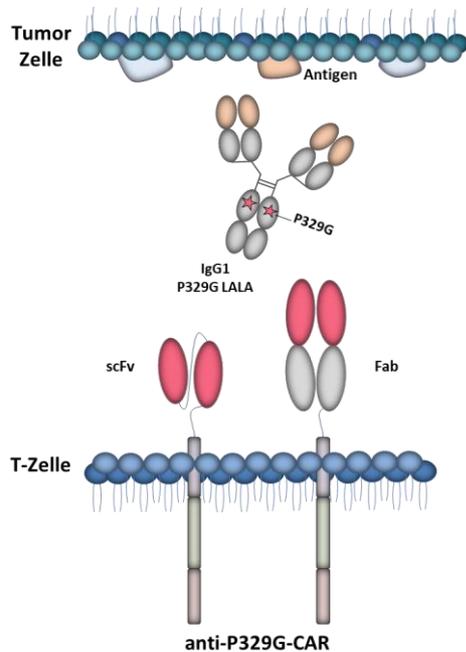


Abbildung 3: Schematische Darstellung des modularen anti-P329G-CAR-T-Zell-Konzepts mit P329G IgG1. Die Kreuzvernetzung von Tumor-Zelle und anti-P329G-CAR-T-Zelle wird durch den P329G LALA IgG1 vermittelt. Die Bindung des Antikörpers an das Tumorantigen und die simultane Bindung des anti-P329G-CAR an den Antikörper hat die Aktivierung der modCAR-T-Zelle zur Folge.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1 Technische Geräte mit Angabe des Zulieferbetriebs

Gerät	Zulieferbetrieb
BD FACSCanto II	BectonDickinson, NJ, USA
BD LSRFortessa™	BectonDickinson, NJ, USA
E1-ClipTip, Multipette	Thermo Scientific™, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific™, Deutschland
Gelkammern und Netzwerkanschluss	PowerPac Basic, BioRad
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C,- 20 °C)	Mediline Liebherr, Deutschland
Mastercycler proS	Eppendorf, Schweiz
Mikroskop CKX53	Olympus, USA
Mikroskop OX7	Olympus, USA
Minutenifuge GmClab	Gilson, USA
NanoDrop2000	FisherScientific, Schweiz
Sterilwerkbank HeraCell 150, Scanlaf SAFE 1200	Vitaris, Schweiz
TecanReader Spark® Control	Tecan, Schweiz
Technisches Gerät	Zulieferbetrieb
Vakuumpumpe, BVC professional	Vacuumbrand GMBH + CO KG, Schweiz
Vortex- Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	GFL, Deutschland
Zellkultur CO ₂ Inkubator	Heracell, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zellzähler, Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter™, USA
Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Schweiz
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Schweiz

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für Zellkultur und mikrobiologische Arbeiten wurden von den Firmen TPP (Europa/Schweiz), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Deutschland), Greiner Bio-One (Deutschland), Thermo Scientific (Finnland, Schweiz), BioScienc Inc. (USA) und Beckman Coulter (USA) verwendet.

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 2 Kommerziell erhältliche Chemikalien, Reagenzien und Puffer mit Angabe des Zulieferbetriebs

Chemikalien, Reagenzien und Puffer	Zulieferbetrieb
Ampicillin	PAA, Pasching, Germany
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (0.25 %)	ThermoFischer Scientific™, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ThermoFischer Scientific™, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Gibco™ ThermoFischer Scientific™, Deutschland
LentiBoost, SB-P-LV-101-01	Sirion Biotech, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose LE	Roche, Schweiz
Histopaque®	Sigma, Schweiz
ONE-Glo™ Luciferase Assay System E6120	Promega, Schweiz
lyophilisierter humaner Serum IgG	Sigma-Aldrich

2.4 Medien für die Zellkultur

Tabelle 3 Basismedien von Gibco™ wurden von ThermoFischer Scientific™ bezogen und mit verschiedenen Zusätzen supplementiert

Zellkultur-Medium	Katalognummer	Zusätze
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Vollmedium	42430-025	10 % FBS, 1 %, GlutaMAX™
Roswell Park Memorial Institute (PRMI) Vollmedium	42401-018	10 % FBS, 1 %, GlutaMAX™
Advanced RPMI Vollmedium	12633012	10 % FBS, 1 %, GlutaMAX™, 1 % Antibiotic-Antimycotic
Opti-MEM	31985062	-

2.5 Supplementierte Basismedien und deren Zusammensetzung

Tabelle 4 Präparierte Medien und Puffer

Zellkultur-Medium	Zusammensetzung
T-Zell-Medium (TZM)	Advanced RPMI1640, 200U IL-2
Assay-Medium	RPMI Vollmedium
Jurkat-Medium	RPMI Vollmedium + 200 µg/ml
Einfriermedium	RPMI oder DMEM + 20 % FBS +20 % DMSO
Durchflusszytometrie (FACS)-Puffer	1x DPBS + 0,1 % BSA

2.6 Medienzusätze

Tabelle 5 Medienzusätze und Zulieferbetrieb

Medienzusatz	Katalognummer	Zulieferbetrieb
GlutaMAX™	35050061	FisherScientific, Schweiz
Antibiotic-Antimycotic (100X) Gibco™	15240062	ThermoFischer Scientific™, Schweiz
Rekombinantes IL-2 (Proleukin®)		Norvatis
Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	11132D	Miltenyi Biotec, Deutschland
anti-Fluorescein isothiocyanate (FITC) MicroBeads	130-048-701	Miltenyi Biotec, Deutschland
Rinderserumalbumin (FBS)	16140, Lot: 1797306A	Life Technologies, USA

2.7 Ziellinien, Bakterien und Enzyme

2.7.1 Primäre Zellen und Ziellinien

Tabelle 6 Verwendete Ziellinien, deren Ursprung und die Medien in denen sie kultiviert wurden

Zelllinie	Zellart	Ursprung	Medium
HEK293T	Human, embryonale Nierenzellen	ATCC CRL3216	DMEM Vollmedium
HeLa	Human, Cervix, epithelial, Zervixkarzinom	ATCC® CCL-2™, ATCC, LGC Standards GmbH, Deutschland	Assay-Medium
Skov-3	Human, Ovar; Aszites, epithelial, Ovarialkarzinom	ATCC® HTB-77™, Standards GmbH, Deutschland	Assay-Medium
SU-DHL-4	Huma, B-Lymphozyten Ziellinie	ATCC® CRL-2957™	Assay-Medium
Jurkat	Human, immortalisiert, T-Lymphozyten	DSMZ ACC 282	Jurkat-Medium
GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P	Human, immortalisiert, T-Lymphozyten	AJ13/059 Promega	Jurkat-Medium
Jurkat-NFAT Reporterzelle	Human, immortalisiert, T-Lymphozyten	Inc. #SL-0032-FP Signosis	Jurkat-Medium
Hek-FolR1	Human, embryonale Nierenzellen stabil transduziert mit FolR1	ATCC CRL3216	DMEM Vollmedium
BT-474	Brustdrüse, duktales Karzinom	ATCC® HTB-20™	Assay-Medium
Mv3	Humane Melanomazelllinie		Assay-Medium

2.8 Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen. DNA-Standard und DNA-Ladepuffer wurden von Fisher Scientific bezogen und gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Rekombinante Plasmide wurden in XL Blue kompetente Bakterienzellen von Agilent bezogen.

2.9 Antikörper und Kits

2.9.1 Antikörper zur Etablierung des anti-P329G-CAR

Alle Antikörper, die in den Assays verwendet wurden sind humane IgG1 Antikörper und wurden vom Roche Innovation Center Zurich oder Roche Innovation Center Munich bezogen. Für die RQR8-Aufreinigung wurde der anti-CD34 FITC konjugierte monoklonale Antikörper (QBEND/10) von ThermoFischer Scientific verwendet. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben des anti-FITC MicroBeads Kit von Miltenyi Biotec über magnetische Säulen aufgereinigt. Kommerzielle Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Alle Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse wurden von BioLegend oder Jackson ImmunoResearch bezogen. Für die Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurde 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) von Thermo Fischer Scientific (1:20000) oder Fixable Viability Dye eFluor™ 450 (1:5000) von eBioscience™ verwendet.

Tabelle 7 Fluorochrom konjugierte Antikörper

Target	Label	Isotyp	Klon	Endkonzentration
CD4	BV421	Maus IgG1, κ	RPA-T4	0.25 µg/ml
CD8	BV711	Maus IgG1, κ	RPA-T8	0.25 µg/ml
PD1	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	EH12.22H7	0.25 µg/ml
CD69	APC-Cy7	Maus IgG1, κ	BC96	0.25 µg/ml
CD25	PE	Maus IgG1, κ	FN50	0.25 µg/ml
CD3	PerCP	Maus IgG1, κ	OKT3	0.25 µg/ml

2.9.2 Kits

Tabelle 8 Kits und Zulieferbetrieb

Kit	Bestellnummer	Zulieferbetrieb:
Cytotoxicity Detection Kit	11644793001	Roche, Schweiz
Plasmid Plus Midi Kit	12945	Qiagen, Schweiz
Pan T Cell Isolation Kit, human	130-096-535	Miltenyi Biotec, Deutschland
Lipofectamine™ LTX Reagent mit PLUS™ Reagent	A15338100	Thermo Fischer Scientific, Schweiz

2.10 Software

Tabelle 9 Software, deren Verwendung und Hersteller

Software:	Verwendung	Hersteller
R	Statistische Berechnungen	Ross Ihaka und Robert Gentleman, Neu Seeland
Microsoft Office	Daten Verarbeitung, Präsentation	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism7	Graphen, Statistische Berechnungen	GraphPad Software, USA
IncuCyte ZOOM 2016A	Graphen für Lebendzellanalyse	Essen BioScience, USA
FlowJo_V10	Durchflusszytometrische Analyse	Tree Star, USA
Endnote	Literatur und Quellenmanagement	Thompson Reuter, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur Techniken

3.1.1 Kultivierung, Auftauen, Zählen und Einfrieren von Zellen

Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Wasserdampfsättigung kultiviert. Alle sterilen Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Adhärente- und Suspensionszelllinien wurden vor Erreichen von 90 % Konfluenz, zwei- bis drei-Mal wöchentlich passagiert und in entsprechendem Medium, welches aus Tabelle 4 entnommen werden kann, kultiviert. Primäre Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in TZM kultiviert und alle 24-48 Stunden auf eine Zellzahl von 10⁶ viable Zellen pro cm² eingestellt. Für die Kryokonservierung wurden 10⁷ Zellen in Einfriermedium resuspendiert und mittels Einfrierbehälters, welcher eine Abkühlrate von 1 °C pro Minuten erlaubt bei -80 °C gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war, nach Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium wurde der komplette Inhalt des Kryoröhrchens in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei 300 g für fünf Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in entsprechendem Medium ausgesät.

3.1.2 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

PBMC wurden aus Buffy-Coats von gesunden Spendern des Spenderpools des Blutspendezentrum Zürich isoliert. Die Blutentnahme erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Nachdem verdünnen des Buffy-Coats 2:1 mit PBS wurden die PBMC über eine Histopaque-1077 Dichtegradientenzentrifugation für 30 Minuten bei 450 g ohne Bremsen und Raumtemperatur angereichert. Anschließend wurden die PBMC aus der Interphase abgenommen und drei Mal mit PBS gewaschen, 350 g und zehn Minuten.

3.1.3 Lentivirale Viruspartikel Produktion und Transduktion humaner Zellen

Für Lipofectamin LTX™-basierte lentivirale Viruspartikelproduktion wurden 80 % konfluente Hek293T-Zellen nach Angaben des Herstellers mit CAR-kodierendem Transfervektor, sowie Verpackungsplasmiden pCMV-VSV-G:pRSV-REV:pCgpV im Verhältnis 3:1:1:1 transfiziert. Für primäre Zellen wurde der CAR-kodierende Transfervektor sowie pCAG-VSVG und psPAX2 Verpackungsplasmide im Verhältnis 2:2:1 verwendet (Giry-Laterrière et al. 2011, Myburgh et al. 2014). Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Nach fünf Minuten zentrifugieren bei 350 g und Raumtemperatur wurde der Viruspartikel-enthaltende Überstand durch einen 0,45 µm Polyethersulfon Filter filtriert und direkt verwendet oder nach Herstellerangaben mit Lenti-X-Concentrator aufkonzentriert. Die zu transduzierenden Zelllinien wurden zwischen 0.5-2 x 10⁶ Zellen/cm² ausgesät mit Viruspartikeln versetzt und bei 900g für zwei Stunden und 31°C zentrifugiert. Für primäre T-Zellen wurden 10⁶ Zellen/cm² ausgesät, 16 Stunden mit anti-CD3-anti-CD28 Dynabeads aktiviert und mit 1.5 ml unkonzentriertem Virusüberstand bei 1000 g für 90 Minuten und 32 °C zentrifugiert. Primäre T-Zellen, die einem anti-P329G-scFv Konstrukt transduziert wurden, wurden nach Erreichen einer Zellzahl > 50 Millionen Zellen wurden diese über eine RQR8 (Philip et al. 2014) Aufreinigung angereichert. Hierfür wurden die Zellen gezählt und nach Hersteller Protokoll mit der entsprechenden Menge an FITC konjugiertem anti-CD34 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Qualität der Aufreinigung und die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.1 Klonierung von chimären Antigenrezeptoren

Die individuellen leichten und schweren Ketten des anti-P329G-CAR wurden mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert und über Restriktionsschnittstellen oder Hifi-assembliert und in ein lentivirales Transferplasmid pLVX-PURO (PT4002–5; Takara Bio/Clontech) integriert. Um CAR mit scFv-AED herzustellen, wurden die variable schwere Kette und die variable leichte Kette über einen Glycin₄Serin₄ (G₄S₄)-Linker verbunden und mittels G₄S-Linker an den CAR-Stamm fusioniert (Abbildung 4). Der Stamm des CAR besteht aus einer CD28TM-CD28IZD (Uniprot Eintrag P10747 AA153–220)-CD3ζ (Uniprot Eintrag P20963 AA 52–164). Für das Fab-CAR wurde der anti-P329G Binder an die Stammdomäne fusioniert. Siehe auch (Darowski et al. 2019). Für das CD16-CAR wurde die Antigenerkennungsdomäne des CD16-CAR von Promega, USA PartIDCS204303 verwendet. Der CAR-Stamm wurde äquivalent zum P329G-CAR mit einer CD28TM-CD28IZD (Uniprot Eintrag P10747 AA153–220)-CD3ζ (Uniprot Eintrag P20963 AA 52–164) Kombination verwendet. Primäre CAR-T-Zellen wurden als anti-P329G scFv kloniert. Mit intrazellulärer Domäne für CD8a (Uniprot Eintrag P01732[183- 203)-CD137 (Uniprot Eintrag Q07011AA 214-255)-CD3ζ (Uniprot Eintrag P20963 AA 52–164) (Tabelle 10).

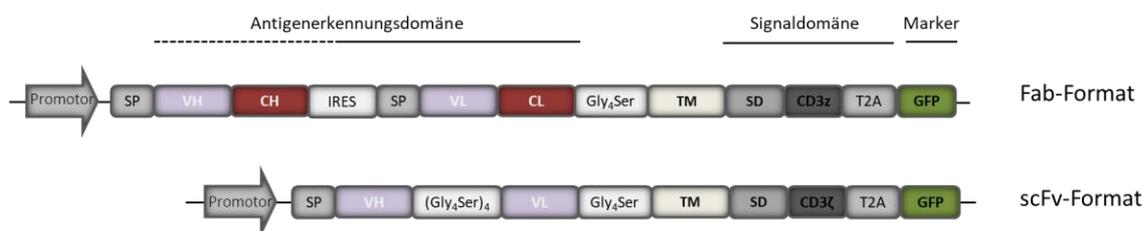


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fab und scFv-CAR-Formate, modifiziert nach Darowski et al. 2019. Das anti-P329G-Fab-Format besteht aus einer extrazellulären Antigenerkennungsdomäne die aus einer schweren Kette (VH und CH) und einer leichten Kette (VL und CL) besteht. Beide sind über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) verbunden. Das anti-P329G-scFv-Format besteht aus einer variablen schweren (VH) und einer variablen leichten (VL) Kette die über einen Glycin-Serin-Linker ((G₄S)₄) verbunden sind. Die Antigenerkennungsdomäne der CAR ist mit einem Glycin-Serin-Linker (G₄S) an die Transmembrandomäne (TM) fusioniert, welche wiederum an die intrazelluläre Signaldomäne (SD) geknüpft ist. Zusätzlich ist c-terminal ein eGFP über eine T2A-Stelle fusioniert. Welches als Transfektions- und Transduktionskontrolle dient.

Tabelle 10: Beschreibung der Transferplasmid Elemente für die CAR-Expression und Detektion

Promotor	extrazelluläre Domäne	transmembran Domäne	ko-stimulatorische Domäne	Marker
CMV	anti-P329G-Fab	CD28	CD28/CD3ζ	GFP
CMV	anti-P329G-scFv	CD28	CD28/CD3ζ	GFP
EF1α	anti-P329G-scFv	CD8a	CD137/CD3ζ	GFP/RQR8 (Philip et al. 2014)
CMV	CD16	CD28	CD28/CD3ζ	GFP

3.3 Funktionale Assays

3.3.1 CAR-Jurkat-Assay

Der anti-P329G-CAR-J-Assay sowie der CD16-CAR-J-Assay wurden durchgeführt, um die NFAT-Aktivierung via CAR nachzuweisen. Der Assay wurde in 384 Well Platten mit weißen Wänden und transparentem Boden durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden CAR-transduzierten Reporterzellen mit Targetzellen in Anwesenheit von unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen für 6-20 Stunden inkubiert. Das Effektor zu Target-Zell (E:T)-Verhältnis, sowie die Antikörperkonzentrationen können der jeweiligen Abbildungsbeschreibung entnommen werden. Anschließend wurden 15 % des finalen Gesamtvolumens an ONE-Glo™ Luziferase Substrat hinzugegeben und die Platte für eine Minute bei 350 g zentrifugiert. Das Lumineszenzsignal wurde mittels Tecan Reader in relativen Licht Einheiten (RLI) pro Sekunde pro Well gemessen.

3.3.2 Jurkat-NFAT-Assay

Der Jurkat-NFAT-Reporter-Assay wurde durchgeführt um die CD3 Aktivierung durch TCB zu messen. Hierfür wurden entweder GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P (Promega) oder NFAT Luziferase Reporter Jurkat T-Zellen (Signosis, Inc. Katalog v#SL-0032-FP) mit Targetzellen und verschiedenen Konzentrationen an TCB inkubiert. Das E:T-Verhältnis, sowie die Antikörperkonzentrationen können der jeweiligen Abbildungsbeschreibung entnommen werden. Anschließend wurde der Assay wie unter 3.3.1 CAR-J-Assay, beschrieben durchgeführt und ausgelesen.

3.3.3 Tumorzelllyse-Assay

Die Tumorzelllyse beziehungsweise Targetzelllyse wurde mittels dem kommerziell erhältlichen „Cytotoxicity Detektion Kit“ (Roche) nach dem Herstellerprotokoll ermittelt. Hierfür wurden Targetzellen mit Effektorzellen (PBMC oder CAR-T-Zellen) ko-kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen an IgG1 oder TCB versetzt. Die verschiedenen Konzentrationen und das E:T-Verhältnis kann der jeweiligen Abbildungsbeschreibung entnommen werden. Die Tumorzelllyse wurde durch die freigewordene Menge an Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand bestimmt. Als Kontrolle wurde die LDH-Konzentration von einer Ko-Kultur an Tumor und Effektorzellen ohne Molekül gemessen (spontane Tumorzelllyse). Die maximale Tumorzelllyse wurde bestimmt, indem die Wells, welche nur Tumorzellen enthalten eine Stunde vor der LDH-Messung mit 4 % Triton angereichert wurden. Das jeweilige E:T-Verhältnis, sowie die Antikörperkonzentrationen können der jeweiligen Abbildungen entnommen werden. Für die LDH-Messung wurde der Überstand der jeweiligen Wells in eine frische transparente Zellkulturplatte überführt und nach Zugabe des Detektionssubstrats wurde die LDH-Aktivität über zehn Minuten mittels Tecan Reader gemessen. Der Prozentsatz der spezifischen Zelllyse wurde nach Formel [1] berechnet.

$$\frac{(Tumorzelllyse - spontane Tumorzelllyse)}{(maximale Tumorzelllyse - spontane Tumorzelllyse)} \cdot 100 \quad [1]$$

Die Aktivierung der CAR-T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie wie unter 3.4 beschrieben, bestimmt. Die Daten wurden mit der GraphPad Prism 7 Software ausgewertet, wobei eine sigmoidaler Dosis-Abhängigkeits-Kurve generiert wurde um die EC₅₀-Werte zu ermitteln.

3.4 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen wurde zur Bestimmung der Transduktionseffizienz und zur Charakterisierung von Target- und Effektorzellen herangezogen.

Für die Zellanalyse wurden die jeweiligen Zellen geerntet und drei Mal mit FACS-Puffer oder PBS bei RT, 350 g und fünf Minuten gewaschen. Zur Färbung der gewünschten Antigene wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und anschließend drei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Die verwendeten Antikörper Konzentrationen können aus dem Material Teil Tabelle 7 Fluorochrom konjugierte Antikörper, entnommen werden. Für die Zellanalyse mit Antikörpern, welche die P329G Mutation im Fc-Teil tragen wurden 100 nM eingesetzt und 50.000 bis 100.000 Targetzellen für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde drei Mal gewaschen und der sekundäre anti-humane IgG F (ab^λ)₂ Alexa 647 fluorochrom-konjugierte Antikörper mit 2.5 µg/ml eingesetzt. Nach 30 Minuten bei 4 °C wurden die Proben drei Mal gewaschen und am Durchflusszytometer gemessen (Darowski et al. 2019).

3.5 Zytokin-Bestimmung

Für die Zytokin-Bestimmung wurde das BD™ CBA FLEX SETS verwendet und jeweils 10 % Volumen des Überstandes einer 96 Well Platte, entspricht 20 µl, entnommen und bis zu Analyse bei -80 °C eingefroren. Der Assay-Standard wurde in vier ml Assay-Diluent gelöst und eine Standardreihe in 1:2 Verdünnungsschritten in Assay Diluent angelegt. Die Capture-Beads wurden nach Angabe des Herstellers präpariert. Je zehn µl der zu analysierenden Probe und je zehn µl der Standards wurden in eine transparente 384 Well Platte pipettiert und mit zehn µl Capture-Beads versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden zehn µl der PE Detektions-Beads hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach drei Waschschritten für drei Minuten bei 350 g mit FACS Puffer, wurden zehn µl Probe am iQUE analysiert. Die Daten wurden mittels FlowJo V10 und GraphPad Prism 7 Software ausgewertet.

3.6 Statistische Analyse

Die experimentell ermittelten Daten wurden genutzt um mittels GraphPad Prism 7 oder R Studio eine 4-parameter dosis-abhängiges-Kurven zu berechnen. Das R „drc“ Packet <https://cran.r-project.org/web/packages/drc/index.html> wurde dafür verwendet. Für CAR-J-Assays wurden statistische Analysen mittels GraphPad Prism Version 7 oder R Studio durchgeführt. Unterschiede $P \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. und mit * gekennzeichnet.

Für die statistische Analyse von Targetzellyse-Assay und Zytokin-Bestimmungen wurde GraphPad Prism 7 verwendet. Für die Ermittlung der statistischen Signifikanz ungepaarte Stichproben, wurde ein ungepaarter Student, two-tailed t-Test mit Welsch`s Korrektur für verwendet. Für das Vergleichen von einer Probe zu multiplen Werten wurde eine one-way ANOVA Analyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Für die Angaben des P Value wurde der The New England Journal of Medicine Stil verwendet, wie er in GraphPadPrism 7 angegeben ist: nicht signifikant (ns) = $P = 0,12$; * = $P \leq 0,033$; ** = $P \leq 0,002$; *** = $P \leq 0,001$. Wenn nicht anders angegeben, wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der anti-P329G-CAR-T Reporterzelllinien

4.1.1 Konstruktion und Expression der Fab- oder scFv-CAR-in Jurkat-Reporterzellen

Für die Entwicklung der anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinien wurden zunächst zwei CAR der zweiten Generation konstruiert. Diese Fusionsproteine wurden so entworfen, dass sie entweder eine Fab-basierte oder eine scFv-basierte extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne besitzen. Diese Antigenerkennungsdomäne ist über eine G₄S-Verbindungssequenz an eine CD28 Transmembrandomäne fusioniert, welche wiederum an die Sequenz für eine CD28 ko-stimulierende Domäne kloniert wurde. Zusammen mit der CD3 ζ -Sequenz bildet dies den intrazellulären Teil des CAR. Außerdem wurde GFP, welches als Marker dient, über eine T2A-Sequenz an das 3' Ende des CAR-Konstrukts fusioniert (Methoden Teil Abbildung 4).

Beide CAR-Konstrukte wurden mittels lentiviraler Transduktion in Jurkat-NFAT-Luziferase-Reporterzelllinien integriert. Der Transduktionserfolg wurde durchflusszytometrisch überprüft. Hierfür wurde auf CAR- und GFP-Expression analysiert. Die CAR-Expression wurde indirekt über einen Fluorochrom-markierten Antikörper mit Spezifität gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers detektiert. Der primäre Antikörper wurde titriert, dafür wurde entweder IgG1 mit wildtyp-Fc, P329G LALA mutiertem Fc oder glycomodifiziertem Fc (GE) verwendet (Abbildung 5). Für die Analyse wurde nach Ausschluss von Duplikaten und toten Zellen auf GFP und PE positive Zellen selektiert. Sowohl für die anti-P329G-CAR-J-Zellen im Fab-Format als auch im scFv-Format lässt sich eine signifikante Expression des CAR detektieren.

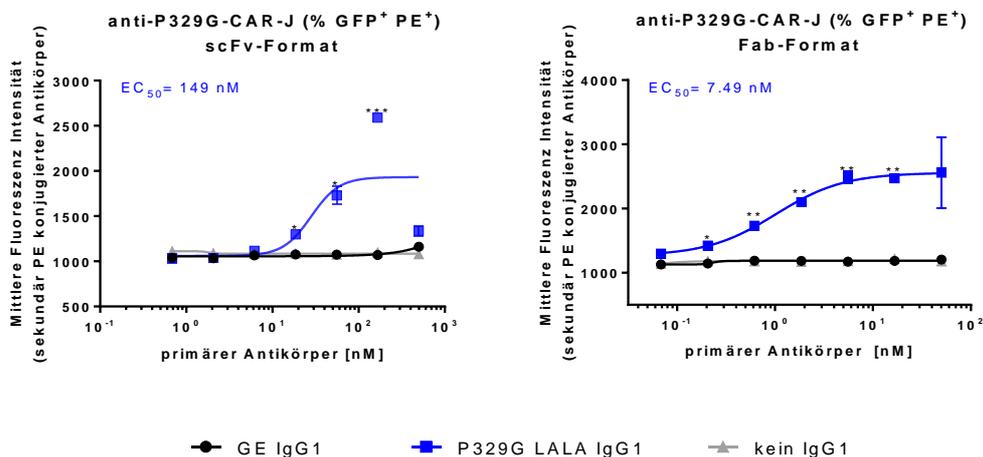


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der anti-P329G-CAR-Expression in Jurkat-Zellen. A: für die Detektion des anti-P329G-CAR in transduzierten Jurkat-NFAT-Zellen, wurde eine indirekte Fluoreszenz-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen entweder mit P329G LALA IgG1, glycomodifiziertem IgG1 (GE) der keine P329G Mutation trägt oder keinem Antikörper, inkubiert. Die Bindung dieser Antikörper wurde mittels anti-humanem-Fc-spezifischem PE konjugiertem Sekundärantikörper via Durchflusszytometrie detektiert. Gezeigt ist eine repräsentative Transduktion eines Zellpools von anti-P329G-CAR-J-Fab und anti-P329G-CAR-J-scFv-Reporterzellen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit technischen Duplikaten. Für den statistischen Vergleich wurde eine one-way ANOVA Analyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. P-Werte wurden mit nicht signifikant (ns) = $P = 0,12$; * = $P \leq 0,033$; ** = $P \leq 0,002$; *** = $P \leq 0,001$ angegeben.

4.1.2 Spezifische Erkennung der P329G Mutation durch anti-P329G-CAR-J-Zellen am Beispiel von CD20⁺ Tumorzelllinien in Kombination mit einem anti-CD20 P329G LALA IgG1 CAR-Adapter

Damit sich die anti-P329G-CAR-J-Zellen als Reporterzelllinie eignen, ist die spezifische Erkennung der P329G Mutation Voraussetzung. Die Reporterzellen sollen nur in Anwesenheit von immobilisierten, Tumorantigen-gebundenen P329G mutierten Antikörpern aktivierbar sein. Nach erfolgreicher Tumorantigen-Erkennung durch den P329G-CAR-Adapter IgG1, kann die Aktivität der Reporterzellen quantifiziert werden. Zunächst wurde die Luziferaseaktivität der anti-P329G-CAR-J-Zellen in einer Ko-Kultur mit CD20-exprimierenden Tumorzellen gemessen; nachdem verschiedene Fc-Varianten von Obinutuzumab (Mossner et al. 2010) titriert wurden (Abbildung 6). Obinutuzumab ist ein glycomodifizierter anti-CD20 Antikörper. Als Fc-Varianten wurden P329G IgG1, P329G LALA IgG1, D265A P329G IgG1, LALA IgG1 oder ein wildtyp-Fc IgG1 titriert. In allen Ansätzen, in denen ein IgG1 mit P329G Mutation verwendet wurde, konnte ein konzentrationsabhängiges Luziferasesignal detektiert werden, Antikörper ohne P329G Mutation zeigten dagegen keine Aktivierung der anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinien.

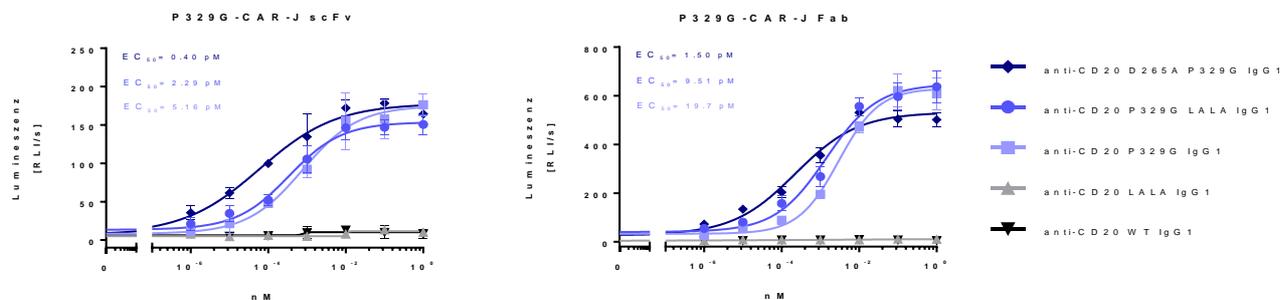


Abbildung 6: P329G-CAR-J-Reporterzellen sind ausschließlich in der Gegenwart von immobilisiertem, tumorspezifischem Antikörper mit P329G Mutation aktiv. Dargestellt ist die Lumineszenzmessung für eine Ko-Kultur von SU-DHL-4 (CD20⁺) Targetzellen mit P329G-CAR-J-Reporterzellen in einem 1:5 Verhältnis, zu der eine Verdünnungsreihe von verschiedenen anti-CD20 IgG1 Antikörpern titriert wurde. Diese Antikörper enthalten, entweder einen wildtyp-Fc (CD20-WT IgG1), einen LALA-mutierten Fc (CD20-LALA IgG1), einen D265A und P329G-mutierten Fc (CD20-D265A P329G IgG1) oder einen P329G LALA-mutierten Fc (CD20-P329G LALA IgG1). Die Luziferaseaktivität wurde nach sechs Stunden in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde/Well gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels R Studio durchgeführt. Unterschiede $P \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. (Abbildung ist bereits veröffentlicht (Darowski et al. 2019)).

4.1.3 Anwendbarkeit der anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinien unter Verwendung diverser Tumorzelllinien

Um zu überprüfen, ob sich die generierten anti-P329G scFv- und Fab-CAR-Reporterzelllinien als Screening-Werkzeug für IgG1 Antikörper eignen, wurde zunächst die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf weitere Zelllinien und Antigene überprüft. In einem ersten Schritt wurden Tumorzelllinien selektierte, die entweder ein, zwei oder kein Tumorantigen von Interesse exprimieren. Hierfür wurde die Expression der gewünschten Antigene mittels Durchflusszytometrie auf ausgewählten Tumorzelllinien überprüft. Antigen-spezifische P329G LALA IgG1 wurden titriert und mit den zu untersuchenden Tumorzellen inkubiert. Zur Detektion der gebundenen primären Antikörper wurde ein sekundärer anti-humaner IgG F(ab')₂ Fragment-spezifischer, Alexa 647 markiertes F(ab')₂ Fragment verwendet.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt das Vorkommen von HER2 auf BT-474 und HeLa-Tumorzelllinien. CD20 konnte auf SU-DHL-4 Zellen nachgewiesen werden, FOLR1 konnte auf HeLa-FOLR1 und Skov3 Zellen nachgewiesen werden. CEA wurde, wie zu erwarten, auf keiner der getesteten Zelllinien detektiert.

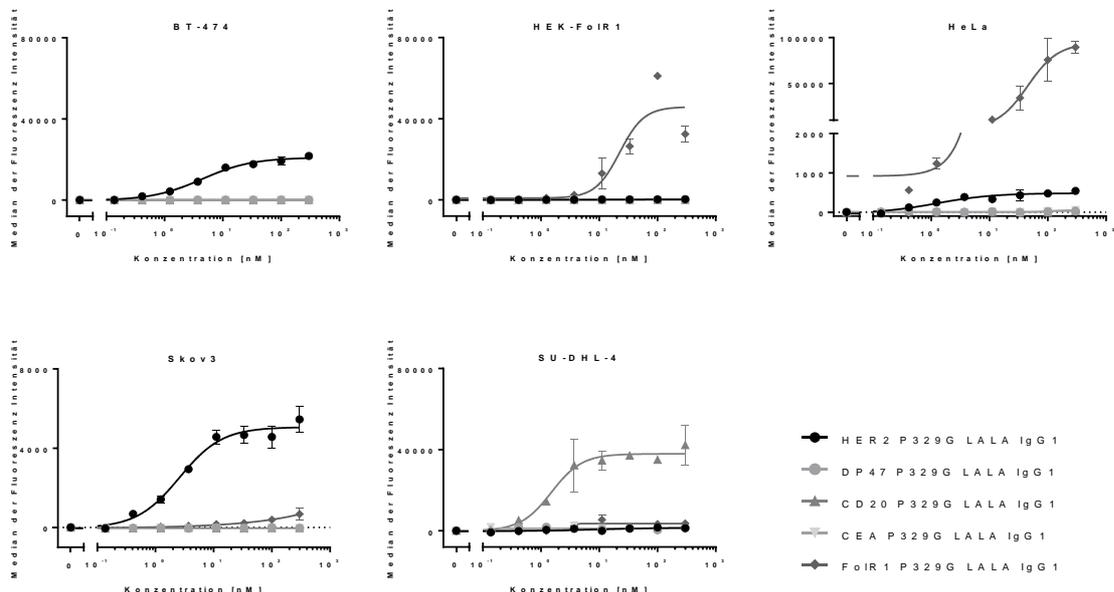


Abbildung 7: Expressionsnachweis von HER2, CD20, CEA und FOLR1 auf BT-474, Hek-FoIR1, HeLa, Skov3 und SU-DHL-4 Tumorzelllinien. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von den Oberflächenantigenen HER2, CD20, CEA und FOLR1. Nach Titration des primären antigenspezifischen Antikörpers mit P329G Mutation wurde ein sekundärer Alexa 647 markierter Detektionsantikörper 1:200 eingesetzt. Als Kontrolle diente ein DP47 P329G LALA IgG1, der keine Antigen-spezifität aufweist. Dargestellt ist jeweils der Median der Fluoreszenzintensität technischer Duplikate \pm Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt (Abbildung ist bereits veröffentlicht (Darowski et al. 2019)).

Um die durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Tumorantigene zu bestätigen und zu zeigen, dass der anti-P329G-CAR-J-Assay spezifisch Tumorantigene nur in Anwesenheit des Tumorantigen-spezifischen Adapter-IgG1 erkennt, wurde ein Matrix-Assay entwickelt. Der Matrix-Assay wurde so aufgebaut, dass in einer Ko-Kultur von anti-P329G-CAR-J-Zellen und Tumorzelllinie jeweils ein antigenspezifischer P329G IgG1 titriert wurde; so dass am Ende jede Tumorzelllinie mit jedem Antikörper individuell getestet wurde (Abbildung 7). In den Ansätzen, in denen die verwendeten CAR-Adapter spezifisch für das Tumorantigen waren, konnte ein konzentrationsabhängiges Lumineszenzsignal gemessen werden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Lumineszenzsignal von scFv-CAR-J-Zellen oder Fab-CAR-J-Zellen zu erkennen.

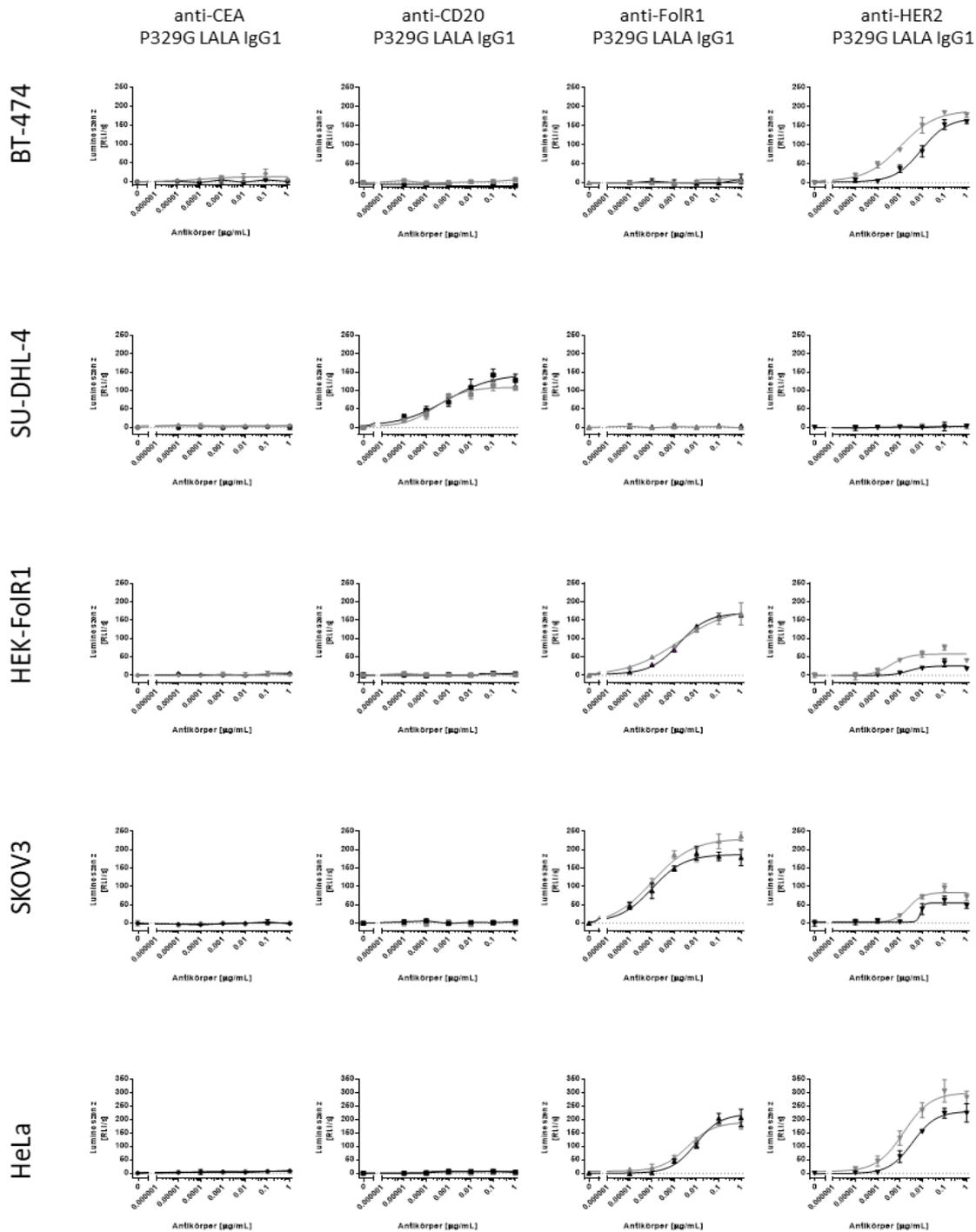


Abbildung 8: Matrix-Assay zur Evaluation der Robustheit von anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen. SU-DHL-4 (CD20⁺), BT-474 (Her2⁺), HEK-FolR1 (FolR1⁺), Skov3 (FolR1⁺) oder HeLa (FolR1⁺ und HER2⁺) Tumorzellen wurden entweder mit P329G-CAR-J-Reporterzellen im scFv-Format (schwarz) oder Fab-Format (grau) im Verhältnis 1:5 ko-kultiviert. Als CAR-Adapter wurden anti-CEA P329G LALA IgG1, anti-CD20 P329G LALA IgG1, anti-FolR1 P329G LALA IgG1 oder anti-HER2 P329G LALA IgG1 in die Ko-Kultur titriert. Nach sechs Stunden Inkubationszeit und Zugabe des Detektionssubstrats wurde die Luziferase Aktivität in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde pro Well gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert technischer Triplikate \pm Standardabweichung eines repräsentativen Ergebnisses von fünf unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels R Studio durchgeführt. Unterschiede $P \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. Die schwarze Kurve zeigt die Aktivität von anti-P329G-CAR-J-Fab-Reporterzellen und die graue Kurve zeigt die Aktivität von anti-P329G-CAR-J-scFv-Reporterzellen. (Abbildung ist bereits veröffentlicht (Darowski et al. 2019)).

4.1.4 Der anti-P329G-CAR-J-Assay ermöglicht die Einschätzung der Bindung und der biologischen Aktivität eines Binders im 2+1 TCB-Format

Ein weiterer zellbasierter Assay, der es erlaubt die biologische Funktionalität von Antikörpern zu charakterisieren, ist der Jurkat-NFAT-Assay. Der Jurkat-NFAT-Assay basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Kreuzvernetzung von Target- und Effektor-Zelle durch ein titrierbares Adaptermolekül. Im Fall des Jurkat-NFAT-Assay ist das Adaptermolekül allerdings kein IgG, sondern ein T-Zell-bispezifischer Antikörper (TCB). Der TCB, im 2+1 Format kann mit zwei Fab-Armen an das Tumorantigen binden und mit einem, zusätzlichen anti-CD3 Fab-Arm an den TCR. Im Jurkat-NFAT-Assay führt die simultane Bindung des TCB an das Tumorantigen und den TCR der Jurkat Effektor-Zellen zu deren Aktivierung. Diese Aktivierung kann nach Zugabe eines Substrats als Luziferasesignal quantifiziert werden. Der Jurkat-NFAT-Assay erlaubt zwar das Screening von Bindern im TCB Format, ein Nachteil allerdings ist die Notwendigkeit zur vorrausgehenden Konvertierung der Binder aus dem IgG-Format in das TCB-Format. Diese Konvertierung ist zeitintensiv und ressourcenaufwendig. Um den Prozess der therapeutischen Antikörperentwicklung zu optimieren, ist deshalb die Präselektion von favorisierten Bindern vorteilhaft. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass im P329G-CAR-J-Assay nur dann ein Luziferasesignal detektiert werden kann, wenn sowohl ein tumorspezifischer P329G LALA Adapter-IgG1 und auch das dazu passende Tumorantigen vorhanden sind, wurde die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Jurkat-NFAT-Assay und des PBMC-Zytotoxizitäts-Assay untersucht. Im PBMC-Zytotoxizitäts-Assay werden ebenfalls Binder im TCB als Adaptermoleküle verwendet und auf ihre Fähigkeit hin überprüft Tumorzelllyse herbeizuführen. Dadurch können TCB nach gewünschter Potenz selektiert werden.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse des anti-P329G-CAR-J-Assay auf die Ergebnisse des Jurkat-NFAT-Assay und des PBMC-Zytotoxizitäts-Assay zu vergleichen, wurden drei anti-FOLR1 Antikörper getestet und entsprechend ihrer Funktionalität und biochemischen Eigenschaften eingestuft. Bei den anti-FOLR1 Antikörpern handelt es sich um den parentalen Binder 16D5 und die 16D5 Varianten FolR1-W96Y sowie FolR1-G49S/K53A. Die 16D5 Varianten binden zwar an das gleiche Epitop, allerdings mit niedrigeren Affinitäten (Darowski et al. 2019).

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse des P329G-CAR-J-Assays, des Jurkat-NFAT-Assays und des PBMC-Zytotoxizitäts-Assays zeigten, dass der P329G-CAR-J-Assay den Jurkat-NFAT-Assay substituieren kann (Abbildung 9). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der anti-P329G-CAR-J-Assays eine Priorisierung von Bindern im IgG-Format erlaubt und auch deren Potenz im PBMC-Zytotoxizitäts-Assay widerspiegelt.

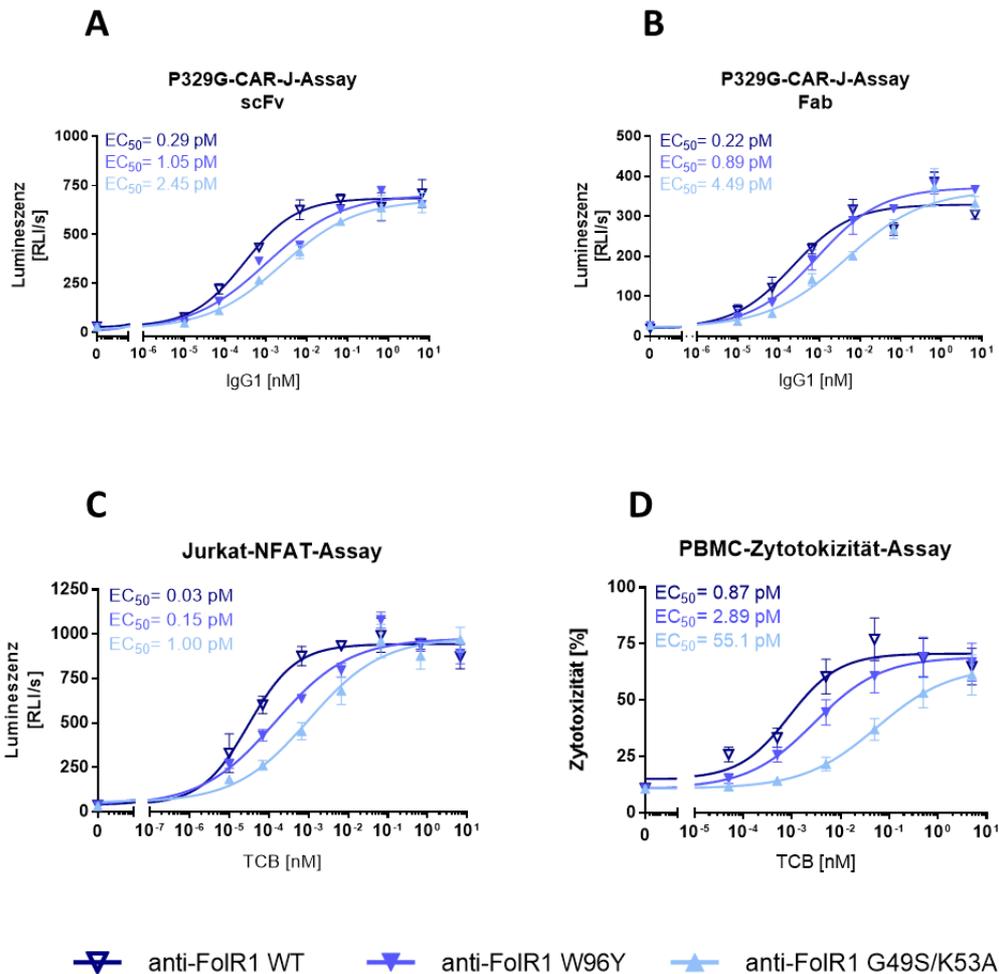


Abbildung 9: Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem P329G-CAR-J-Assay auf die Potenz der TCB im finalen PBMC-Zytotoxizitäts-Assay. Der anti-P329G-CAR-J-Assay ermöglicht es eine Reihenfolge von verschiedenen anti-P329G LALA IgG1 Antikörpern zu ermitteln, welche sich auf die TCB-Potenz übertragen lässt, wenn die identischen Binder in das TCB-Format konvertiert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Versuchsergebnis des anti-P329G-CAR-J-Reporterassays, der sowohl mit P329G-CAR-J-scFv [A] und Fab [B] exprimierenden Effektorzellen durchgeführt wurde. Diese wurden mit HeLa (FolR1⁺) Targetzellen im Verhältnis 10:1 und einer Verdünnungsreihe von anti-FolR1 IgG1 mit P329G LALA Mutation, dem parentalen (WT) P329G LALA IgG1, W96Y P329GLALA IgG1 oder G49S/K53A P329G LALA IgG1 ko-kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde pro Well gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. **Für den Jurkat-NFAT-Reporterassay [C]** wurden Jurkat-NFAT-Luc Zellen mit HeLa (FolR1⁺) Zellen im Verhältnis 10:1 ko-kultiviert und mit einer Verdünnungsreihe von entweder anti-FolR1 parentaler (WT) TCB, der Variante W96Y TCB oder der G49S/K53A TCB inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde pro Well gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. **Für den PBMC-Zytotoxizitäts-Assay [D]** wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy-Coats isoliert und im Verhältnis 10:1 mit HeLa (FolR1⁺) Targetzellen inkubiert. Eine Verdünnungsreihe von anti-FolR1 wildtyp (WT) TCB, der Variante W96Y TCB oder der G49S/K53A TCB Variante wurden hinzutitriert. Der zytotoxische Effekt wurde durch ein Lactatdehydrogenase (LDH) Messung im Überstand nach 24 Stunden gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Statistische Analysen wurden mittels R Studio durchgeführt um inter-Assay Variationen zu detektieren. Unterschiede $P \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angegeben. (Abbildung ist bereits veröffentlicht (Darowski et al. 2019)).

4.1.5 Vergleich der Aktivierbarkeit von anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen und FcγRIIIa-CAR-J-Reporterzellen

FcγRIIIa, auch als CD16a-Rezeptor bezeichnet, wird normalerweise auf der Oberfläche von NK-Zellen, Monozyten und anderen Immunzellen, nicht jedoch von T-Zellen exprimiert. In Kombination mit therapeutischen Antikörpern sind CD16-CAR-T-Zellen in der Lage, Targetzellen erfolgreich zu erkennen und deren Lyse zu induzieren (Rataj et al. 2019). Da es sich bei den CD16-CAR-T-Zellen ebenfalls um ein modulares System handelt, wurde dies in der vorliegenden Arbeit als Vergleich herangezogen, um die Robustheit des anti-P329G-CAR-J-Reporterassays zu testen. In eine Ko-Kultur von CD20 exprimierenden SU-DHL-4 Zellen und CD16-CAR-J- oder anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen wurden der anti-CD20 glycomodifizierte (GE) Antikörper Obinutuzumab (Mossner et al. 2010), und zwei Fc-Varianten dieses Binders titriert. Bei den verwendeten Fc-Varianten, handelt es um eine wildtyp-Fc Variante und einer Variante mit der P329G LALA Mutation im Fc-Teil. Für CD16-CAR-J-Reporterzelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung beobachtet werden, wenn der anti-CD20 Antikörper mit wildtyp-Fc oder die glycomodifizierte Variante verwendet wurde (Abbildung 10 A). Die Titration der P329G Fc Variante in die Ko-Kultur dagegen zeigte keine Aktivierung der CD16-CAR-T-Zellen (Abbildung 10 B und C). Umgekehrt konnte eine Aktivierung für die anti-P329G-CAR-J-Zellen im scFv- und Fab-Format beobachtet werden, wenn der anti-CD20 Antikörper mit P329G LALA Mutation titriert wurde. Keine Aktivierung hingegen wurde beobachtet, wenn die wildtyp-Fc-Variante oder die glycomodifizierte Variante verwendet wurde.

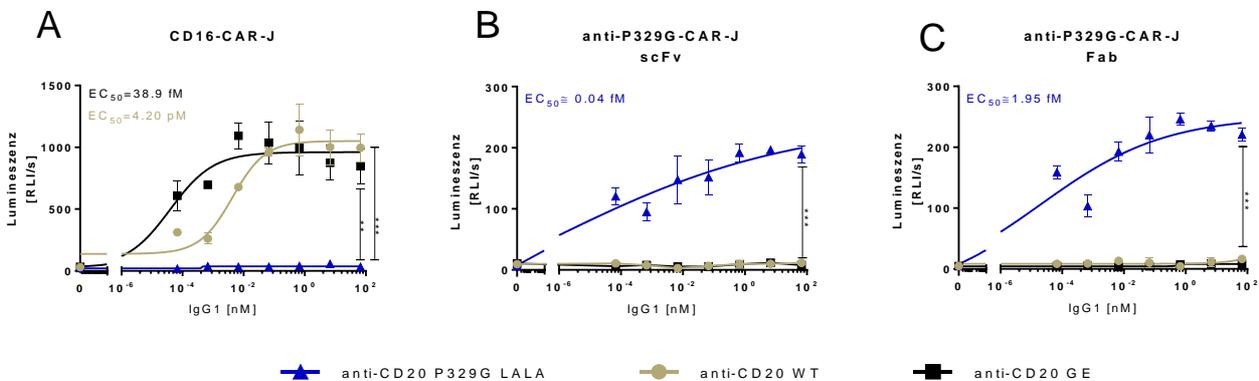


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Aktivität von P329G-CAR-J-Reporterzellen und CD16-CAR-J-Reporterzellen in Anwesenheit von Fc-modifizierten IgG1 Antikörpern. Gezeigt ist die Antikörper-abhängige Aktivierung von CD16-CAR-Reporterzellen [A] oder anti-P329G-Reporterzellen im scFv-CAR-Format [B] oder Fab-CAR-Format [C], in einer Ko-Kultur mit SU-DHL-4 (CD20⁺) und anti-CD20 Antikörpervarianten. Als Antikörpervarianten wurden Obinutuzumab ein anti-CD20 Antikörper mit glycomodifiziertem-Fc (anti-CD20-GE), mit wildtyp-Fc (anti-CD20 WT) oder eine Variante mit P329G LALA Mutation (anti-CD20 P329G LALA) in die Ko-Kultur titriert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde pro Well gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Für den Vergleich wurde eine one-way ANOVA Analyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. P-Werte wurden mit nicht signifikant (ns) = P = 0,12; * = P ≤ 0,033; ** = P ≤ 0,002; *** = P ≤ 0,001 angegeben.

4.1.6 Einfluss von Serum IgG auf die Aktivierung des anti-P329G-CAR

Um zu überprüfen, ob unspezifische IgG Antikörper einen Einfluss auf die anti-P329G-CAR-Aktivierung haben, wurden CD16-CAR und P329G-CAR-J-Reporterzellen mit CD20 exprimierenden SU-DHL-4 Targetzellen ko-kultiviert und mit konstanten Konzentrationen von $\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ (0.67 nM) des anti-CD20 Antikörpers Obinutuzumab und verschiedenen Fc-Varianten inkubiert. Neben Obinutuzumab (GE) wurde die wildtyp-Fc-Variante und die P329G LALA Fc-Variante des Binders eingesetzt. Um die Inhibierung des CAR-Signals zu überprüfen, wurden zusätzlich aufsteigende Konzentrationen an humanem Serum IgG in den Versuchsansatz titriert. Es konnte gezeigt werden, dass CD16-CAR-Reporterzellen, die mit der wildtyp-Fc-Variante stimuliert wurden, bereits bei $2.5 \mu\text{g/ml}$ an Serum IgG einen deutlichen Abfall der Aktivierung aufweisen. Ein langsames Abfallen des Signals konnte auch bei der Verwendung der GE-Variante beobachtet werden, allerdings wurde hier die CAR-Aktivierung erst ab einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ an Serum IgG deutlich inhibiert und bei supra-physiologischen Bedingungen von $20 \mu\text{g/ml}$ an Serum IgG konnte nur noch eine minimale CAR-Aktivierung beobachtet werden. Die Stimulierung des CD16-CAR mit der P329G Fc-Variante zeigte bei zunehmender Serum IgG Konzentration einen Anstieg des CAR-Signals, was auf eine unspezifische Aktivierung hindeutet. Die Aktivierung des anti-P329G-CAR wurde durch steigende Serum IgG-Konzentrationen dagegen nicht beeinflusst und es konnte eine konstante Aktivierung für das anti-P329G-CAR im scFv- und im Fab-Format gemessen werden.

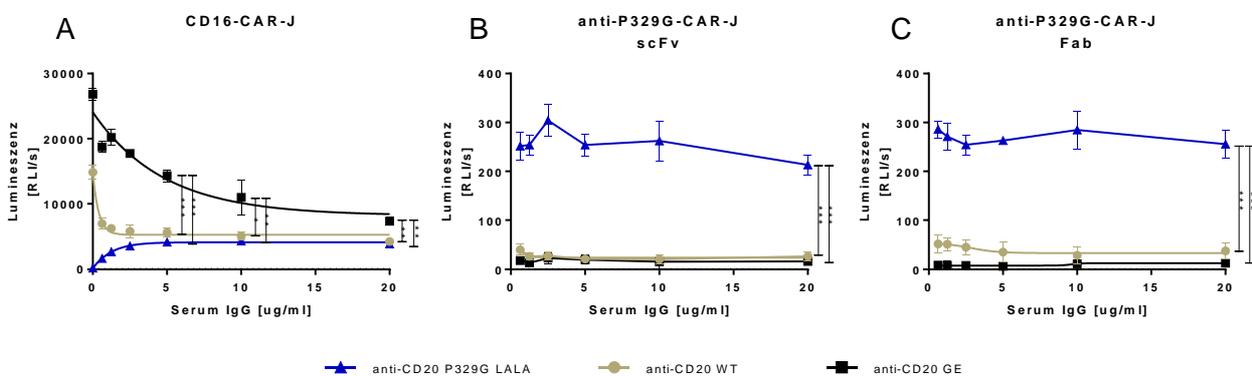


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Aktivierbarkeit von CD16-CAR-Reporterzellen und anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen in Anwesenheit von Serum IgG in physiologischen Konzentrationen. Gezeigt ist das Lumineszenzsignal von CD16-CAR-Reporterzellen [A], anti-P329G-Reporterzellen im scFv-CAR-Format [B] oder Fab-CAR-Format [C], in einer Ko-Kultur mit SU-DHL-4 (CD20^+), die mit einer konstanten Konzentration von $0.1 \mu\text{g/ml}$ Antikörper aktiviert wurden. Die verwendeten Antikörper waren entweder Obinutuzumab (anti-CD20 GE), ein anti-CD20 Antikörper mit wildtyp-Fc (anti-CD20 WT) oder eine Variante mit P329G LALA Mutation (anti-CD20 P329G LALA). Simultan wurde humanes Serum IgG hinzutitriert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLI) pro Sekunde/Well gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert technischer Triplikate \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments, aus einer Reihe von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Für den Vergleich wurde eine one-way ANOVA Analyse mit Bonferroni-Korrektur verwendet. P-Werte wurden mit nicht signifikant (ns) = $P = 0,12$; * = $P \leq 0,033$; ** = $P \leq 0,002$; *** = $P \leq 0,001$ angegeben.

Diese im ersten Teil der Arbeit durchgeführten Versuche dienten der Charakterisierung des anti-P329G-CAR und bilden die Basis für die Etablierung des anti-P329G-CAR in primären T-Zellen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden die anti-P329G-CAR-T-Zellen bezüglich ihrer Funktionalität untersucht, was zur Vorbereitung des anti-P329G-CAR für den adoptiven T-Zell-Transfer dient.

4.2 Etablierung des anti-P329G-CAR für den adoptiven T-Zell-Transfer

4.2.1 Expression des anti-P329G-CAR im scFv-Format in primären T-Zellen

Um einen modularen CAR-T Ansatz für therapeutische Anwendungen zu verfolgen, wurde die Funktionalität des anti-P329G-CAR in primären T-Zellen untersucht. Hierfür wurden CD3⁺ T-Zellen aus PBMC isoliert und lentiviral mit CAR transduziert. Nach fünf Tagen wurde der Erfolg der Transduktion mittels GFP-Expression überprüft. Ab 14 Tagen nach der Transduktion wurde die CAR-Expressionsrate bestimmt und ab einer CAR-Expressionsrate von > 75 % wurden die CAR-T-Zellen für weiterführende Versuche verwendet. Der Transduktionserfolg wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierfür wurden sowohl CAR- als auch GFP-Expression analysiert. Die anti-P329G-scFv-CAR-Expression wurde indirekt über einen Fluorochrommarkierten Antikörper mit Spezifität gegen Fc γ des primären Antikörpers detektiert. Als primäre Antikörper wurden entweder IgG1 mit P329G LALA mutiertem Fc oder glycomodifiziertem-Fc (GE) verwendet. Sowohl CAR- als auch GFP-Analyse der transduzierten Zellen zeigten eine Verschiebung der Zellpopulation im Seitwärtsstreulicht, für anti-P329G-scFv-CAR transduzierte Zellen.

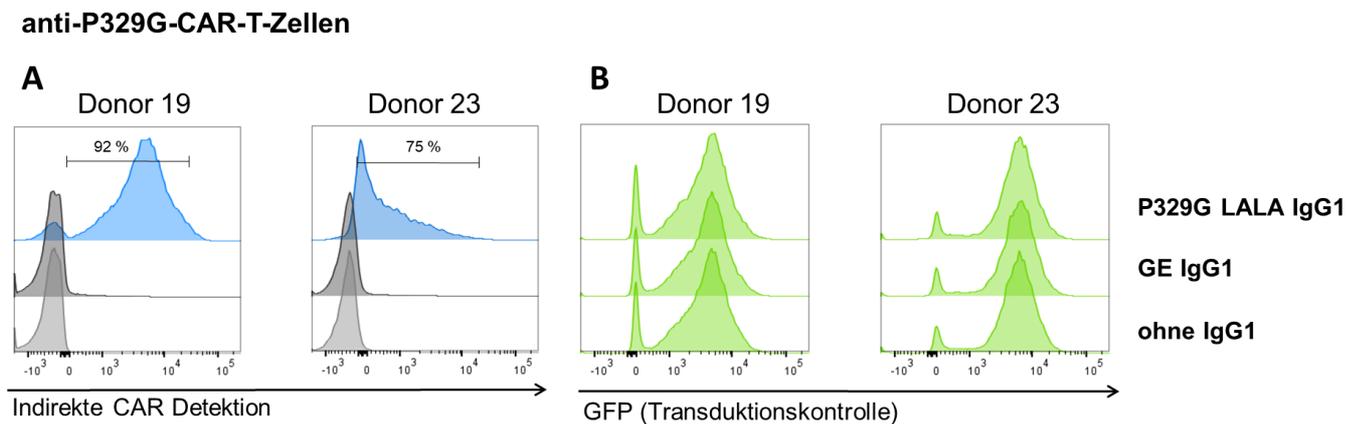


Abbildung 12: Anti-P329G-CAR-scFv-Expression in primären T-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der anti-P329G-CAR-scFv-Expression in primären CD3⁺ T-Zellen. Für die Detektion des anti-P329G-CAR, wurde eine indirekte CAR-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die anti-P329G-CAR-T-Zellen mit einer gesättigten Antikörperkonzentration (100 nM) entweder mit P329G LALA IgG1, glycomodifiziertem IgG1 (GE) ohne P329G Mutation oder keinem Antikörper, inkubiert. Die Bindung dieser Antikörper wurde mittels anti-humanem Fc γ -spezifischem Alexa 647-konjugiertem Sekundärantikörper via Durchflusszytometrie detektiert [A]. Als positive Transduktionskontrolle, wurde die GFP-Expression gemessen [B]. Gezeigt sind zwei repräsentative Transduktionsansätze aus Zellpools von Donor 19 und Donor 23 von anti-P329G-CAR-T-Zellen > 14 Tage post Transduktion.

4.2.2 Einfluss verschiedener Antikörper Konzentrationen auf das Tumorzelllyse-Verhalten von anti-P329G-CAR-T-Zellen

Eine Voraussetzung für den Erfolg einer potentiellen anti-P329G-CAR-T-Zell-Therapie ist, dass CAR-T-Zellen ausschließlich in der Gegenwart des entsprechenden CAR-Adaptormoleküls aktiv sind. Um dies zu untersuchen wurden verschiedene Tumorzellen: HeLa (FolR1⁺), Z-138 (CD20⁺) und MV3 (FAP⁺) mit anti-P329G-CAR-T-Zellen im Verhältnis 1:5 inkubiert. In diese Ko-Kultur wurden verschiedene Konzentrationen von Target-spezifischen Antikörpern anti-FolR1 (16D5) P329G LALA IgG1, anti-CD20 (GA101) P329G LALA IgG1 oder anti-FAP (4B9) P329G LALA IgG1 titriert. Als Kontrolle wurde ein DP47 P329G LALA Kontrollantikörper verwendet, der Target-unspezifisch ist (Tomlinson et al. 1992). Nach 24 und 48 Stunden wurde freigesetztes LDH im Überstand gemessen, welches mit der Anzahl lysierter Zellen korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Tumorzelllinien und anti-P329G-CAR-T-Zellen ohne Antikörper keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung hat. Dies konnte durchgängig für die verschiedenen Targetzellen und unabhängig von der Inkubationsdauer gezeigt werden. Einen vergleichbaren Effekt, hatte die Verwendung des DP47 Kontrollantikörpers bei einer Konzentration von 66 nM. Hier konnte ebenfalls keine Beeinträchtigung Targetzell-Viabilität festgestellt werden.

Bei der Verwendung von Target-spezifischen Antikörpern hingegen konnte gezeigt werden, dass bei einem CD4⁺ zu CD8⁺ Verhältnis von [1:2] eine signifikante Tumorzelllyse induziert wurde (Abbildung 13, rechte Seite). Die Geschwindigkeit der Tumorzelllyse war allerdings Target-spezifisch und trat bei Z-138 Zellen bereits nach 24 Stunden auf und war nach 48 Stunden nicht mehr zu detektieren (Abbildung 13 B). Bei HeLa und MV3 Targetzellen konnte ebenfalls nach 24 Stunden der Beginn der Targetzelllyse beobachtet werden, diese nahm innerhalb der gesamten 48 Stunden weiter zu, so dass nach 48 Stunden ein signifikanter Rückgang der Targetzellen zu beobachten war (Abbildung 13 A und C). Betrug das Verhältnis der anti-P329G-CAR-T-Zellen CD4⁺ zu CD8⁺ [2:1] wurde keine signifikante Tumorzelllyse beobachtet (Abbildung 13, linke Seite).

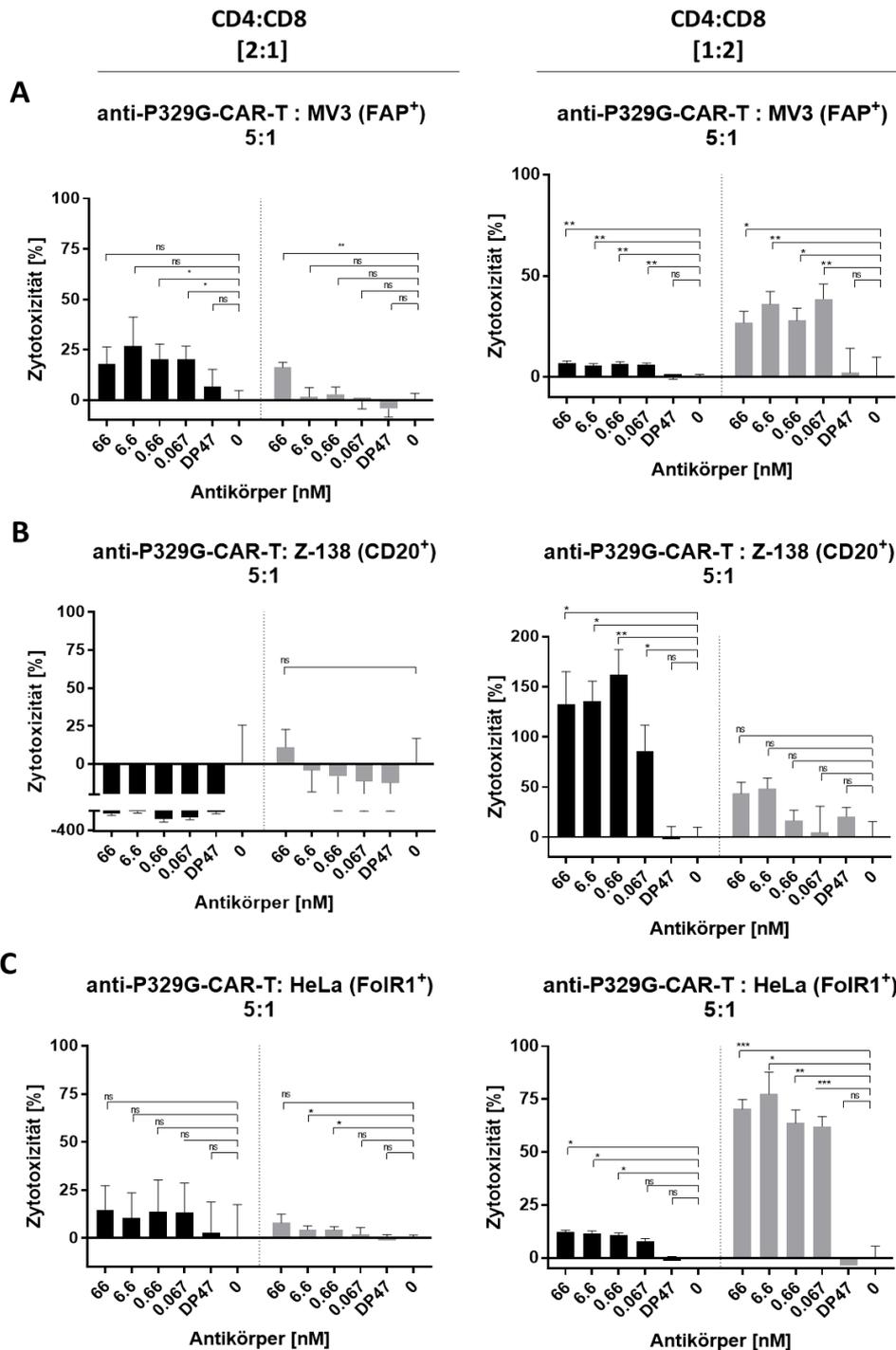


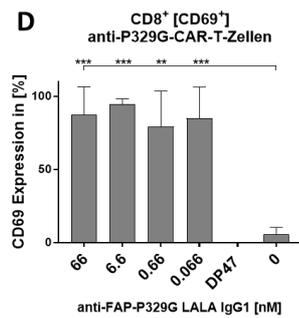
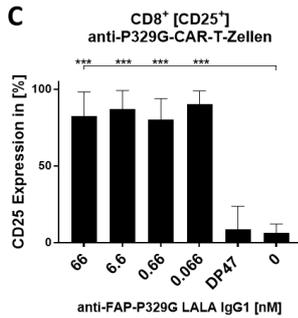
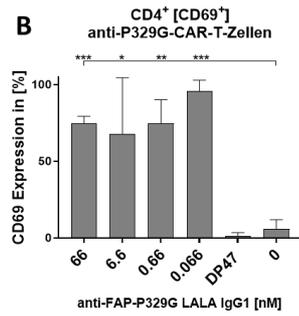
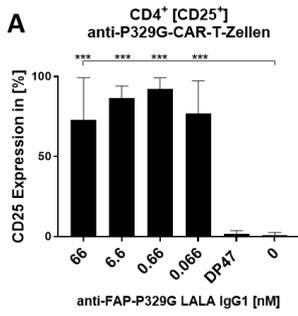
Abbildung 13: Analyse der Aktivierung und des Tumorzelllyse-Verhaltens von anti-P329G-CAR-T-Zellen in Abhängigkeit von Target-spezifischen P329G LALA IgG1 CAR-Adaptermolekülen und CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zell-Verhältnis. A: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und MV3 (FAP⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-FAP P329G IgG1 inkubiert. B: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und Z-138 (CD20⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD20 P329G IgG1 inkubiert. C: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und HeLa (FolR1⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD20 P329G IgG1 inkubiert. Als Kontrolle wurde ein nicht spezifischer DP47 P329G LALA IgG1 (DP47) oder kein Antikörper in die Ko-Kultur gegeben (0). Nach 24 und 48 Stunden wurde ein Aliquot des Versuchsüberstands entnommen und mit Detektionssubstrat versetzt um den LDH-Gehalt zu bestimmen. Anschließend wurde die Zytotoxizität mittels der Kontrollen von maximal-Lyse und spontan-Lyse berechnet. Auf der linken Seite sind Messwerte dargestellt bei denen das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen [2:1] betrug. Jeder Balken ist der Mittelwert aus technischen Triplikaten von einem Donor. Angezeigt ist außerdem der Mittelwert \pm Standardabweichung. Auf der rechten Seite sind Messwerte dargestellt bei denen das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen [1:2] betrug. Jeder Balken ist der Mittelwert aus technischen Triplikaten von einem repräsentativen Donor aus zwei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter Student, two-tailed t-Test mit Welsch's Korrektur angewendet, nicht signifikant (ns) = $P = 0,12$; * = $P \leq 0,033$; ** = $P \leq 0,002$; *** = $P \leq 0,001$.

4.2.3 Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf anti-P329G-CAR-T-Zellen

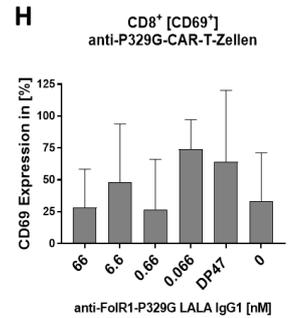
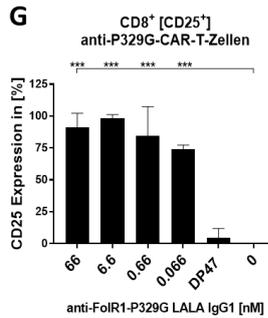
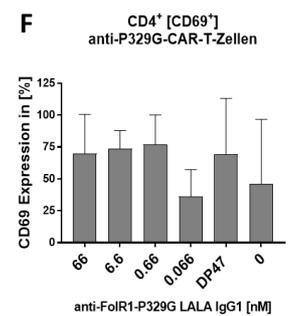
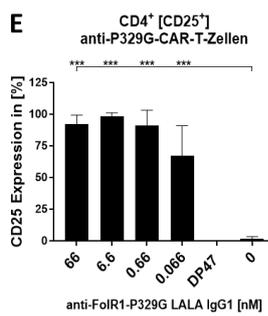
Als nächstes wurde die Aktivierung der anti-P329G-CAR-T-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Expression von CD25 und CD69 Aktivierungsmarkern auf anti-P329-CAR-T-Zellen in Gegenwart verschiedener CAR-Adapter untersucht. HeLa (FolR1⁺), Z-138 (CD20⁺) und MV3 (FAP⁺) wurden mit anti-P329G-CAR-T-Zellen im Verhältnis 1:5 inkubiert. In diese Ko-Kultur wurden verschiedene Konzentrationen eines Target-spezifischen Antikörpers anti-FolR1 (16D5) P329G LALA IgG1, anti-CD20 (GA101) P329G LALA IgG1 oder anti-FAP (4B9) P329G LALA IgG1 titriert. Als Kontrollantikörper wurde ein DP47 P329G LALA Kontrollantikörper verwendet, der Target-unspezifisch ist (Tomlinson et al. 1992). Nach 48 Stunden wurden die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen untersucht. Die Analyse des Aktivierungsmarker CD69 zeigte bei anti-P329G-CAR-T-Zellen, die mit MV3 Tumorzellen und anti-FAP-P329G IgG1 inkubiert wurden eine signifikant erhöhte Expression (Abbildung 14 B und D). Weiterhin lässt sich auch eine signifikante Zunahme des CD69 Aktivierungsmarkers bei CD4⁺ anti-P329G-Target-Zellen, die mit anti-CD20-P329G IgG1 inkubiert wurden, beobachten (Abbildung 14 J)

Bei der Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen auf CD25 Expression ließ sich in allen Ansätzen, in denen ein Target-spezifischer Antikörper präsent war, eine signifikante Zunahme der CD25 Expression erkennen. Dies war in allen Ansätzen unabhängig von den verwendeten Target-Zellen zu beobachten (Abbildung 14, schwarze Balken).

MV3 (FAP⁺)



HeLa (FolR1⁺)



Z-138 (CD20⁺)

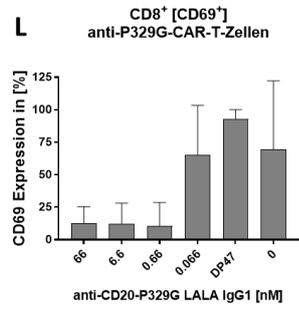
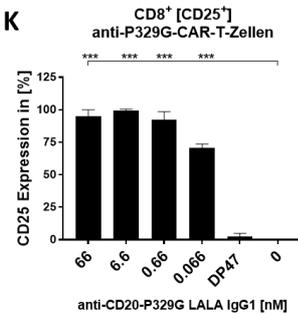
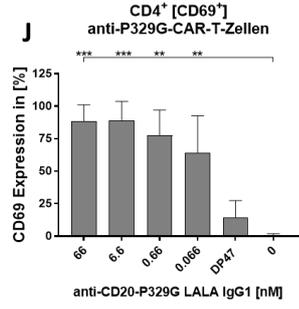
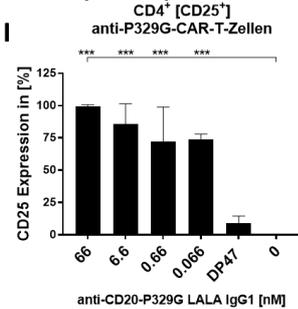


Abbildung 14: Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf anti-P329G-CAR-T-Zellen.

A-D: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und MV3 (FAP⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-FAP P329G IgG1 inkubiert. E-H: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und HeLa (FolR1⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD20 P329G IgG1 inkubiert. I-L: Anti-P329G-CAR-T-Zellen und Z-138 (CD20⁺) Targetzellen wurden im Verhältnis 5:1 mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD20 P329G IgG1 inkubiert. Als Kontrolle wurde ein nicht spezifischer DP47 P329G LALA IgG1 (DP47) oder kein Antikörper in die Ko-Kultur gegeben (0). Nach 48 Stunden wurde die Aktivierung durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden die technischen Triplikate eines jeden Ansatzes zusammengenommen und CD8⁺ und CD4⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen auf die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 überprüft. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte aus technischen Triplikaten \pm Standardabweichung des normalisierten Medians der Fluoreszenzintensität von drei Donoren. Für die statistische Analyse wurde ein ungepaarter Student, two-tailed t-Test mit Welsch's Korrektur angewendet, nicht signifikant (ns) = $P = 0,12$; * = $P \leq 0,033$; ** = $P \leq 0,002$; *** = $P \leq 0,001$.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Erkenntnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige modulare CAR-T-Zell-Plattform entwickelt, die auf einem CAR basiert, der gegen die P329G Mutation gerichtet ist. Die P329G Mutation wird in therapeutischen Antikörpern verwendet um unerwünschte Bindung an FcγRI, II, III und den Komplementfaktor C1q zu verhindern. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die P329G Mutation spezifisch von anti-P329G-CAR transduzierten Jurkat-NFAT-Reporterzellen erkannt wird und eine Antikörper-abhängige Aktivierung induziert. Basierend auf dieser P329G-CAR-Jurkat-NFAT-Reporterzelllinie wurde ein Assay entwickelt, der es ermöglicht Antikörper mit P329G im Fc-Teil auf ihre Funktionalität hin zu screenen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Binder, die mit dieser anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinie selektiert wurden, auch nach der Konvertierung der Antikörper in ein 2+1 TCB Format funktional sind und verwendet werden können, um Targetzellen zu lysieren. Der zweite Teil der Arbeit fokussierte sich auf die Etablierung des anti-P329G-CAR in primären T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass anti-P329G-CAR-T-Zellen in Anwesenheit eines Tumorantigen-spezifischen IgG1 mit P329G Mutation die Targetzelllyse induzieren. Die erfolgreiche Targetzelllyse ist dabei abhängig von der Dosis des eingesetzten Antikörpers, dem Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen, sowie dem Effektor- zu Targetzell-Verhältnis.

5.2 Etablierung einer modularen anti-P329G-CAR-J-Reporterzelllinie mit Antigenerkennungsdomäne im scFv- und Fab-Format

Ein Merkmal modularer CAR-Systeme ist, dass diese nicht direkt gegen ein Tumorantigen gerichtet sind, sondern stattdessen tumorspezifische CAR-Adapter binden. Der tumorantigengebundene CAR-Adapter wird durch die modCAR-T-Zelle erkannt, wodurch es zur Ausbildung der immunologischen Synapse und zur Aktivierung der CAR-T-Zellen kommt. Durch Verwenden dieser CAR-Adapter wird das flexible Binden verschiedener Tumorantigene mit einer nur einmalig transduzierten CAR-T-Zelle ermöglicht (Liu et al. 2019). Um solch ein modCAR zu generieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Sequenz eines anti-P329G-Binders verwendet (Darowski et al. 2019). Dieser Binder wurde nach der Immunisierung von Mäusen mit einem humanen monoklonalen P329G LALA IgG1 selektiert (Wessels et al. 2017). Wessels et al. konnten mittels SPR die spezifische Bindung dieses anti-P329G IgG1 an die P329G Mutation nachweisen und entwickelten basierend darauf einen humanen-FcγRI-P329G-Assay. Dieser Assay verwendet einen Biotin-markierten anti-P329G Antikörper zur Detektion von IgG1 Antikörper-anti-Drug-Antikörper (ADA)-Komplexen. Weiterhin wurde die Spezifität der anti-P329G Bindung durch die Kristallstrukturanalyse eines Komplexes bestehend aus einem P329G LALA mutierten Fc-Teil und gebundenem anti-P329G Fab gezeigt (Darowski et al. 2019). Dabei konnte gezeigt werden, dass der anti-P329G Fab in einem Winkel von circa 60° an die CH2-CH3 Domäne des Fc bindet, wodurch die zweite P329G Mutation im Fc-Teil verdeckt wird. Somit ist eine potentielle 2:1 Bindungsstöchiometrie von Fab zu Fc-Teil blockiert (Darowski et al. 2019). Diese Erkenntnisse bilden die Basis der vorliegenden Arbeit, deren Ziel es war ein CAR-Konstrukt zu generieren, das diesen spezifischen anti-P329G Binder als extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne besitzt.

Zunächst sollte das geeignete Format als extrazelluläre anti-P329G Antigenerkennungsdomäne gewählt werden. Hierfür wurden zwei anti-P329G-CAR-Varianten designend, die entweder eine anti-P329G-Fab-basierte oder eine anti-P329G-scFv-basierte Antigenerkennungsdomäne besitzen; sich intrazellulär aber nicht unterscheiden. Beide Formate weisen Vor- und Nachteile auf, die ausschlaggebend für den Erfolg des CAR sein können (Zhao et al. 2010).

Nicht jeder Fab-Binder lässt sich problemlos in ein scFv-Format konvertieren (Zhao et al. 2010). Durch die Konvertierung in das scFv-Format kann es zum Verlust der Bindung oder zur Reduktion der Spezifität gegen das Target kommen (Faitschuk et al. 2016). Daher wurde zunächst die Expression beider anti-P329G-CAR durchflusszytometrisch bestimmt. Neben der indirekten CAR-Detektion mittels Antikörper können auch Antigene, gegen die der CAR spezifisch ist, mit einem Reporter markiert werden (Syahir et al. 2015). Hierfür bieten sich Fluorochrom markierte Antigene (Juillerat et al. 2019) oder Enzym gekoppelte Antigene an (Gopalakrishnan et al. 2019). Gopalakrishnan et al. haben einen Luziferase basierten „Topanga-Assay“ entwickelt, der dazu dient, die CAR-Expression an der Zelloberfläche nachzuweisen (Gopalakrishnan et al. 2019). Der Assay nutzt ein rekombinantes Protein bestehend aus einem Luziferasereporter und dem Antigen, welches von dem CAR erkannt werden kann. Nachdem ein Detektionsreagenz zugegeben wird, kann das Lumineszenzsignal gemessen werden. Hierbei spiegelt das Lumineszenzsignal lediglich das Vorhandensein des CAR wieder, sagt allerdings nichts über dessen Funktionalität aus. Ein weiterer Nachteil dieses „Topanga-Assay“ ist auch, dass für jedes zu detektierende CAR ein neuer CAR-Adapter konstruiert werden muss. Dies ist zum einen mit viel Aufwand verbunden und zum anderen nicht bei allen Antigenen möglich (Levy et al. 2016). Eventuell kann auf anti-idiotypischen Antikörper als CAR-Adapter zurückgegriffen werden, falls diese vorhanden sind (Jena et al. 2013). Für die Detektion der klinisch zugelassenen CAR-T-Therapien (Subklewe et al. 2019) kann beispielsweise ein fluoreszenzmarkierter, anti-ideotypischer anti-CD19-scFv-Antikörper Klon 136.20.1 verwendet werden (Jena et al. 2013, Kalos et al. 2011). Für die Detektion des anti-P329G-CAR kann universell jeder Antikörper, der eine P329G Mutation im Fc-Teil besitzt, genutzt werden. Der Antikörper kann direkt fluoreszenzmarkiert sein oder durch einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden werden. Weitere Möglichkeiten der universellen Detektion können durch simultane Expression eines Protein-Tag, das entweder direkt an das CAR fusioniert (Davenport et al. 2018) ist oder ko-exprimiert wird (Philip et al. 2014) gewährleistet werden.

Nachdem die anti-P329G-CAR-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde die Affinität der beiden CAR-Antigenerkennungsdomänen näher untersucht. Binder die im Fab-Format selektiert wurden, weisen in der Regel eine höhere Bindungsaffinität zu ihrem Antigen auf als nach der Konvertierung dieser Binder in das scFv-Format (Benedict et al. 1997). Weiterhin gelten Fab-Fragmente im Vergleich zu scFv-Fragmenten als stabiler (Quintero-Hernandez et al. 2007). Daher könnten sich Fab-basierte Binder potentiell besser als CAR Antigenerkennungsdomäne eignen. Interessanterweise sind in Literatur bisher nur wenige Fab-basierte CAR beschrieben (Duan et al. 2019, Faitschuk et al. 2016). Die meisten CAR, darunter auch die beiden FDA-zugelassenen anti-CD19-CAR-Therapien Kymriah (FDA et al. 2018) und Yescarta (FDA et al. 2018) besitzen eine scFv-basierte Antigenerkennungsdomäne. Faitschuk et al. haben bei einem direkten Vergleich eines anti-CEA-CAR gezeigt, dass ein CAR im Fab-Format eine höhere Affinität zum Antigen aufweist und

weniger Antigen für die halb-maximale Aktivierung benötigt wird, als beim entsprechenden CAR im scFv-Format (Faitschuk et al. 2016). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Das anti-P329G-CAR im Fab Format zeigte eine höhere Affinität als das anti-P329G-CAR im scFv-Format. Beide Befunde unterstreichen zudem auch, dass Fab-selektierte Binder nach der Konvertierung in das scFv-Format an Affinität verlieren (Benedict et al. 1997). Dies tritt jedoch nicht für alle Antikörpersequenzen auf und ist für sich genommen auch kein Ausschluss Kriterium für das anti-P329G-CAR im scFv-Format. Das Nutzen von scFv-basierten CAR mit geringerer Affinität kann nämlich bei klinischen Ansätzen zu einer besseren Diskriminierung bei der Antigenerkennung führen (Caruso et al. 2015, Cho et al. 2018). Angewendet in einem Reporterassay bleibt die Bindung des anti-P329G-scFv-Binders an die P329G Mutation konstant und hat keinen Einfluss auf die Selektion von Antikörper Kandidaten im IgG1. Hier werden Antikörper über die Affinität der Fab-Arme zum Tumorantigen selektiert (Darowski et al. 2019).

Durch die instabile Expression des scFv, kann es bei scFv-basierten CAR-T-Zellen zur Aggregation des CAR kommen (Worn et al. 1999), woraus eine unerwünschte Aktivierung des T-Zelle in Abwesenheit des Antigens (*tonic-signalling*) resultiert (Long et al. 2015). Auch wenn das Tonic-Signalling bei manchen CAR Konstrukten in der therapeutischen Anwendung einen proliferativen Vorteil bringt (Stoiber et al. 2019), ist dies gerade bei der Entwicklung eines Reporterassays unerwünscht. Durch eine konstante Aktivierung, kann es zu einem erhöhten Basissignal führen (Fan et al. 2007) und die Sensitivität des Reporterassays beeinträchtigen. Um eine gute Daten Qualität zu gewährleisten und keine falsch positiven Signale zu generieren, ist es wichtig Artefakte zu kontrollieren und ein unerwünschte Rezeptor Aggregation auszuschließen. Um dem entgegenzuwirken wurde die anti-P329G-scFv-Variante Disulfid-stabilisiert. Zhao et al. zeigten, dass Disulfid-stabilisierte scFv-Fragmente eine erhöhte Stabilität aufweisen, gleichzeitig die Affinität des Binders aber nicht beeinträchtigt wird (Zhao et al. 2010). Für beide anti-P329G-CAR-Formate konnte keine unerwünschte Rezeptoraggregation festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass beide CAR-Formate in der Lage sind die P329G Mutation im Fc-Teil zu binden und in Anwesenheit des passenden Antigens in einer Dosis-abhängigen Aktivierung der Reporterzelllinie resultieren. Weder für das scFv- noch für das Fab-Format konnte eine unspezifische Aktivierung nachgewiesen werden, was die Grundlage für die Etablierung eines anti-P329G-CAR-Reporterassays darstellt.

Jurkat T-Zellen sind ein oft verwendetes Modell, um die T-Zell-Aktivierung zu untersuchen und die zugrundeliegenden Signalkaskaden besser zu verstehen (Abraham et al. 2004, Bartelt et al. 2009). Die Aktivierung der Jurkat-Zellen kann entweder durch den endogenen TCR erfolgen oder durch eingebrachte chimäre Rezeptoren, die sich die TCR zugrundeliegenden Signalkaskaden zu Nutze machen (Alonso-Camino et al. 2013, Bartelt et al. 2009). Oft sind zelluläre Ereignisse mit der Regulation der Transkription von Genen assoziiert und werden durch die Inhibierung oder Aktivierung von Rezeptoren ausgelöst. So führt auch die T-Zell-Aktivierung zu einer intrazellulären Signalkaskade, die in der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT, NF- κ B und AP-1 resultiert und die Expression der Ziel Gene zur Folge hat (Chemnitz et al. 2004). Durch das Koppeln eines Luziferase- oder Fluoreszenz-Reporters wie GFP kann die Genexpression und damit die Aktivierung der Zelle nachgewiesen und quantifiziert werden (Tomkowicz et al. 2015). Jurkat-T-Zell-basierte Reporterzelllinien finde breite Anwendung und sind ein gutes Werkzeug um die T-Zell-Biologie in

einem vereinfachten Modell zu untersuchen (Lee et al. 2012, Tomkowicz et al. 2015). Vor allem Luziferase-basierte Reporterzellen liefern eine hohe Assay-Sensitivität, wodurch auch minimale transkriptionelle Veränderungen mit einer hohen Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden können (Fan et al. 2007). Tomkowicz et al. entwickelten eine Jurkat-basierte Reporterzelllinie, die sowohl ein GFP-basiertes als auch ein Luziferase-basiertes Reportersystem vereint (Tomkowicz et al. 2015). Diese Kombination ermöglichte es die Rolle des Negativregulators TIM-3, bei der TCR-vermittelten T-Zell-Aktivierung weiter zu charakterisieren. Da die beiden Transkriptionsfaktoren, NF- κ B und NFAT durch das koppeln an GFP beziehungsweise Luziferase Expression differenziert untersucht werden konnten. So konnte gezeigt werden, dass TIM-3 einen Einfluss auf beide Transkriptionsfaktoren hat (Tomkowicz et al. 2015).

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelnde anti-P329G-CAR-J-Reporterassay sollte so konzipiert werden, dass er sich zum Screening im Hochdurchsatz-Format eignet und einen schnellen Auslesen der Ergebnisse ermöglicht. Deshalb wurde ein Luziferase-basierter Ansatz gewählt, bei dem das Auslesen der Ergebnisse bereits nach 6 Stunden möglich ist (Tomkowicz et al. 2015). Durch die Transduktion der Jurkat-NFAT-Zelllinie mit dem anti-P329G-CAR kommt es nach der Aktivierung des CAR zur Aktivierung des NFAT-Transkriptionsfaktors über die intrazelluläre CAR-Signaldomäne CD28 und CD3 ζ . Dadurch ist ein quantifizierbares Luziferase-Signal nach erfolgreicher Aktivierung des CAR detektierbar (Darowski et al. 2019). Abschließend für den ersten Teil lässt sich sagen, dass sich beide anti-P329G-Formate scFv und Fab zur Etablierung einer Reporterzelllinie eignen.

5.3 Anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen und Alternativen für das Selektieren von Bindern

Unter anderem werden therapeutisch wirksame Antikörper, basierend auf der Eigenschaft Tumorzellen zu lysieren, selektiert. Diese Assays unterliegen individuellen Schwankungen. Ebenso ist die Konvertierung der Binder in das finale Format zeit- und ressourcenaufwendig (Brinkmann et al. 2017, Spiess et al. 2015). Im bisherigen internen Arbeitsablauf wurden die zu selektierenden Binder zuerst von einem P329G LALA IgG1-Format in das finale 2+1 TCB-Format konvertiert, bevor eine Selektion auf Funktionalität möglich war (Roche, unveröffentlicht). Für eine Vielzahl an Bindern stellt sich erst nach dieser Konvertierung heraus, dass sie für die therapeutische Anwendung ungeeignete Eigenschaften besitzen (Roche, unveröffentlicht). Um Binder schon vor der Konvertierung zu selektieren, werden Assays angewendet, die auf rekombinante Fusionsproteine zurückgreifen; Binder können so mittels Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assays (ELISA) (Miller et al. 2012, Wessels et al. 2017) oder via SPR (Dinel et al. 2019) detektiert werden. Dies lässt allerdings noch keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der Binder im finalen Format zu. Für die therapeutische Antikörperentwicklung ist es daher unabdingbar zellbasierte-Assays zur Verfügung zu haben, welche den Wirkmechanismus des Antikörpers widerspiegeln und eine zuverlässige Selektion funktionaler Binder ermöglichen (Darowski et al. 2019).

Hierfür eignen sich sogenannte modulare Systeme zu denen auch der anti-P329G-CAR-J-Assay zählt. In der Literatur sind bereits einige modulare Systeme beschrieben, für die gezeigt werden konnte, dass sich die Aktivität der T-Zellen über die Wahl des Adapters regulieren lässt (Darowski et al. 2019, Minutolo et al. 2019). Wie bereits beschrieben, sind Jurkat T-Zellen ein oft verwendetes Modell um die T-Zell-Aktivierung

zu untersuchen und die zugrundeliegenden Signalkaskaden besser zu verstehen (Abraham et al. 2004, Bartelt et al. 2009). Rosskopf et al. haben eine Jurkat-Reporterzelllinie entwickelt, die eine simultane Analyse der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NFAT und AP-1 ermöglicht (Rosskopf et al. 2018). Durch das einzelne Koppeln der Transkriptionsfaktoren an die Expression verschiedener Reporterfluoreszenzproteine kann eine detaillierte Analyse der zugrundeliegenden Signalwege stattfinden (Rosskopf et al. 2018). Durch diesen multiparametrischen Analyse könnten TCR in die Zellen eingebracht und mit verschiedenen modularen Liganden stimuliert werden. Eine daraus resultierende Aktivierung der Rezeptoren kann dann durch die Fluoreszenzreporter nachvollzogen werden. So kann die Aktivierung verschiedener TCR in Abhängigkeit der unterschiedlichen Tumorantigene untersucht werden (Rosskopf et al. 2018). Eine Modifikation des Assays, indem der TCR mit einem CAR substituiert würde, könnte zur Evaluierung ko-stimulatorischer Domänen dienen und so zur Findung einer optimierten T-Zell-Aktivierung beitragen (Rosskopf et al. 2018). Die Aktivierung von Jurkat-Zellen kann durch den endogenen TCR (Bacac et al. 2016) oder durch eingebrachte chimäre Rezeptoren (Alonso-Camino et al. 2013) die sich TCR Signaldomänen zu Nutze machen, erfolgen. Durch eine modulare, Liganden-vermittelte Aktivierung kann eine solche Reporterzelllinie als Selektionswerkzeug verwendet werden und Rückschlüsse auf die Funktionalität des Antikörpers geben. Ein weiterer modularer, funktioneller Assay der zur Selektion von therapeutisch wirksamen Molekülen verwendet wird, ist der Jurkat-NFAT-Assay (Promega et al. 2020, Signosis et al. 2020). Dieser basiert auf der Kreuzvernetzung von Target und Effektorzellen, die analog zum anti-P329G-CAR-J-Reporterassay durch ein Adaptermolekül vermittelt wird. Hier ist das Adaptermolekül allerdings kein IgG, sondern ein T-Zell-bispezifischer Antikörper (TCB). Dieser Assay kann genutzt werden um jegliche bispezifische oder multispezifische Antikörper zu selektieren, die neben der Target-spezifität auch einen CD3 Binder besitzen (Bacac et al. 2016, Wolach et al. 2015). Durch die simultane Bindung des bispezifischen Moleküls an das Tumorantigen und den TCR der Jurkat Effektor-Zellen wird diese aktiviert. Nach Zugabe eines Substrats kann ein Luziferasesignal quantifiziert werden, das mit der Aktivierung korreliert (Promega et al. 2020, Signosis et al. 2020). Der Jurkat-NFAT-Assay erlaubt genau wie der anti-P329G-CAR-J-Assay ein robustes und funktionelles Selektieren von Bindern. Ein Nachteil des Jurkat-NFAT-Assay ist allerdings die Notwendigkeit zur vorrausgehenden Konvertierung der Binder aus dem IgG-Format in das gewünschte TCB Format (Darowski et al. 2019). TCB im 2+1 Format sind mit einem höheren Produktionsaufwand und weiteren zeitaufwändigen Qualitätskontrollen verbunden. Daher stellt der anti-P329G-CAR-J-Assay eine gute Alternative da, um ein frühes selektieren von Bindern im P329G IgG1 Format zu ermöglichen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass, Binder die im IgG1 Format selektiert wurden auch nach Konvertierung in das 2+1 TCB-Format eine zuverlässige Antigen-Erkennung und Effektorfunktion der T-Zellen zulassen. Dies ermöglicht bereits eine frühe Priorisierung der Binder und vermeidet die zeit- und ressourcenaufwendige Konvertierung nicht funktionaler Binder in andere Formate (Darowski et al. 2019). Ein weiterer modularer, funktioneller Assay, der die Antikörper-abhängige Fc γ RIIIa (CD16)-Aktivierung nutzt und somit ebenfalls für die Binder Selektion im IgG-Format herangezogen werden kann, wurde von Tada et al. entwickelt (Tada et al. 2014). Der Assay basiert auf einer Jurkat-Reporterzelllinie, die mit Fc γ RIIIa transduziert wurde. Infolge der Kreuzvernetzung des Fc γ RIIIa durch antigen-gebundenen Antikörper kommt es zur Luziferase Expression, die nach Zugabe eines Substrats detektiert werden kann. Dieser Assay eignet

sich um Fc-modifizierte Antikörper zu selektieren (Tada et al. 2014). Übereinstimmend mit den erhobenen Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit haben auch Tada et al. für Rituximab zeigen können, dass IgG1 mit LALA Mutation keine Luziferase-Aktivität der entsprechenden Reporterzelllinie bewirkt, wohingegen antigengebundene wildtyp-Fc oder Fc-modifizierte IgG Varianten eine IgG-konzentrationsabhängige Aktivierung der Reporterzelllinie zur Folge haben (Tada et al. 2014). Rataj et al. bestätigten diese Erkenntnisse mit primären CD16-CAR-T-Zellen (Rataj et al. 2019). Dieser von Tada entwickelte Fc γ RIIIa-Reporterassay eignet sich somit sehr gut zur Selektion und Vorhersage der Funktionalität von wildtyp-Fc IgG oder IgG glycomodifizierte Fc-Varianten, für Immuneffektor stille Varianten wie P329G LALA Fc IgG ist er allerdings ungeeignet. Auch eine potentielle Verwendung als diagnostisches Werkzeug für den Nachweis von therapeutischen Antikörpern aus Patientenserum wäre für den anti-P329G-CAR-J-Reporterassay denkbar, da keine signifikante Störanfälligkeit unter supra-physiologischen Konzentrationen an Serum IgG beobachtet werden konnte.

Eine weiterer, allerdings CAR-basierter Assay, wurde von Alonso-Camino et al. entwickelt (Alonso-Camino et al. 2013, Alonso-Camino et al. 2009). Dieser Assay ist nicht modular, dient aber auch dazu Binder im scFv-Format zu selektieren. Hier werden die zu selektierenden Binder zunächst in ein CAR-Format überführt, in Jurkat-Zellen transduziert und dann auf ihre Funktionalität evaluiert (Alonso-Camino et al. 2009). Die Gruppe konstruierte eine 1.5×10^5 scFv-basierte CAR-Bibliothek. Als Quantifizierung wurde allerdings kein Luziferase basierte Detektion verwendet, sondern die durchflusszytometrische Analyse auf den Aktivierungsmarker CD69 (Alonso-Camino et al. 2013). Dieser Ansatz bietet eine gute Alternative zum anti-P329G-CAR-J-Assay, da auch hier ein schnelles, funktionelles Auslesen der Ergebnisse im finalen Binder Format gewährleistet ist. Das selektierte CAR kann direkt in primäre T-Zellen transduziert werden und für zytotoxische-Analysen verwendet werden (Alonso-Camino et al. 2013). Auch immunmodulatorische Antikörper lassen sich durch solche Reporterzelllinien selektieren (Brinkmann et al. 2019). Hierfür erfolgt die kontinuierliche Aktivierung der T-Zellen über eine CAR oder TCR Stimulation, aus der zugrundeliegenden Reporter Expression resultiert dann ein detektierbares Signal (Brinkmann et al. 2019, . 2017, Teige et al. 2019). Das Signal kann nun in Abhängigkeit von den zu selektierenden immunmodulatorischen Antikörpern beeinflusst werden. Diese Unterschiede lassen sich quantifizieren und dienen zur Selektion von Antikörpern die beispielsweise die Achse zwischen PD-1 und PD-L1 oder CTLA-4 und CD80/CD86 beeinflussen (Seidel et al. 2018, Teige et al. 2019).

Zusammenfassend für den ersten Teil lässt sich sagen, dass beide Varianten des anti-P329G-CAR zur Etablierung einer Reporter-Zelllinie geführt haben, die nur in Anwesenheit des P329G-CAR-Adapters und dem Tumorantigen ein Luziferase Signal zeigt. Mithilfe des etablierten anti-P329G-Assay kann eine frühe Selektion potentiell therapeutisch wirksamer Bindern gewährleistet werden. Diese Binder können sowohl im IgG-Format als auch im 2+1 TCB-Format verwendet werden (Darowski et al. 2019). Außerdem können so direkt IgG1 selektiert werden, die potentiell in Kombination mit anti-P329G-modCAR-T-Zellen als Therapie verwendet werden könnten. Der anti-P329G-CAR-J-Assay bietet durch die einfache Handhabung und Reproduzierbarkeit eine gute Ergänzung zu bereits bestehenden Assays (Jutz et al. 2017, Tada et al. 2014) und bildet außerdem die Grundlage für die Etablierung des anti-P329G-CAR zur therapeutischen Anwendung.

5.4 Evaluierung von anti-P329G-CAR-T-Zellen für die therapeutische Anwendung als Alternative zu konventionellen CAR-T-Zellen

Derzeitig verfügbare CAR-T-Zell-Therapien sind so konzipiert, dass die CAR konstitutiv exprimiert werden und direkt gegen ein Tumorantigen gerichtet sind (Subklewe et al. 2019). Das Erkennen des Antigens induziert die Aktivierung der CAR-T-Zellen und führt zu deren Proliferation und zur Induktion der Tumorzelllyse. Trotz der therapeutischen Erfolge ist die Verwendung dieser „direkten CAR“ mit starken Nebenwirkungen behaftet (Yanez et al. 2019). In der veröffentlichten Studie von Neelapu et al, zeigten 93 % der NHL Patienten, die mit der anti-CD19-CAR-T-Zell-Therapie Yescarta behandelt wurden CRS (Neelapu et al. 2017). Da die Aktivität dieser CAR-T-Zellen nicht intrinsisch kontrolliert werden kann, werden Nebenwirkungen derzeit mit der Gabe von anti-inflammatorischen oder Zytokin-neutralisierenden Medikamenten wie dem IL-6 Rezeptor Antagonisten Tocilizumab, dem TNF- α -Inhibitor Etanercept oder dem IL-1R Inhibitor Anakinra behandelt (Lee et al. 2014, Lee et al. 2019, Yanez et al. 2019). Eine weitere Möglichkeit Nebenwirkungen zu reduzieren ist die Eliminierung der CAR-T-Zellen mittels „*Sucide Switch*“ (Budde et al. 2013) oder anti-CAR-CAR-T-Zellen (Koristka et al. 2019). Allerdings wird dadurch der therapeutische Effekt stark eingeschränkt oder komplett inhibiert.

Um dem Mangel an Dosierbarkeit entgegenzuwirken und die Aktivität der CAR-T-Zellen besser zu kontrollieren, werden modCAR-T-Zell-Ansätze in präklinischen Studien (Bachmann et al. 2019, Ma et al. 2016, Rodgers et al. 2016) und klinischen Studien getestet (D'Aloia et al. 2016, Lee et al. 2019). Hierbei werden CAR-Adapter verwendet um die immunologische Synapse auszubilden und die modCAR-T-Zellen zu aktivieren (Bachmann et al. 2019). Durch das Titrieren des Adapter-Moleküls kann die Aktivität der CAR-T-Zellen reguliert werden und die modCAR-T-Zellen können je nach Bedarf «an- oder abgeschaltet werden (Caruso et al. 2015). Analog zu anderen modCAR-T-Zellen (Lee et al. 2019) konnte auch für anti-P329G-CAR-T-Zellen, eine Hochregulierung der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 gezeigt werden, wenn diese die in Anwesenheit des CAR-Adapters und des entsprechenden Tumorantigens kultiviert wurden.

Für die Aktivierung der modCAR-T-Zellen ist es dabei prinzipiell vergleichbar, ob das Adapter-Molekül ein IgG basierter CAR-Adapter (Ochi et al. 2014, Rataj et al. 2019), ein Nanobody-basierter (Albert et al. 2017) oder ein niedermolekularer („*small molecule*“) CAR-Adapter ist (Chu et al. 2018, Kim et al. 2015). Weiterhin ist die Aktivierung auch unabhängig davon, welche Antigenerkennungsdomäne das CAR aufweist. Beispielsweise kann die konventionelle scFv-Antikenerkennungsdomäne durch ein Biotin-bindende Domäne (Urbanska et al. 2012), eine Streptavidin-bindende Domäne (Lohmueller et al. 2017) oder FcR-bindende Domäne (Rataj et al. 2019) ersetzt werden. Dies zeigt wie flexibel und universell kombinierbar modCAR-Ansätze sind.

Eine Vielzahl von konventionellen CAR-T-Zellen besitzen Antigenerkennungsdomänen, die von Maus monoklonalen Antikörpern stammen (Carpenter et al. 2013). Dadurch besitzen sie ein hohes Risiko immunogen zu wirken (Sommermeyer et al. 2017). Dies hat zur Folge, dass zum einen die Funktionalität der CAR-T-Zellen stark beeinträchtigt wird (Lam et al. 2020) und zum anderen anaphylaktische Reaktionen

auftreten können (Curran et al. 2012, Sun et al. 2018). Für anti-Mesothelin CAR-T-Zellen wurden schwere kardiale Dysfunktionen beobachtet, die letztendlich durch die Bildung von anti-Maus-Antikörpern ausgelöst wurden (Maus et al. 2013). Um CAR-T-Zellen effektiver und sicherer zu machen, können die murinen Sequenzen humanisiert werden (Sommermeyer et al. 2017). Übertragen auf modCAR-T-Zellen bedeutet dies, dass nicht nur die Wahl der CAR eine Rolle spielt, sondern auch der CAR-Adapter hinsichtlich immunogenitäts-Effekten berücksichtigt werden muss (Sun et al. 2018). Die meisten bisher in der Literatur beschriebenen CAR-Adapter werden zusätzlich modifiziert (Darowski, Kobold, Jost and Klein, 2019). Für diese Modifikationen werden Haptene (Ma et al. 2016) oder Neo-Peptide (PNE) (Rodgers et al. 2016) an die CAR-Adapter fusioniert. Dadurch sind zusätzliche Reinigungsschritte und Qualitätskontrollen erforderlich, die mit einem größeren Aufwand und erhöhter Komplexität verbunden sind (Chaganti et al. 2018, Spahr et al. 2017). Außerdem können diese nicht-humanen Modifikationen die Immunogenität des CAR-Adapters negativ beeinflussen (Maus et al. 2013). Um das Risiko der Immunogenität zu ermitteln können *in silico* immunogenitäts-Analysen durchgeführt werden (Rodgers et al. 2016). Für eine 14 Aminosäure großes PNE aus dem den Hefe Transkriptionsfaktor GCN4 konnte beispielsweise nur eine minimal Immunogenität vorausgesagt werden, wodurch es sich potentiell als Modifikation eignet (Rodgers et al. 2016). In einer weiteren Studie von Ma et al. wurden ebenfalls FITC-CAR-Adapter mit verschiedenen Target-Affinitäten entwickelt, die in Kombination mit dem anti-FITC modCAR die gleiche Zytotoxizität aufweisen in der prognostizierten Immunogenität-induzierenden Effekte aber variieren (Ma et al. 2016, Vaughan et al. 1996). Bisher konnte in klinischen Studien mit verschiedenen Molekülen noch keine für die P329G Mutation spezifische Anti-Drug-Antikörper detektiert werden (Roche, unveröffentlicht). Zu klären bleibt allerdings, ob das anti-P329G-scFv die Bildung von anti-idiotypischen oder neutralisierenden anti-Drug-Antikörpern auslösen könnte und ob diese potentiell die anti-P329G-CAR-Funktion beeinflussen. Bei YESCARTA® welche den murinen anti-CD19 Binder FMC63 als extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne verwendet, konnten anti-FMC63 Antikörper detektiert werden. Diese beeinträchtigten allerdings nicht die CAR-T-Zell-Expansion oder deren Persistenz (Gorovits et al. 2019).

5.5 Regulierung anti-P329G-CAR-T-Zellen und anderer modCAR-T-Zellen über den CAR-Adapter

Im Gegensatz zu herkömmlichen CAR-T-Zelltherapien (Subklewe et al. 2019) bieten modCAR-T-Zellen durch die Wahl des CAR-Adapters, die Möglichkeit die Formation der immunologischen Synapse zu kontrollieren (Bachmann et al. 2019). So beeinflusst sowohl die Dosierung, die Affinität und die Halbwertszeit des CAR-Adapters die Formation der immunologischen Synapse (Rodgers et al. 2016). Allgemein ist bekannt, dass die Aktivierung von konventionellen, direkten CAR-T-Zellen mit der erhöhten Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α , IL-6, GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-8, oder IL-5 korreliert (Brudno et al. 2016). Vor allem die unkontrollierte Freisetzung von Zytokinen und die fehlende Regulierung der Aktivität der CAR-T-Zellen ist für konventionelle CAR-T-Zellen limitierend. modCAR-T-Zellen bieten hier verschiedene Ansätze um dieses Problem zu umgehen. Zum einen ist eine Regulierung der Aktivität der modCAR-T-Zellen über die Titrierbarkeit des CAR-Adapter möglich (Kim et al. 2015). Verschiedene Gruppen konnten unabhängig zeigen, dass die Titrierbarkeit des CAR-Adapter auch eine Regulierung der Zytokin-Ausschüttung erlaubt und zur Steuerung der Aktivität der CAR-T-Zellen genutzt werden kann, ohne

diese aus dem System zu eliminieren (Lee et al. 2019). Auch für die anti-P329G-CAR-T-Zellen wurde in Abwesenheit des CAR-Adapter keine Zytokin Ausschüttung beobachtet wohingegen die Zugabe des CAR-Adapters ebenfalls ein „Anschalten“ der anti-P329G-CAR-T-Zellen zur Folge hatte. Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der modCAR-T-Zellen zu modulieren besteht darin einen CAR-Adapter mit geeigneter Affinität zu wählen. Cho et al. haben beispielsweise gezeigt das die Zytokin-Ausschüttung über die Affinität des CAR zum CAR-Adapter reguliert werden kann (Cho et al. 2018). Dies bietet den Vorteil, dass die CAR-Aktivität nicht nur über die Titrierbarkeit des CAR-Adapters sondern auch durch dessen Affinität beeinflusst werden kann. Ein weiterer Ansatz zur Regulierung der modCAR-Aktivität bietet das Nutzen von CAR-Adaptoren mit verschiedenen Affinitäten zum Tumorantigen. Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, ließen sich anti-P32G-CAR-T-Zellen unterschiedlich stark aktivieren, wenn anti-FolR1-CAR-Adapter mit verschiedenen Affinitäten gegen das Tumorantigen supplementiert wurden. So können hoch- oder niedrigaffine Antigen-Binder genutzt werden, um zusätzlich ein flexible Immunantwort zu erzielen. In weiterführenden Versuchen wäre es interessant den Phänotyp von CAR-T-Zellen zu untersuchen um zu sehen ob die Affinität des CAR-Adapters oder die Verabreichung einer Kombination von zwei CAR-Adaptoren einen Einfluss auf die Erschöpfung der anti-P329G-CAR-T-Zellen hat. Weiterhin ist auch die Halbwertszeit des CAR-Adapters ausschlaggebend für die Verträglichkeit und den Erfolg der Therapie (Lee et al. 2019). Generell weisen niedermolekulare-CAR-Adapter wie FITC-Folat-CAR-Adapter eine geringere Halbwertszeit <90 Minuten (Tummers et al. 2016) als IgG-CAR-Adapter auf. Dies würde zwar eine kontinuierliche Infusion erfordern, aber aufgrund der (Molekulargewicht: ~873 Da) einen potentiellen Vorteil bei der Tumorpenetration ergeben (Lee et al. 2019). Anders als bei IgG basierter CAR-Adaptoren mit einem Molekulargewicht von ~150 000 Da, die eine Halbwertszeit von circa 20 Tagen besitzen und so über längere Zeit in den Tumor penetrieren können (Imamura et al. 2019). Auch Modifikationen wie das Einführen von Hapten oder PNE-Tags können die Halbwertszeit des CAR-Adapter beeinflussen. Dies kann in einer schnelleren Eliminierung oder eine unerwünschte Anreicherung der CAR-Adapter resultieren (Imamura et al. 2019). Das Einführen der P329G Mutation hat keinen bisher bekannten Einfluss auf die Halbwertszeit des IgG1 (Schlothauer et al. 2016).

Neben der Verwendung von Hapten oder PNE-modifizierten CAR-Adaptoren, gibt es modCAR-Ansätze, die nicht modifizierten Antikörpern, als CAR-Adapter nutzen. Für diesen Ansatz werden autologe T-Zellen, mit FcγRIII (CD16)-CAR transduziert und mit klinisch validierten Antikörpern wie Rituximab, Trastuzumab oder Mogamulizumab kombiniert (Clemenceau et al. 2006, D'Aloia et al. 2016, Kudo et al. 2014, Ochi et al. 2014, Tanaka et al. 2016). In klinischen Studien von Unum Therapeutics wurde Rituximab mit CD16-CAR-T-Zellen kombiniert, um gegen wiederkehrende, refraktäre B-Zell-Lymphome eingesetzt werden zu können (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03189836, NCT02776813). Auch für solide Tumore könnten CD16-CAR-Zellen in Kombination mit Trastuzumab Anwendung finden (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03680560). Dieser modulare CD16-CAR-Ansatz ist vielversprechend und bietet wie anti-P329G-CAR-T-Zellen die Möglichkeit verschiedene Antikörper „*off-the-shelf*“ mit CAR-T-Zellen zu kombinieren. Durch die niedrige micromolare Affinität des CD16-CAR, können allerdings auch endogene auto-reaktive Antikörper um die CD16-Bindung kompetieren (Minutolo et al. 2019). Dadurch kann es potentiell zur

Zerstörung von gesundem Gewebe und Autoimmunreaktionen kommen (Minutolo et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei CD16-CAR-T-Zellen, die mit steigenden Konzentrationen an Serum IgG inkubiert wurden, eine Inhibierung des Signals zu beobachten war. Die Aktivierung der anti-P329G-CAR-T-Zellen bleibt auch bei supra-physiologischen IgG-Bedingungen unbeeinflusst. Dieser Befund indiziert, dass durch Verwendung der anti-P329G-CAR-T-Zellen eine potentielle Aktivierung in der Peripherie vorgebeugt werden kann, wodurch eine zusätzliche Sicherheit gewährleistet wäre. Ein Vorteil der CD16-CAR-T-Zellen ist allerdings, dass diese mit wildtyp-Fc IgG oder IgG glycomodifizierte Fc-Varianten kombiniert werden können (Rataj et al. 2019). Dies bietet die Möglichkeit, dass durch Präapplikation von beispielsweise Rituximab ein Teil der malignen Zellen, vorab eliminiert werden können. In einem zweiten Schritt kann dann die T-Zell-vermittelte Zellyse durch die CD16-CAR-T-Zellen induziert werden. Diese sequenzielle Verabreichung des CAR-Adapters könnte analog zu FITC-Folat-CAR-Adaptoren, Nebenwirkungen verringern und lebensbedrohliche CRS verhindern (Lee et al. 2019, Ma et al. 2016).

Wichtig zu erwähnen ist auch, dass durch die Verwendung von CAR-Adaptermolekülen die Möglichkeit besteht die Therapie zu unterbrechen ohne die transduzierten T-Zellen zu eliminieren. Hierfür kommen mehrere Optionen infrage, zum einen kann die Infusion des CAR-Adapters unterbrochen werden oder bei einem schnellen Eingreifen können auch nicht funktionale CAR-Adapter gegeben werden, die um die CAR-T-Zell-Bindung kompetieren (Lee et al. 2019). Innerhalb von drei Stunden konnte so die Zytokinausschüttung durch anti-FITC-modCAR-T-Zellen gesenkt werden, wenn das von der FDA zugelassene Natrium Fluorescein (Keerl et al. 2004) verabreicht wurde (Lee et al. 2019).

Letztendlich können so für verschiedene Tumorindikationen die bestmöglichen CAR-Adapter gewählt und kombiniert werden. Dies ermöglicht eine schneller Optimierung der Behandlungsbedingungen, resultiert aber dennoch in einer exzellenten Potenz in vivo, die vergleichbar mit konventionellen CAR-T-Ansätzen ist (Kim et al. 2015, Rodgers et al. 2016). So bieten anti-P329G-CAR-T-Zellen und generell modCAR-T-Zellen letztendlich eine gute Alternative zu konventionellen CAR-T-Zell-Therapien.

5.6 anti-P329G-CAR-T-Zellen erlauben simultanes erkennen verschiedener Antigene

Selten lassen sich Tumore effektiv durch eine monospezifische Therapie behandeln (Bayat Mokhtari et al. 2017). Dies liegt daran, dass Antigene selten einzigartig für den Tumor sind und Antigen-gerichtete Therapien zudem das Entkommen des Tumors begünstigen können (Majzner et al. 2018). Auch bei CAR-T-Zell-Therapien ist das Entkommen des Tumors bekannt und ist meistens auf den Verlust des Tumor-assoziierten Antigens zurückzuführen (Benmebarek et al. 2019, Majzner et al. 2018). Innerhalb des ersten Jahres liegt die Rückfallquote von rezidiven und oder refraktären Patienten, die mit anti-CD19-CAR-T-Zellen behandelt wurden, bei circa 50 % (Zhao et al. 2019). Im Rahmen einer klinischen Phase II Studie, in der Patienten mit der anti-CD19-CAR-T Zell Therapie Kymriah behandelt wurden, sind von 16 rezidiven Fällen 15 als CD19 negativ charakterisiert worden (Maude et al. 2018). Um einem Rezidiv entgegenzuwirken und einem Tumor-Escape vorzubeugen, können bicistronische „*dual-targeting*“ CAR-T-Zellen verwendet werden (Jia et al. 2019). Hierzu gehören beispielsweise CD19 und CD22 (Qin et al. 2018), CD19 und CD20 (Zah et al. 2016), CD19 und CD123 (Qin et al. 2019) oder BCMA und Proliferation indizierender Ligand (APRIL)

(NCT03287804). In einer klinischen Phase I/II Studie bei der die Sicherheit und Wirksamkeit von anti-CD19-anti-CD22-CAR-T-Zellen evaluiert wurde, zeigten vier von sechs Patienten die mit der höchsten Zelldosis ($> 3 \times 10^6/\text{kg}$) behandelt wurden, einen anhaltenden Rückgang der Tumorlast über die Studiendauer (Amrolia J et al. 2018). Dies liefert erste Erkenntnisse, dass CAR-T-Zellen, die mit zwei Antigen-gerichteten Bindern ausgestattet sind (Cartellieri et al. 2016, Hossain et al. 2018), einer Tumor Flucht entgegenwirken und den Erfolg der Therapie steigern (Ruella et al. 2016, Schultz et al. 2018). Auf molekularer Ebene weißt dieser Ansatz allerdings Limitationen auf (Lam et al. 2020). Die Größe des Transfervectors kann nicht beliebig vergrößert werden, da mit zunehmender Komplexität der CAR-Konstrukte auch die Viruspartikelproduktion und die spätere, korrekte Expression in primären T-Zellen erschwert ist (Kumar et al. 2001, Lam et al. 2020). Kumar et al. haben gezeigt, dass ein kleineres Vektorkonstrukt zu einem erhöhten viralen Titer führt, welcher wiederum in einer verbesserten Transduktionsrate resultieren kann (Kumar et al. 2001).

Eine potentielle Option dieses Problem zu umgehen, ist die sequenzielle Verabreichung von anti-CD19-CAR-T-Zellen und anti-CD22-CAR-T-Zellen (Gardner et al. 2018, Huang et al. 2018). Dies wurde bereit in klinischen Studien untersucht, erfordert allerdings deutlichen Mehraufwand und ist mit gesteigerten Qualitätskontrollen und erhöhten Kosten verbunden (Chinese Clinical Trial Registry Nummer ChiCTR-OPN-16008526); (NCT03330691). Daher bieten modCAR-Systeme eine gute Alternative, um simultan mehrere Antigene zu binden(Cho et al. 2018). Um einem *Tumor-Escape* vorzubeugen, kann eine Kombination aus mehreren CAR-Adaptoren verwendet werden (Caratelli et al. 2017, Sartore-Bianchi et al. 2016) oder bispezifische CAR-Adapter (Lee et al. 2019), die simultan gegen unterschiedliche Targets gerichtet sind. Cartellieri et al. haben ein bispezifischen scFv-basiertes CAR-Adaptermolekül designet, welches es ermöglicht CD123 und CD33 simultan zu binden. Beide scFv sind über ein 5B9-Tag verbunden, welches von anti-5B9-CAR-T-Zellen erkannt werden kann (Cartellieri et al. 2016). Durch den Vergleich des bispezifischen CAR-Adapter mit einem Ansatz, in dem simultan anti-CD123 und anti-CD33 Adapter in äquimolaren Konzentrationen verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des bispezifischen CAR-Adapters eine verbesserte Targetzellyse aufweist (Cartellieri et al. 2016). Cartellieri et al. schlussfolgerten daraus, dass zwei monospezifische CAR-Adapter die Fähigkeit der modCAR-T-Zellen Target-Lyse zu induzieren, inhibieren könnte (Caratelli et al. 2017). Auch anti-P329G-CAR-T-Zellen, könnten simultan mit verschiedenen CAR-Adaptoren kombiniert werden um einen synergistischen Effekt auf die Tumorzellyse zu haben. Möglich wäre allerdings auch, dass sich die unterschiedlichen CAR-Adapter gegenseitigen inhibieren, wie von Cartellieri et al postuliert wurde (Cartellieri et al. 2016).

Um zukünftig eine sichere Behandlung von Patienten zu gewährleisten, müsste dies für die jeweiligen Tumorantigene und CAR-Adapter im Einzelfall evaluiert werden (Ma et al. 2016, Urbanska et al. 2012). Dabei ist sowohl das Expressionslevel des Tumortargets als auch die Affinität des CAR-Adapters zum Tumorantigen beziehungsweise zum CAR selbst zu berücksichtigen (Lee et al. 2019).

5.7 Das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen entscheidet über erfolgreiche Tumorzelllyse

Um eine erfolgreiche Tumorzelllyse zu induzieren spielt nicht nur die Wahl des CAR-Adapter eine wichtige Rolle, sondern auch die T-Zell-Population. Zum einen ist es notwendig, dass genügend CAR-T-Zellen produziert werden können, zum anderen ist auch das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ CAR-T-Zellen entscheidend für den Erfolg der Therapie (Sommermeyer et al. 2016). Da das Immunsystem aus verschiedenen T-Zell-Subtypen besteht, die verschiedene Effektorfunktion ausführen, wäre es von Vorteil diese Subtypen individuell zu regulieren und geeignete Kombinationen an Zellen zu präselektieren (Cho et al. 2018, Sadelain et al. 2017). Turtle et al. haben beispielsweise gezeigt, dass das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ CAR-T-Zellen eine wichtige Rolle spielt um die anti-Tumorantwort zu verbessern (Turtle et al. 2016). Dies unterstützt auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse, welche zeigen, dass bei einem 2:1 Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen eine verbesserte Tumorzelllyse zu beobachten ist. Für weiterführende Versuche, wäre es interessant das Verhältnisse von CD4⁺ und CD8⁺ zu standardisieren um potentielle Effekte besser beobachten zu können.

Sommermeyer et al. haben gezeigt, dass die Potenz von anti-CD19-CAR-T-Zellen nicht nur durch die CD8⁺ und CD4⁺ Ratio moduliert werden kann, sondern auch durch die Zusammensetzung verschiedener T-Zell-Subtypen synergistische Effekte erzielt werden können (Sommermeyer et al. 2016). Dabei wiesen anti-CD19-CAR-T-Zellen mit einem zentralen Gedächtnisphänotypen (CM) eine höhere Proliferationsrate und eine verlängerte Lebensdauer auf als transduzierte naive CAR-T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ CM und naive anti-CD19-CAR-T-Zellen proliferativer und potenter waren als jene CAR-T-Zellen die dem Effektor Gedächtnis Subtyp angehören. Die effektivste Tumorzell-Lyse wurde durch Kombinieren von CD8⁺ CM CAR-T-Zellen mit CD4⁺ nativen CAR-T-Zellen erreicht (Sommermeyer et al. 2016) Basierend darauf wurde eine klinische Studie initiiert (NCT01865617). Zurzeit wird ein weiteres anti-CD19-CAR-T-Zell-Produkt getestet (Lisocabtagene maraleucel) getestet, das für die Behandlung von wiederkehrendem oder refraktärem aggressivem B-Zell NHL, verwendet werden könnte ((NCT02631044)). Hierbei wird eine standardisierte Zusammensetzung aus CD8⁺ und CD4⁺ CAR-T-Zellen verabreicht. Bisher wurde zwar ein dauerhaftes Ansprechen auf die Therapie verzeichnet, es bleibt allerdings abzuwarten wie groß der klinische Vorteil tatsächlich ist (Abramson et al. 2018). Weiterhin wäre es denkbar CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen gesondert zu aktivieren oder inhibieren um die Effektivität der CAR-T-Zell-Therapie weiter zu erhöhen (Cho et al. 2018). Cho et al. entwickelten eine geteilte, universelle und programmierbare „SUPRA“ CAR-T-Zell-Plattform, basierend auf scFv-Adaptermolekülen. Durch das Verwenden eines modCAR in Kombination mit diesen scFv-Adaptoren ist ein orthogonales kontrollieren von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellsubtypen möglich (Cho et al. 2018).

Derzeitige CAR-T-Zell-Therapien werden patientenspezifisch durch Transduktion autologer T-Zellen hergestellt. In Folge von vorausgegangene Therapien besitzen manche Patienten eine dezimierte T-Zellpopulation und es gelingt nicht immer genügend CAR-T-Zellen für den adoptiven Transfer herzustellen. Um dieses Problem zu umgehen, arbeiten einige Gruppen daran, durch Destruktion der konstanten Regionen

des TCR (Ren et al. 2017) oder des HLA-A Locus (Torikai et al. 2013), antigenspezifische CAR-T-Zellen von allogenen, gesunden Spendern herzustellen (Eyquem et al. 2017, Ren et al. 2017). Das Potential allogener anti-CD19-CAR-T-Zellen wird derzeit in mehreren klinischen Studien untersucht (NCT03166878, NCT03229876, NCT02808442 und NCT02746952). Erste Erfolge wurden von Qasim et al berichtet, bei denen zwei Neugeborenen, erfolgreich mit allogenen anti-CD19-CAR-T-Zellen behandelt wurden (Qasim et al. 2017). Bei weitem ist diese Technologie noch nicht ausgereift und benötigt unterstützende Medikationen für den therapeutischen Erfolg, wie die Verwendung von Lympho-depletierenden Medikamenten. Außerdem birgt diese weitere Risiken wie Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (Qasim et al. 2017). Dennoch könnten allogene T-Zellen und präselektierte Kombination aus CD4⁺ und CD8⁺ Populationen ein optimiertes Behandeln von Tumoren ermöglichen, welches effizienter wirksam ist aber deutlich geringere Nebenwirkungen besetzt.

5.8 Ausblick und weiterführende Anwendungen des anti-P329G-CAR

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine modulare anti-P329G-CAR-T-Zell-Plattform zu entwickeln, die vielseitig und flexibel Anwendung finden kann. Im ersten Teil der Arbeit wurde ein anti-P329G-CAR-J-Reporterassay entwickelt, der es ermöglicht IgG1 Antikörper mit P329G Mutation zu selektieren. Um diese anti-P329G-CAR-Reporterzellen auch für andere Anwendungen zu nutzen, könnten diese zukünftig mit bekannten IgG1-Adapter kombiniert werden. Dies ermöglicht beispielsweise die Detektion von Antigenen auf Tumorzelllinien oder Patientenmaterial. Der Vorteil der Luziferase basierten anti-P329G-CAR-J-Zellen ist, das sie auch bei einer geringen Targetzellzahl, wie beispielsweise bei Tumorbiopsien, ein ausreichendes Signal liefern, welches im FACS möglicherweise nicht immer zuverlässig detektiert werden kann (Darowski et al. 2019). So könnten die anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen als Alternative zu durchflusszytometrischen Analysen auch in der Diagnostik Anwendung finden (Darowski et al. 2019).

Für die Weiterentwicklung des anti-P329G-CAR für den adoptiven-T-Zell-Transfer könnten als konkrete nächste Schritte *in vivo* Studien durchgeführt werden um Aufschluss über die Potenz und das Zytokinsekretionsprofil der anti-P329G-CAR-T-Zellen zu bekommen. Weiterführend sollte über Maßnahmen nachgedacht werden, die eine Transduktion allogener CAR-T-Zellen zulassen. Derzeitige CAR-T-Tell-Therapien werden patientenspezifisch durch Transduktion autologer T-Zellen hergestellt. Diese individuelle Herstellung der Therapie ist zeit- und kostenintensiv und benötigt eine ausgeklügelte Infrastruktur (Harrison et al. 2019). Um dieses Problem zu umgehen, arbeiten einige Gruppen daran, durch Destruktion der konstanten Regionen des TCR (Ren et al. 2017) oder des HLA-A Locus (Torikai et al. 2013), antigenspezifische CAR-T-Zellen von allogenen, gesunden Spendern herzustellen (Ren et al. 2017, Eyquem et al. 2017). Zukünftig könnte die Kombination aus universellen-CAR-T-Zellen transduziert mit einem anti-P329G-CAR eine flexibles und potenziell kostengünstigeres „*off-the-shelf*“ Therapeutikum ermöglichen.

Ein weiterer Punkt der noch zu adressieren bleibt, ist die Behandlung solider Tumore. Solide Tumore weisen eine hohe Antigen-Heterogenität auf und sind daher nur schwer mit Monotherapien zu behandeln (Tokarew et al. 2019). Außerdem sind solide Tumore durch ein immunsuppressives Milieu gekennzeichnet und oft von einer extrazellulären-Matrix-Barrieren abgegrenzt (Poltavets et al. 2018). Dadurch ist das Vordringen der

CAR-T-Zellen in dem Tumor erschwert und die Proliferation und Überlebensfähigkeit sowie deren Effektorfunktionen stark einschränkt (Lesch et al. 2019). Eine lokale Verabreichung der CAR-T-Zellen, direkt in den Tumor ist selten möglich, weshalb Strategien entwickelt werden, die es den CAR-T-Zellen ermöglichen in das immunsuppressive Tumormilieu vorzudringen. Hierfür können CAR-T-Zellen beispielsweise mit extrazellulären Matrix-degradierenden Proteasen (Caruana et al. 2015) oder Chemokinrezeptoren transduziert werden (Kobold et al. 2015). Diese fördern nicht nur die Tumordinfiltration sondern auch intratumorales Überleben (Jin et al. 2019, Kobold et al. 2015). Weitere Ansätze können auch das umkehren von immuninhibitorischen (Kruger et al. 2019) Signale in immunaktivierende Signale sein, wie bei einem PD-1-CD28 Fusionsproteinen mit aktivierender intrazellulären Domänen (Rataj et al. 2018). Um die anti-P329G-CAR-T-Zell-Plattform auch für solide Tumore zugänglicher zu machen, könnten Chemokinrezeptoren oder PD1-CD28 Fusionsproteine ko-transduziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass modCAR-T-Zellen, einschließlich anti-P329G-CAR-T-Zellen die Basis für die nächste Generation des Adoptiven T-Zelltransfers bereiten. Die modulare anti-P329G-CAR-Plattform ermöglicht, es die Aktivität der CAR-T-Zellen flexibel zu regulieren und mehrere Tumorantigene simultan zu erkennen (Feldmann et al. 2019, Minutolo et al. 2019). Vershen mit weiteren Modifikationen besitzen anti-P329G-CAR-Zellen, das Potential zukünftig zur Behandlung solider Tumore eingesetzt zu werden.

6 Zusammenfassung

In der Behandlung von refraktären, malignen hämatologischen Erkrankungen konnten Therapien mit CAR-T-Zellen vielversprechende Erfolge erzielen. Allerdings sind diese noch mit starken Nebenwirkungen behaftet. Solche konventionellen CAR-T-Zellen sind direkt gegen das Tumorantigen gerichtet. Nach Binden des CAR an das Antigen kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse und zur Induktion der Tumorzelllyse. Um Nebenwirkungen zu mildern und eine flexible Antigenerkennung zu ermöglichen, werden kontinuierlich neue CAR-T-Ansätze entwickelt. Einer dieser Ansätze sind modulare CAR-T-Zellen (modCAR-T-Zellen). Diese erkennen das Tumorantigen nicht direkt, sondern binden stattdessen an ein tumorspezifisches CAR-Adaptermolekül. Dadurch lässt sich die immunologische Synapse flexibler modulieren. Ziel dieser Arbeit war es, eine neue modCAR-T-Zell-Plattform zu entwickeln und dafür IgG1-Antikörper mit P329G LALA Mutation zu verwenden. Diese bereits klinisch validierten P329G, LALA Mutationen haben zur Folge, dass Antikörper keine Fc- γ R abhängige zellvermittelte Zytotoxizität induzieren und führen außerdem zur Inhibierung der Interaktion mit dem Komplement Protein C1q.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden scFv- und Fab-basierte CAR konstruiert, die P329G mutierte IgG1 Antikörper erkennen. Anschließend wurde eine Jurkat-NFAT-Luziferase-Reporterzelllinie mit den jeweiligen anti-P329G-CAR transduziert (anti-P329G-CAR-J). Diese anti-P329G-CAR-J-Reporterzellen wurden durch verschiedenen Versuche validiert, wobei gezeigt werden konnte, dass diese als robustes und flexible Screening-Werkzeug verwendet werden können, um therapeutisch wirksame Antikörper im IgG1-Format zu selektieren. Die Eigenschaften der getesteten Antikörper waren dabei prädiktiv für die Funktionalität dieser Binder, wenn sie in ein 2+1-TCB-Format konvertiert wurden. Der zweite Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die Übertragbarkeit und die Anwendung des anti-P329G-CAR im scFv-Format in primären T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass anti-P329G-CAR-T-Zellen nur in Anwesenheit eines Tumorantigen-spezifischen IgG1 mit P329G Mutation die Targetzelllyse induzieren und frühe T-Zell Aktivierungsmarker hochreguliert werden. Die erfolgreiche Targetzelllyse ist dabei abhängig von der Dosis des eingesetzten Antikörpers, dem Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ anti-P329G-CAR-T-Zellen, sowie dem Effektor- zu Targetzell-Verhältnis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine anti-P329G-CAR-T-Zell-Plattform entwickelt wurde, die ein effizientes Selektieren therapeutischer Antikörper ermöglicht. In Kombination mit primären anti-P329G-CAR-T-Zellen können diese Antikörper als CAR-Adapter für die Tumorthapie genutzt werden. Durch Dosierung und eine flexible Kombination an CAR-Adaptoren können potentielle Nebenwirkungen verringert und mehrere Tumorantigene gleichzeitig adressiert werden. Eine Kombination des universellen anti-P329G-CAR mit allogenen T-Zellen könnte einen „*off-the-shelf*“-Ansatz ermöglichen.

7 Summary

CAR-T cell therapies have proven efficacy for the treatment of refractory hematological malignancies, but still are accompanied by severe side effects. In those conventional CAR-T cells the immunological synapse is established by direct interaction of CAR and membrane-bound target. Aiming to overcome these side effects and enhance the flexibility of antigen targeting, novel CAR-T cell approaches have been recently developed. Those modular CAR-T cells (modCAR-T cells) do not recognize the tumor antigen directly but instead bind to a CAR-adaptor. This CAR-adaptor establishes crosslinking between target and effector cells, resulting in the activation of the engineered T cells. The aim of this work was to develop a novel modCAR-T cell platform, making use of antibodies as CAR-adaptor. In this case, the CAR-adaptor are IgG1 antibodies that possess an Fc-part with P329G LALA mutations. Those mutations render the antibody immune effector silent by abolishing FcγR and C1q binding and have been clinically validated for several drug candidates.

In the first part of this thesis scFv- and Fab-CAR recognizing the P329G mutation were designed and used to transduce Jurkat-NFAT-luciferase reporter cells (anti-P329G-CAR-J). These anti-P329G-CAR-J cells were validated as flexible and robust screening tool for the identification and characterization of therapeutic antibodies in an IgG1 format. Dose-dependent luciferase signal could be detected if the respective antibody acts as CAR-adaptor between tumor target and P329G-CAR-J cells. Notably, it could be demonstrated that functional characteristics of the P329G IgG1 antibody candidates were predictive for the functionality of these antibodies upon conversion into in the 2+1 T cell bispecific antibody format.

The second part of this work focused on using the anti-P329G-CAR-scFv in primary T cells. In combination with respective, target bound P329G-CAR-adaptor, anti-P329G-CAR-T cells showed upregulation of early activation marker. Furthermore, anti-P329G-CAR-T-cells mediated potent and specific tumor cell killing when respective antigen bound P329G-CAR-adaptor were used. The ability to lyse Tumor cells was also dependent on the ratio of CD8⁺ und CD4⁺ anti-P329G-CAR-T cells.

In summary, the work aimed to establish an anti-P329G-CAR-T platform, which can be used to screen for potential antibody drug candidates and apply them to mediate potent tumor cell lysis. Importantly, the combination of these anti-P329G-CAR-T cells and respective P329G LALA-based antibodies offers a flexible and individualized treatment option. It is applicable for a broad range of tumor types allowing to target multiple antigens simultaneously with the goal to prevent tumor escape mechanisms. It is also worth mentioning, that combining the P329G-CAR with allogeneic T cells may provide a truly off-the-shelf-CAR-T cell therapy approach.

8 Abkürzungsverzeichnis mit Glossar

°C	Grad Celsius
A	Aminosäure Alanin
ACT	„Adoptive cell therapy“, Adoptiver T-Zell-Transfer
ADA	anti-Drug-Antikörper
AED	Extrazelluläre Antigenerkennungsdomäne
ATCC	„American Type Culture Collection“ [Zellbank]
C1q	Proteinkomplex des Komplementsystems
CAR	„Chimeric antigen receptor“, chimärer Antigen-Rezeptor; [Rezeptor, welcher aus einer variablen Einzelkette eines Antikörpers (extrazellulär) und einer T-Zellrezeptorspezifischen Signaldomäne (CD3zeta Kette, intrazellulär) aufgebaut ist. Fakultativ können zusätzlich kostimulatorische intrazelluläre Domänen vorhanden sein.]
CD	„Cluster of differentiation“, Markerprotein zytotoxischer T-Zellen. [Ko-Rezeptor für den TCR]
CRS	„Cytokine release syndrom“, [Nebenwirkungen, induziert durch Freisetzen von Zytokinen]
E:T	Effektor zu Targetzell-Verhältnis
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
Fab	„Antigen-binding fragment“, Antigen-bindendes Fragment
Fas-L	FAS-Ligand, [type-II transmembrane protein und bindet an FAS]
FITC	Fluorescein isothiocyanate [Fluorochrom]
Fc	„Fragment crystallizable“ [Fragment eines Antikörpers]
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor
FOLR1	Folat-Rezeptor-1, synonym Folat-Rezeptor-α
G	Aminosäure Glycin
GM-CSF	Makrophagen-Kolonie Stimulierungsfaktor, [Zytokin]
GvHD	„Graft versus host disease“, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion
HC	„heavy chain“ [Schwere Kette eines Antikörpers]
HeLa	Menschliche Epithelzelle einer Zervixkarzinoms benannt nach der Frau Henrietta Lacks, der diese Zellen entnommen wurden
HER2	„human epidermal growth factor receptor 2“, [Tumorantigen]
ICD	Intrazelluläre Signaldomäne
IFN-γ	Interferon gamma, [Zytokin]
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
L	Aminosäure Leucin
LALA	Substitution von Leucin zu Alanin an den Positionen 234 und 235 der schweren IgG1-Kette
LC	„Light chain“, Leichte Kette eines Antikörpers
MAS	Makrophagen-Aktivierungssyndrom Nebenwirkungen die bei adoptiven T-Zell-Transfer auftreten können
MHC	„major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
TLS	Tumor-Lyse-Syndrom
modCAR-T-Zellen	Modulare Chimäre antigenrezeptor transduzierte T-Zellen
NFAT	„Nuclear Factor of Activated T cells“, nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen. [Transkriptionsfaktor, welcher in Abhängigkeit von einem T-Zellrezeptorsignal in den Zellkern transloziert und abhängige Promotoren aktiviert]
nM	Nanomolar
P	Aminosäure Prolin
P329G	Prolin wurde an der Position 329 mit Glycin substituiert der schweren IgG1 Kette
PBS	„Phosphate-Buffered Saline“, Phosphat-gepufferte Saline
RLI	Relative Lichteinheiten
scFv	„single chain fragment variable“, Variable Teile von IgG Einzelketten
SPR	Oberflächenresonanzspektroskopie
TMD	Transmembrandomäne
TNF-α	„Tumor necrosis factor alpha“ [Zytokin]
TCR	T-Zell-Rezeptor
USA	„United states of America“, Vereinigte Staaten von Amerika
VH	„Variable heavy chain“, Variable Region der schweren Kette
VL	„Variable light chain“, Variable Region der leichten Kette

9 Literaturverzeichnis

Abraham RT, Weiss A.

Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm.
Nat Rev Immunol 2004;4:301-8.

Abramson JS, Gordon LI, Palomba ML, Lunning MA, Arnason JE, Forero-Torres A, Wang M, Maloney DG, Sehgal A, Andreadis C, Purev E, Solomon SR, Ghosh N, Albertson TM, Xie B, Garcia J, Siddiqi T.

Updated safety and long term clinical outcomes in transcend nhl 001, pivotal trial of lisocabtagene maraleucel (jcar017) in r/r aggressive nhl.
Journal of Clinical Oncology 2018;36:7505-.

Albert S, Arndt C, Feldmann A, Bergmann R, Bachmann D, Koristka S, Ludwig F, Ziller-Walter P, Kegler A, Gartner S, Schmitz M, Ehninger A, Cartellieri M, Ehninger G, Pietzsch HJ, Pietzsch J, Steinbach J, Bachmann M.

A novel nanobody-based target module for retargeting of t lymphocytes to egfr-expressing cancer cells via the modular unicar platform.

Oncoimmunology 2017;6:e1287246.

Ali S, Kjekken R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, Moltu K, Bremnes B, Gronevik E, Muusse M, Hakonsen GD, Skibeli V, Kalland ME, Wang I, Buajordet I, Urbaniak A, Johnston J, Rantell K, Kerwash E, Schuessler-Lenz M, Salmonson T, Bergh J, Gisselbrecht C, Tzogani K, Papadouli I, Pignatti F.

The european medicines agency review of kymriah (tisagenlecleucel) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and diffuse large b-cell lymphoma.

Oncologist 2019;10.1634/theoncologist.2019-0233.

Alonso-Camino V, Sanchez-Martin D, Compte M, Nunez-Prado N, Diaz RM, Vile R, Alvarez-Vallina L.

Carbodies: Human antibodies against cell surface tumor antigens selected from repertoires displayed on T-cell chimeric antigen receptors.

Mol Ther Nucleic Acids 2013;2:e93.

Alonso-Camino V, Sanchez-Martin D, Compte M, Sanz L, Alvarez-Vallina L.

Lymphocyte display: A novel antibody selection platform based on T-cell activation.

PLoS One 2009;4:e7174.

Amrolia J, Wynn R, Hough R, Vora A, Bonney D, Veys P, Rao K, Chiesa R, AlHajj M, Cordoba SP, Onuoha S, Kotsopoulou E, Khokhar NZ, Pule M, VGR P.

Simultaneous targeting of CD19 and CD22: Phase I study of auto3, a bicistronic chimeric antigen receptor (car) t-cell therapy, in pediatric patients with relapsed/refractory b-cell acute lymphoblastic leukemia (r/r b-all): Amelia study.

Blood 2018;132.

Bacac M, Fauti T, Sam J, Colombetti S, Weinzierl T, Ouaret D, Bodmer W, Lehmann S, Hofer T, Hosse RJ, Moessner E, Ast O, Bruenker P, Grau-Richards S, Schaller T, Seidl A, Gerdes C, Perro M, Nicolini V, Steinhoff N, Dudal S, Neumann S, von Hirschheydt T, Jaeger C, Saro J, Karanikas V, Klein C, Umana P.

A novel carcinoembryonic antigen t-cell bispecific antibody (cea tcb) for the treatment of solid tumors.

Clin Cancer Res 2016;22:3286-97.

Bacac M, Klein C, Umana P.

CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T-cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors.

Oncoimmunology 2016;5:e1203498.

Bachmann M.

The uniCAR system: A modular CAR T-cell approach to improve the safety of CAR T-cells.

Immunol Lett 2019;211:13-22.

Bartelt RR, Cruz-Orcutt N, Collins M, Houtman JC.

Comparison of T-cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T-cells.

PLoS One 2009;4:e5430.

Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H.

Combination therapy in combating cancer.

Oncotarget 2017;8:38022-43.

Benedict CA, MacKrell AJ, Anderson WF.

Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay.

J Immunol Methods 1997;201:223-31.

Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S.

Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T-cells.

Int J Mol Sci 2019;20.

Bishop MR, Maziarz RT, Waller EK, Jäger U, Westin JR, McGuirk JP, Fleury I, Holte H, Borchmann P, Del Corral C, Tiwari R, Anak Ö, Awasthi R, Pacaud L, Romanov VV, Schuster SJ.
Tisagenlecleucel in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma patients without measurable disease at infusion.
Blood advances 2019;3:2230-6.

Brinkmann U, Darowski D, Dickopf S., Jost C, Klein C, inventors;
Specificity for novel target antigen binding moieties patent
2019 09/2019

Brinkmann U, Kontermann RE.
The making of bispecific antibodies.
MAbs 2017;9:182-212.

Brudno JN, Kochenderfer JN.
Toxicities of chimeric antigen receptor T-cells: Recognition and management.
Blood 2016;127:3321-30.

Brunker P, Wartha K, Friess T, Grau-Richards S, Waldhauer I, Koller CF, Weiser B, Majety M, Runza V, Niu H, Packman K, Feng N, Daouti S, Hosse RJ, Mossner E, Weber TG, Herting F, Scheuer W, Sade H, Shao C, Liu B, Wang P, Xu G, Vega-Harring S, Klein C, Bosslet K, Umana P.
Rg7386, a novel tetravalent FAP-DR5 antibody, effectively triggers FAP-dependent, avidity-driven dr5 hyperclustering and tumor cell apoptosis.
Mol Cancer Ther 2016;15:946-57.

Budde LE, Berger C, Lin Y, Wang J, Lin X, Frayo SE, Brouns SA, Spencer DM, Till BG, Jensen MC, Riddell SR, Press OW.
Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T-cell adoptive immunotherapy for lymphoma.
PLoS One 2013;8:e82742.

Caratelli S, Sconocchia T, Arriga R, Coppola A, Lanzilli G, Lauro D, Venditti A, Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Ferrone S, Sconocchia G.
Fcγγamma chimeric receptor-engineered T-cells: Methodology, advantages, limitations, and clinical relevance.
Front Immunol 2017;8:457.

Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, Gress RE, Hakim FT, Kochenderfer JN.
B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma.
Clin Cancer Res 2013;19:2048-60.

Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, von Bonin M, Bejestani EP, Ehninger G, Bachmann MP.
Switching CAR T-cells on and off: A novel modular platform for retargeting of T-cells to aml blasts.
Blood Cancer J 2016;6:e458.

Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, Ittmann MM, Marchetti D, Dotti G.
Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes.
Nat Med 2015;21:524-9.

Caruso HG, Hurton LV, Najjar A, Rushworth D, Ang S, Olivares S, Mi T, Switzer K, Singh H, Huls H, Lee DA, Heimberger AB, Champlin RE, Cooper LJ.
Tuning sensitivity of CAR to egfr density limits recognition of normal tissue while maintaining potent antitumor activity.
Cancer Res 2015;75:3505-18.

Chaganti LK, Venkatakrishnan N, Bose K.
An efficient method for FITC labelling of proteins using tandem affinity purification.
Bioscience reports 2018;38:BSR20181764.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL.
Shp-1 and shp-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T-cell stimulation, but only receptor ligation prevents T-cell activation.
J Immunol 2004;173:945-54.

Chen X, Song X, Li K, Zhang T.
Fcγγammabinding is an important functional attribute for immune checkpoint antibodies in cancer immunotherapy.
Front Immunol 2019;10:292.

Chmielewski M, Abken H.
CAR T-cells transform to trucks: Chimeric antigen receptor-redirectioned T-cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer.

Cancer Immunol Immunother 2012;61:1269-77.

Chmielewski M, Abken H.
Trucks: The fourth generation of CARs.
Expert Opin Biol Ther 2015;15:1145-54.

Cho JH, Collins JJ, Wong WW.
Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T-cell responses.
Cell 2018;173:1426-38.e11.

Chu W, Zhou Y, Tang Q, Wang M, Ji Y, Yan J, Yin D, Zhang S, Lu H, Shen J.
Bi-specific ligand-controlled chimeric antigen receptor T-cell therapy for non-small cell lung cancer.
Biosci Trends 2018;12:298-308.

Clemenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, Vie H.
Antibody-dependent T-cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes.
Blood 2006;107:4669-77.

Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ.
Chimeric antigen receptors for T-cell immunotherapy: Current understanding and future directions.
J Gene Med 2012;14:405-15.

D'Aloia MM, Caratelli S, Palumbo C, Battella S, Arriga R, Lauro D, Palmieri G, Sconocchia G, Alimandi M.
T lymphocytes engineered to express a CD16-chimeric antigen receptor redirect T-cell immune responses against immunoglobulin G-opsonized target T-cells.
Cytotherapy 2016;18:278-90.

Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanan F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, Diaz R, Avezum A, Oliveira GBF, Wielgosz A, Parambath SR, Mony P, Alhabib KF, Temizhan A, Ismail N, Chifamba J, Yeates K, Khatib R, Rahman O, Zatonka K, Kazmi K, Wei L, Zhu J, Rosengren A, Vijayakumar K, Kaur M, Mohan V, Yusufali A, Kelishadi R, Teo KK, Joseph P, Yusuf S.
Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): A prospective cohort study.
Lancet 2019;10.1016/s0140-6736(19)32007-0.

Darowski D, Delon C, Hanisch L, Jost C, Klein C, Moessner E, Pulko V, Xu W, inventors;
Diagnostic assays to detect tumor antigens in cancer patients patent
2019.

Darowski D, Delon C, Hanisch L, Jost C, Klein C, Moessner E, Pulko V, Xu W, inventors;
Universal reporter cell assay for specificity test of novel antigen binding moieties patent
WO 2019/122046 2019 27.06.2019.

Darowski D, Jost C, Stubenrauch K, Wessels U, Benz J, Ehler A, Freimoser-Grundschober A, Brünker P, Mössner E, Umaña P, Kobold S, Klein C.
P329g-CAR-J: A novel Jurkat-nfat-based CAR-T reporter system recognizing the p329g fc mutation.
Protein Engineering, Design and Selection 2019;10.1093/protein/gzz027.

Darowski D, Kobold S, Jost C, Klein C.
Combining the best of two worlds: Highly flexible chimeric antigen receptor adaptor molecules (CAR-adaptors) for the recruitment of chimeric antigen receptor T-cells.
MAbs 2019;11:621-31.

Davenport AJ, Cross RS, Watson KA, Liao Y, Shi W, Prince HM, Beavis PA, Trapani JA, Kershaw MH, Ritchie DS, Darcy PK, Neeson PJ, Jenkins MR.
Chimeric antigen receptor T-cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity.
Proc Natl Acad Sci U S A 2018;115:E2068-e76.

Dinel MP, Tartaglia S, Wallace GQ, Boudreau D, Masson JF, Polo F.
The fundamentals of real-time surface plasmon resonance/electrogenerated chemiluminescence.
Angew Chem Int Ed Engl 2019;58:18202-6.

Duan H, Huang H, Jing G.
An antibody Fab fragment-based chimeric antigen receptor could efficiently eliminate human thyroid cancer cells.
J Cancer 2019;10:1890-5.

Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG.
Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:720-4.

Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJ, Hamieh M, Cunanan KM, Odak A, Gonen M, Sadelain M. Targeting a CAR to the trac locus with CRISPR/CAS9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017;543:113-7.

Faitschuk E, Nagy V, Hombach AA, Abken H. A dual chain chimeric antigen receptor (CAR) in the native antibody format for targeting immune cells towards cancer cells without the need of an scfv. *Gene Ther* 2016;23:718-26.

Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2007;5:127-36.

Kymriah (tisagenlecleucel). FDA, 2018. Volume:Pagesat <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>.)

FDA. Yescarta (axicabtagene ciloleucel). 2018.

Feldmann A, Arndt C, Koristka S, Berndt N, Bergmann R, Bachmann MP. Conventional CARs versus modular CARs. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68:1713-9.

Gardner R, Annesley C, Finney O, Summers C, Lambie AJ, Rivers J, Crews K, Huang L, Brown C, Mgebroff S, Lindgren C, Spratt K, Gustafson J, Johnson A, Park JR, Jensen MC. Early clinical experience of CD19 x CD22 dual specific CAR T-cells for enhanced anti-leukemic targeting of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2018;132:278-.

Garman SC, Wurzburg BA, Tarchevskaya SS, Kinet JP, Jardetzky TS. Structure of the fc fragment of human ige bound to its high-affinity receptor fc epsilon1 alpha. *Nature* 2000;406:259-66.

Giry-Laterrière M, Verhoeven E, Salmon P. Lentiviral vectors. © Springer Science+Business Media:737 Humana Press; 2011.

Gopalakrishnan R, Matta H, Choi S, Natarajan V, Prins R, Gong S, Zenunovic A, Narasappa N, Patel F, Prakash R, Chaudhary V, Sikri V, Chitnis SD, Kochegarov A, Wang D, Falat M, Kahn M, Keerthipati PS, Sharma N, Lenka J, Stieben TM, Braun J, Batra A, Purvis K, Ito K, Lee JH, Jeronimo A, Zamora HM, Membreno A, Qiu Q, Peshin S, Namburu L, Chaudhary PM. A novel luciferase-based assay for the detection of chimeric antigen receptors. *Sci Rep* 2019;9:1957.

Gorovits B, Koren E. Immunogenicity of chimeric antigen receptor T-cell therapeutics. *BioDrugs* 2019;33:275-84.

Ha JH, Kim JE, Kim YS. Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: From design to applications in therapeutic antibodies and proteins. *Front Immunol* 2016;7:394.

Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor-T-cell therapy manufacturing: Modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy* 2019;21:224-33.

Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T-cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med* 2017;9:1183-97.

Herter S, Herting F, Muth G, van Puijenbroek E, Schlothauer T, Ferrara C, Brady K, Lang S, Bacac M, Mossner E, Umana P, Klein C. GA101 P329GLALA, a variant of obinutuzumab with abolished adcc, adcp and CDC function but retained cell death induction, is as efficient as rituximab in b-cell depletion and antitumor activity. *Haematologica* 2018;103:e78-e81.

Hezareh M, Hessell AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW.

Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1.
J Virol 2001;75:12161-8.

Holzinger A, Abken H.
CAR T cells: A snapshot on the growing options to design a CAR.
Hemasphere 2019;3:e172.

Hossain N, Sahaf B, Abramian M, Spiegel JY, Kong K, Kim S, Mavroukakis S, Oak J, Natkunam Y, Meyer EH, Frank MJ, Feldman SA, Long SR, Qin H, Fry TJ, Muffly LS, Mackall CL, Miklos DB.
Phase I experience with a bi-specific CAR targeting CD19 and CD22 in adults with B-cell malignancies.
Blood 2018;132:490-.

Huang L, Wang N, Cao Y, Li C, Xiao Y, Xiao M, Zhou X, Wang G, Hong Z, Zhen M, Meng W, Zhang B, Zhang Y, Marcucci G, Zhang T, Zhou J.
CAR22/19 cocktail therapy for patients with refractory/relapsed B-cell malignancies.
Blood 2018;132:1408-.

Imamura CK.
Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies: Applicability based on their pharmacokinetic properties.
Drug Metab Pharmacokinet 2019;34:14-8.

Jena B, Maiti S, Huls H, Singh H, Lee DA, Champlin RE, Cooper LJ.
Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody to detect CD19-specific T cells in clinical trials.
PLoS One 2013;8:e57838.

Jia H, Wang Z, Wang Y, Liu Y, Dai H, Tong C, Guo Y, Guo B, Ti D, Han X, Yang Q, Wu Z, Han W.
Haploidentical CD19/CD22 bispecific CAR-T cells induced MRD-negative remission in a patient with relapsed and refractory adult b-all after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation.
J Hematol Oncol 2019;12:57.

Jin L, Tao H, Karachi A, Long Y, Hou AY, Na M, Dyson KA, Grippin AJ, Deleyrolle LP, Zhang W, Rajon DA, Wang QJ, Yang JC, Kresak JL, Sayour EJ, Rahman M, Bova FJ, Lin Z, Mitchell DA, Huang J.
CXCR1- or CXCR2-modified CAR T cells co-opt IL-8 for maximal antitumor efficacy in solid tumors.
Nat Commun 2019;10:4016.

Juillerat A, Tkach D, Busser BW, Temburni S, Valton J, Duclert A, Poirot L, Depil S, Duchateau P.
Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch.
BMC Biotechnol 2019;19:44.

Jutz S, Hennig A, Paster W, Asrak O, Dijanovic D, Kellner F, Pickl WF, Huppa JB, Leitner J, Steinberger P.
A cellular platform for the evaluation of immune checkpoint molecules.
Oncotarget 2017;8:64892-906.

Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH.
T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia.
Sci Transl Med 2011;3:95ra73.

Keerl R, Weber RK, Draf W, Wienke A, Schaefer SD.
Use of sodium fluorescein solution for detection of cerebrospinal fluid fistulas: An analysis of 420 administrations and reported complications in Europe and the United States.
Laryngoscope 2004;114:266-72.

Kim MS, Ma JS, Yun H, Cao Y, Kim JY, Chi V, Wang D, Woods A, Sherwood L, Caballero D, Gonzalez J, Schultz PG, Young TS, Kim CH.
Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules.
J Am Chem Soc 2015;137:2832-5.

Klein C, Schaefer W, Regula JT.
The use of crossmab technology for the generation of bi- and multispecific antibodies.
MAbs 2016;8:1010-20.

Klein C, Schaefer W, Regula JT, Dumontet C, Brinkmann U, Bacac M, Umana P.
Engineering therapeutic bispecific antibodies using crossmab technology.
Methods 2019;154:21-31.

Kobold S, Duester P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S.
Immunotherapy in tumors.

Dtsch Arztebl Int 2015;112:809-15.

Kobold S, Pantelyushin S, Rataj F, Vom Berg J.

Rationale for combining bispecific T cell activating antibodies with checkpoint blockade for cancer therapy. *Front Oncol* 2018;8:285.

Koristka S, Ziller-Walter P, Bergmann R, Arndt C, Feldmann A, Kegler A, Cartellieri M, Ehninger A, Ehninger G, Bornhauser M, Bachmann MP.

Anti-CAR-engineered T cells for epitope-based elimination of autologous CAR T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68:1401-15.

Kruger S, Imer M, Kobold S, Cadilha BL, Endres S, Ormanns S, Schuebbe G, Renz BW, D'Haese JG, Schloesser H, Heinemann V, Subklewe M, Boeck S, Werner J, von Bergwelt-Baildon M.

Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:268.

Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, Chng WJ, Campana D.

T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res* 2014;74:93-103.

Kueberuwa G, Kalaitidou M, Cheadle E, Hawkins RE, Gilham DE.

CD19 CAR T cells expressing IL-12 eradicate lymphoma in fully lymphoreplete mice through induction of host immunity. *Mol Ther Oncolytics* 2018;8:41-51.

Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE.

Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001;12:1893-905.

Lam N, Trinklein ND, Buelow B, Patterson GH, Ojha N, Kochenderfer JN.

Anti-bcma chimeric antigen receptors with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains. *Nat Commun* 2020;11:283.

Leabman MK, Meng YG, Kelley RF, DeForge LE, Cowan KJ, Iyer S.

Effects of altered Fc-gamma binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *MAbs* 2013;5:896-903.

Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, Grupp SA, Mackall CL.

Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124:188-95.

Lee MJ, Woo MY, Chwae YJ, Kwon MH, Kim K, Park S.

Down-regulation of interleukin-2 production by CD4(+) T cells expressing tim-3 through suppression of nfat dephosphorylation and ap-1 transcription. *Immunobiology* 2012;217:986-95.

Lee YG, Chu H, Lu Y, Leamon CP, Srinivasarao M, Putt KS, Low PS.

Regulation of CAR T cell-mediated cytokine release syndrome-like toxicity using low molecular weight adapters. *Nat Commun* 2019;10:2681.

Lee YG, Marks I, Srinivasarao M, Kanduluru AK, Mahalingam SM, Liu X, Chu H, Low PS.

Use of a single CAR T cell and several bispecific adapters facilitates eradication of multiple antigenically different solid tumors. *Cancer Res* 2019;79:387-96.

88. Lesch S, Benmebarek MR, Cadilha BL, Stoiber S, Subklewe M, Endres S, Kobold S.

Determinants of response and resistance to CAR T cell therapy. *Semin Cancer Biol* 2019;10.1016/j.semcancer.2019.11.004.

89. Levy N, Eiler S, Pradeau-Aubretton K, Maillot B, Stricher F, Ruff M.

Production of unstable proteins through the formation of stable core complexes. *Nat Commun* 2016;7:10932.

Liu D, Zhao J, Song Y.

Engineering switchable and programmable universal CARs for CAR T therapy. *J Hematol Oncol* 2019;12:69.

Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes JM, Zhang Y, Lin YL, Chung S, Dennis MS, Zuchero YJ, Watts RJ, Couch JA, Meng YG, Atwal JK, Brezski RJ, Spiess C, Ernst JA.

Effector-attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice. *J Biol Chem* 2017;292:3900-8.

- Lo Russo G, Moro M, Sommariva M, Cancila V, Boeri M, Centonze G, Ferro S, Ganzinelli M, Gasparini P, Huber V, Milione M, Porcu L, Proto C, Pruneri G, Signorelli D, Sangaletti S, Sfondrini L, Storti C, Tassi E, Bardelli A, Marsoni S, Torri V, Tripodo C, Colombo MP, Anichini A, Rivoltini L, Balsari A, Sozzi G, Garassino MC.
Antibody-Fc/FcR interaction on macrophages as a mechanism for hyperprogressive disease in non-small cell lung cancer subsequent to PD-1/PD-L1 blockade.
Clin Cancer Res 2019;25:989-99.
- Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ.
MSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting.
Oncoimmunology 2017;7:e1368604.
- Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, Kaplan RN, Patterson GH, Fry TJ, Orentas RJ, Mackall CL.
4-1bb costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors.
Nat Med 2015;21:581-90.
- Lund J, Pound JD, Jones PT, Duncan AR, Bentley T, Goodall M, Levine BA, Jefferis R, Winter G.
Multiple binding sites on the ch2 domain of igg for mouse fc gamma r11.
Mol Immunol 1992;29:53-9.
- Ma JS, Kim JY, Kazane SA, Choi SH, Yun HY, Kim MS, Rodgers DT, Pugh HM, Singer O, Sun SB, Fonslow BR, Kochenderfer JN, Wright TM, Schultz PG, Young TS, Kim CH, Cao Y.
Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:E450-8.
- Majzner RG, Mackall CL.
Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy.
Cancer Discov 2018;8:1219-26.
- Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R.
Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (idec-c2b8) in patients with recurrent B-cell lymphoma.
Blood 1994;84:2457-66.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA.
Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia.
N Engl J Med 2018;378:439-48.
- Maus MV, Haas AR, Beatty GL, Albelda SM, Levine BL, Liu X, Zhao Y, Kalos M, June CH.
T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans.
Cancer Immunol Res 2013;1:26-31.
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK.
Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program.
J Clin Oncol 1998;16:2825-33.
- Miller AS, Tejada ML, Gazzano-Santoro H.
Development of an ELISA based bridging assay as a surrogate measure of ADCC.
J Immunol Methods 2012;385:45-50.
- Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr.
The emergence of universal immune receptor T cell therapy for cancer.
Front Oncol 2019;9:176.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA.
Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing erbb2.
Mol Ther 2010;18:843-51.
- Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jager C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schull C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer MJ, Poppema S, Klein C, Umana P.

Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity.
Blood 2010;115:4393-402.

Murphy A, Westwood JA, Teng MW, Moeller M, Darcy PK, Kershaw MH.
Gene modification strategies to induce tumor immunity.
Immunity 2005;22:403-14.

Myburgh R, Cherpin O, Schlaepfer E, Rehrauer H, Speck RF, Krause KH, Salmon P.
Optimization of critical hairpin features allows miRNA-based gene knockdown upon single-copy transduction.
Mol Ther Nucleic Acids 2014;3:e207.

Neelapu SS.
Managing the toxicities of CAR T-cell therapy.
Hematol Oncol 2019;37 Suppl 1:48-52.

Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J, Go WY.
Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma.
N Engl J Med 2017;377:2531-44.

Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Barrett J, Ishii E, Yasukawa M.
Gene-modified human alpha/beta-T cells expressing a chimeric CD16-CD3zeta receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy.
Cancer Immunol Res 2014;2:249-62.

Orlando EJ, Han X, Tribouley C, Wood PA, Leary RJ, Riester M, Levine JE, Qayed M, Grupp SA, Boyer M, De Moerloose B, Nemecek ER, Bittencourt H, Hiramatsu H, Buechner J, Davies SM, Verneris MR, Nguyen K, Brogdon JL, Bitter H, Morrissey M, Pierog P, Pantano S, Engelman JA, Winckler W.
Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia.
Nat Med 2018;24:1504-6.

Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, Quezada SA, Peggs KS, Pule M.
A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy.
Blood 2014;124:1277-87.

Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS.
The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity.
Front Oncol 2018;8:431.

Portell CA, Wenzell CM, Advani AS.
Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of b-cell acute lymphoblastic leukemia.
Clin Pharmacol 2013;5:5-11.

T cell activation bioassay (nfat). Promega, 2020.
Volume:Pages(Accessed 28.01.2020, 2020, at <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/T-cell-activation-bioassay-nfat-protocol.pdf?la=en>.)

Przepiorka D, Ko CW, Deisseroth A, Yancey CL, Candau-Chacon R, Chiu HJ, Gehrke BJ, Gomez-Broughton C, Kane RC, Kirshner S, Mehrotra N, Ricks TK, Schmiel D, Song P, Zhao P, Zhou Q, Farrell AT, Pazdur R.
Fda approval: Blinatumomab.
Clin Cancer Res 2015;21:4035-9.

Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, Butler K, Rivat C, Wright G, Somana K, Ghorashian S, Pinner D, Ahsan G, Gilmour K, Lucchini G, Ingloft S, Mifsud W, Chiesa R, Peggs KS, Chan L, Farzaneh F, Thrasher AJ, Vora A, Pule M, Veys P.
Molecular remission of infant b-all after infusion of universal talen gene-edited CAR T cells.
Sci Transl Med 2017;9.

Qin H, Edwards JP, Zaritskaya L, Gupta A, Mu CJ, Fry TJ, Hilbert DM, LaFleur DW.
Chimeric antigen receptors incorporating d domains targeting CD123 direct potent mono- and bi-specific antitumor activity of T cells.
Mol Ther 2019;27:1262-74.

Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fontaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Haso W, Shern JF, Shah NN, Fry TJ.
Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22.
Mol Ther Oncolytics 2018;11:127-37.

Quintero-Hernandez V, Juarez-Gonzalez VR, Ortiz-Leon M, Sanchez R, Possani LD, Becerril B.
The change of the scfv into the fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies.
Mol Immunol 2007;44:1307-15.

Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD.
The structure of a human type iii fcgamma receptor in complex with fc.
J Biol Chem 2001;276:16469-77.

Rataj F, Jacobi SJ, Stoiber S, Asang F, Ogonek J, Tokarew N, Cadilha BL, van Puijenbroek E, Heise C, Duewell P, Endres S, Klein C, Kobold S.
High-affinity CD16-polymorphism and fc-engineered antibodies enable activity of CD16-chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer therapy.
Br J Cancer 2019;120:79-87.

Rataj F, Kraus FBT, Chaloupka M, Grassmann S, Heise C, Cadilha BL, Duewell P, Endres S, Kobold S.
Pd1-CD28 fusion protein enables CD4+ T cell help for adoptive T cell therapy in models of pancreatic cancer and non-hodgkin lymphoma.
Front Immunol 2018;9:1955.

Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y.
Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to pd1 inhibition.
Clin Cancer Res 2017;23:2255-66.

Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, Schulman A, Du J, Wang F, Singer O, Ma J, Nunez V, Shen J, Woods AK, Wright TM, Schultz PG, Kim CH, Young TS.
Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for b-cell malignancies.
Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:E459-68.

Roskopf S, Leitner J, Paster W, Morton LT, Hagedoorn RS, Steinberger P, Heemskerk MHM.
A jurkat 76 based triple parameter reporter system to evaluate tcr functions and adoptive T cell strategies.
Oncotarget 2018;9:17608-19.

Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, Klichinsky M, Aikawa V, Nazimuddin F, Kozlowski M, Scholler J, Lacey SF, Melenhorst JJ, Morrissette JJ, Christian DA, Hunter CA, Kalos M, Porter DL, June CH, Grupp SA, Gill S.
Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies.
J Clin Invest 2016;126:3814-26.

Sadelain M, Riviere I, Riddell S.
Therapeutic T cell engineering.
Nature 2017;545:423-31.

Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E, Troiani T, Ciardiello F, Racca P, Bertotti A, Siravegna G, Torri V, Amatu A, Ghezzi S, Marrapese G, Palmeri L, Valtorta E, Cassingena A, Lauricella C, Vanzulli A, Regge D, Veronese S, Comoglio PM, Bardelli A, Marsoni S, Siena S.
Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, kras codon 12/13 wild-type, her2-positive metastatic colorectal cancer (heracles): A proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial.
Lancet Oncol 2016;17:738-46.

Scarfo I, Maus MV.
Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: Targeting the tumor microenvironment.
J Immunother Cancer 2017;5:28.

Schlothauer T, Herter S, Koller CF, Grau-Richards S, Steinhart V, Spick C, Kubbies M, Klein C, Umana P, Mossner E.
Novel human igg1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions.
Protein Eng Des Sel 2016;29:457-66.

Schultz LM, Davis KL, Baggott C, Chaudry C, Marcy AC, Mavroukakis S, Sahaf B, Kong KA, Muffly LS, Kim S, Meyer EH, Fry TJ, Qin H, Miklos DB, Mackall CL.
Phase 1 study of CD19/CD22 bispecific chimeric antigen receptor (CAR) therapy in children and young adults with b cell acute lymphoblastic leukemia (all).
Blood 2018;132:898-.

Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K.
Anti-PD-1 and anti-ctla-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations.
Front Oncol 2018;8:86.

NFAT luciferase reporter jurkat stable cell line. 2020.
Volume:Pages(Accessed 1.28.2020, 2020, at <https://www.signosisinc.com/product/nfat-luciferase-reporter-jurkat-stable-cell-line-np>.)

Smits NC, Sentman CL.
Bispecific T-cell engagers (BITEs) as treatment of B-cell lymphoma.
J Clin Oncol 2016;34:1131-3.

Sommermeier D, Hill T, Shamah SM, Salter AI, Chen Y, Mohler KM, Riddell SR.
Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy.
Leukemia 2017;31:2191-9.

Sommermeier D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell SR.
Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo.
Leukemia 2016;30:492-500.

Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U.
The 3.2- α crystal structure of the human IgG1 fc fragment-Fc gammaRIII complex.
Nature 2000;406:267-73.

Spahr C, Gunasekaran K, Walker KW, Shi SDH.
High-resolution mass spectrometry confirms the presence of a hydroxyproline (HYP) post-translational modification in the GGGGp linker of an Fc-fusion protein.
MAbs 2017;9:812-9.

Spiess C, Zhai Q, Carter PJ.
Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies.
Mol Immunol 2015;67:95-106.

Stoiber S, Cadilha BL, Benmehar MR, Lesch S, Endres S, Kobold S.
Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy.
Cells 2019;8.

Strohl WR, Naso M.
Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor (CAR)-T cells as approaches to kill cancer cells.
Antibodies (Basel) 2019;8.

Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Humpe A.
Chimeric antigen receptor T cells: A race to revolutionize cancer therapy.
Transfus Med Hemother 2019;46:15-24.

Sun LL, Ellerman D, Mathieu M, Hristopoulos M, Chen X, Li Y, Yan X, Clark R, Reyes A, Stefanich E, Mai E, Young J, Johnson C, Huseni M, Wang X, Chen Y, Wang P, Wang H, Dybdal N, Chu YW, Chiorazzi N, Scheer JM, Junttila T, Totpal K, Dennis MS, Ebens AJ.
Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of b cell malignancies.
Sci Transl Med 2015;7:287ra70.

Sun S, Hao H, Yang G, Zhang Y, Fu Y.
Immunotherapy with CAR-modified T cells: Toxicities and overcoming strategies.
J Immunol Res 2018;2018:2386187.

Suresh T, Lee LX, Joshi J, Barta SK.
New antibody approaches to lymphoma therapy.
J Hematol Oncol 2014;7:58.

Suzuki M, Kato C, Kato A.
Therapeutic antibodies: Their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies.
J Toxicol Pathol 2015;28:133-9.

Syahir A, Usui K, Tomizaki K-Y, Kajikawa K, Mihara H.
Label and label-free detection techniques for protein microarrays.
Microarrays (Basel, Switzerland) 2015;4:228-44.

Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N.

Development of a cell-based assay measuring the activation of FcγIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies.
PLoS One 2014;9:e95787.

Tanaka H, Fujiwara H, Ochi F, Tanimoto K, Casey N, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Sugiyama T, Barrett AJ, Yasukawa M.
Development of engineered T cells expressing a chimeric CD16-CD3zeta receptor to improve the clinical efficacy of mogamulizumab therapy against adult T-cell leukemia.
Clin Cancer Res 2016;22:4405-16.

Teige I, Mårtensson L, Frendeus BL.
Targeting the antibody checkpoints to enhance cancer immunotherapy—focus on FcγIIb.
Front Immunol 2019;10.

Thakur A, Huang M, Lum LG.
Bispecific antibody based therapeutics: Strengths and challenges.
Blood Rev 2018;32:339-47.

Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S.
Teaching an old dog new tricks: Next-generation CAR T cells.
Br J Cancer 2019;120:26-37.

Tomkowicz B, Walsh E, Cotty A, Verona R, Sabins N, Kaplan F, Santulli-Marotto S, Chin CN, Mooney J, Lingham RB, Naso M, McCabe T.
Tim-3 suppresses anti-CD3/CD28-induced TCR activation and IL-2 expression through the NFAT signaling pathway.
PLoS One 2015;10:e0140694.

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G.
The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of vh segments with different hypervariable loops.
J Mol Biol 1992;227:776-98.

Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, Crossland DL, Huls H, Littman N, Zhang Z, Tykodi SS, Kebriaei P, Lee DA, Miller JC, Rebar EJ, Holmes MC, Jaenisch R, Champlin RE, Gregory PD, Cooper LJ.
Toward eliminating hla class I expression to generate universal cells from allogeneic donors.
Blood 2013;122:1341-9.

Tummers QR, Hoogstins CE, Gaarenstroom KN, de Kroon CD, van Poelgeest MI, Vuyk J, Bosse T, Smit VT, van de Velde CJ, Cohen AF, Low PS, Burggraaf J, Vahrmeijer AL.
Intraoperative imaging of folate receptor alpha positive ovarian and breast cancer using the tumor specific agent ec17.
Oncotarget 2016;7:32144-55.

Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, Robinson E, Steevens NN, Chaney C, Soma L, Chen X, Yeung C, Wood B, Li D, Cao J, Heimfeld S, Jensen MC, Riddell SR, Maloney DG.
CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell all patients.
J Clin Invest 2016;126:2123-38.

Tyagarajan S, Schmitt D, Acker C, Rutjens E.
Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric antigen receptor-T cell manufacture.
Cytotherapy 2019;21:1198-205.

Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, Yu J, Scholler N, Powell DJ, Jr.
A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor.
Cancer Res 2012;72:1844-52.

Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS.
Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library.
Nat Biotechnol 1996;14:309-14.

Weiner LM, Surana R, Wang S.
Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy.
Nat Rev Immunol 2010;10:317-27.

Wessels U, Schick E, Ritter M, Kowalewsky F, Heinrich J, Stubenrauch K.
Novel drug and soluble target tolerant antidrug antibody assay for therapeutic antibodies bearing the P329G mutation.
Bioanalysis 2017;9:849-59.

Wolach O, Stone RM.
Blinatumomab for the treatment of philadelphia chromosome-negative, precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia.

Clin Cancer Res 2015;21:4262-9.

Worn A, Pluckthun A.

Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: Identification, classification, and improvement by protein engineering.

Biochemistry 1999;38:8739-50.

Worthington RE, Carroll RC, Boucheix C.

Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the fc gamma ii receptor.

Br J Haematol 1990;74:216-22.

Yanez L, Sanchez-Escamilla M, Perales MA.

CAR T-cell toxicity: Current management and future directions.

Hemasphere 2019;3:e186.

Yu S, Yi M, Qin S, Wu K.

Next generation chimeric antigen receptor T-cells: Safety strategies to overcome toxicity.

Mol Cancer 2019;18:125.

Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY.

T-cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant b cells.

Cancer Immunol Res 2016;4:498-508.

Zhao J, Song Y, Liu D.

Clinical trials of dual-target CAR T-cells, donor-derived CAR T-cells, and universal CAR T-cells for acute lymphoid leukemia.

J Hematol Oncol 2019;12:17.

Zhao JX, Yang L, Gu ZN, Chen HQ, Tian FW, Chen YQ, Zhang H, Chen W.

Stabilization of the single-chain fragment variable by an interdomain disulfide bond and its effect on antibody affinity.

Int J Mol Sci 2010;12:1-11.

10 Appendix

10.1 Publikationen

Darowski D, Jost C, Stubenrauch K, Wessels U, Benz J, Ehler A, Freimoser-Grundschober A, Brünker P, Mössner E, Umaña P, Kobold S, Klein C. P329G-CAR-J: A novel Jurkat-NFAT-based CAR-T reporter system recognizing the P329G Fc mutation. PEDS, July 2019.

Darowski D, Kobold S, Jost C, Klein C. Combining the best of two worlds: highly flexible chimeric antigen receptor adaptor molecules (CAR-adaptors) for the recruitment of chimeric antigen receptor T cells. mAbs, Juni 2019.

Kuen J, **Darowski D**, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. PLoS One, July 2017.

10.2 Patentanmeldungen

1. **Darowski D**, Delon C, Hanisch L, Jost C, Klein C, Mössner E, Pulko V, Xu, W. Diagnostic Assays to detect tumor antigens in cancer patients. Pub.No.: WO2019192973, Publication Date: 10/2019.
2. **Darowski D**, Delon C, Hanisch L, Jost C, Klein C, Mössner , Pulko V, Xu W. Diagnostic Assays to detect tumor antigens in cancer patients. Pub.No.: WO2019192972, Publication Date: 10/2019.
3. Brinkmann U, **Darowski D**, Dickopf S, Jost C, Klein C. Specificity for novel target antigen binding moieties. Pub.No.: WO/2019/166453. Publication Date: 09/2019
4. **Darowski D**, Delon C, Hanisch L, Jost C, Klein C, Mössner E, Pulko V, Xu W. Universal reporter cell assay for specificity of novel antigen binding moieties. Pub.No.: WO/2019/122046. Publication Date: 6/2019
5. Klein C, Mössner E, Hanisch L, Xu W, Delon C, **Darowski D**, Jost C, Pulko V, CAR-T cell assay for specificity test of novel antigen binding moieties. Pub.No.: WO/2019/122060, Publication Date: 06/2019
6. Klein C, Mössner E, **Darowski D**, Stubenrauch K. Improved antigen binding receptor formats. Pub.No.: WO/2018/177967 Publication Date: 10/2018

7. Stubenrauch K, Mössner E, Klein C, **Darowski D.**

Improved antigen binding receptors.

Pub.No.: WO/2018/177966. Publication Date:10/2018

10.3 Vorträge

Antibodies as Drugs: P329G LALA Mutated Antibodies Enable Precise Redirection of anti-P329G-based Chimeric Antigen Receptor T Cells (P329G-CAR-T cells). Keystone
conference antibodies as drugs, Colorado USA. Date: 04/2019

Novel universal CAR-T cell platform, making use of P329G LALA mutated antibodies.
Genentech San Francisco, USA. Date: 04/2019

CAR-J Reporter Assay a shortcut for identification of lead-binders for TCBs.
One pRED Immunology Assay Day 2018, RICB Basel, Switzerland. Date 09/2018

10.4 Posterpräsentationen

Darowski D. et al. anti-P329G-CAR-T cells as a novel universal CAR-T cell platform.
CAR-TCR-Summit 2020. Date: 02/2020

Darowski D. et al. A novel universal CAR-T cell platform based on the P329G mutation in therapeutic IgG1 antibodies.
ITOC7 Control No. 2020-A-12-ITOC. Date: 04/2020

Darowski D. et al. anti-P329G-CAR-T cells as a novel universal CAR-T cell platform. Submitted
and under review for AACR Abstract # 973. Date: 04/2020

Komuczki J. et al. Specific targeting of self-antigen reactive B cells in autoimmune disorders. Joint RPF/RISE Symposium 2019 Basel Switzerland. Date: 09/2019

Darowski et al. Antibodies as Drugs: P329G LALA mutated antibodies enable precise redirection of anti-P329G-based chimeric antigen receptor T cells (P329G-CAR-T cells). Keystone conference antibodies as drugs, Colorado USA. Date: 04/2019

Delon C. et al. PG LALA CAR T-cell assay: A new screening technology for specificity antibodies.
pRED Oncology Summit, Amsterdam Netherlands. Date: 09/2018

Darowski et al. Engineering a novel next generation T-cell platform for adoptive T-cell therapy PG LALA CAR T-cell assay: A new screening technology for specificity antibodies.
CIT-Summit, Davos Switzerland. Date: 01/2017

10.5 Danksagungen

Einen besonderen Dank möchte ich Christian Klein, Pablo Umaña, Sebastian Kobold und Stefan Endres aussprechen. Danke, dass ich meine Doktorarbeit unter eurer Aufsicht anfertigen durfte. Danke auch für die gute Kollaboration und die Freiheit eigene Ideen zu verfolgen und umzusetzen zu können.

Vielen Dank an Andres Buser, für die unkomplizierte und effiziente Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Christian Jost, Christina Claus, Zeno Riester, Dario Venetz für gute Diskussionen, kritisches Hinterfragen und jede Menge Spaß ☺

Danke

Anne Freimoser-Grundschober und Ekkehardt Mössner für die Hilfe bei der Humanisierung des Binders.

An Mohamed-Reda Benmebarek, Renier Myburgh und Steffen Dickkopf für die gute Kollaboration und wissenschaftliche Zusammenarbeit

An Manfred Schwaiger, Kathrin Nussbaum, Silvia Candido, Lisa Wellinger und Alexandre Taleb für die Hilfe beim Aufbau der PhD@Roche Community

Susagna Altes and Reka Belle, Maria Karagianni und Halina for sparking joy and hosting RICZ be Well

Thank you Andrea Romagnani for your scientific input, your support and the great philosophical discussions.

Nina Scherbichler, für dein offenes Ohr, gute Ratschläge und deine tolle Freundschaft.

Florian Limani, fürs zeigen des Killing Assays, den ich erst 3 Jahre später brauchte ☺ ☺

Der gesamten Molbio und Protein Engineering Besonders, Julia Meinhardt, Manuel Späni, Cindiy Schulenberg und Erwin van Puijenbroek

An mein altes Office, Reto, Lukas, Ramona, Anita, Mat, Linda, Nina, Laurene und Mudita danke, dass ihr mich gerade am Anfang so herzlich aufgenommen habt.

Roberto Adelfio, for your great friendship and for honestly caring! Xavier Miot, Andrejz, Chris and Brian for the legendary party-time. Danke Rosi und Maud, dass ich lange Labornächte oder Wochenenden im Lab nicht alleine verbringen musste ☺

Benjamin Torres Salazar danke, dass du auch jetzt immer noch für mich da bist. Danke dir und Fabian Allendorf für die langjährige Freundschaft und die zahlreichen League of Legends Tuniere. E-Sport for the win.

Steven Roth für eine intensive, lehrreiche und prägende Zeit.

Julian Braun und Robert Schärer für eure unverblühten Ratschläge und die bizarren Momente XD

Andranik Hakobyan, für das herausragende Training, „bisse, bisse“. Viel Erfolg weiterhin!

Tobias Beck – Bewohnerfrei!

Meinen Eltern und Großeltern sowie meinen Schwestern Desiree und Melanie

Meinen Lieblingsbands: Bring me the Horizon, Bullet for my Valentine, Parkway Drive, Terror and Suicide Silence

Thank you whole Roche Glycart, it was an honor to work with you. Keep on going!

10.6 Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname: Darowski, Diana

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Entwicklung einer modularen adoptiven T-Zell-Plattform, basierend auf einem anti-P329G chimären Antigenrezeptor, für das Screening von Antikörpern im IgG1 Format und zur Anwendung für die adoptive T-Zell-Therapie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Schlieren, den 15.10.2020

Diana Darowski

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand/Doktorandin