
Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Stefan Endres

**Antikörper-abhängige Erkennung von humanen
Pankreaskarzinom-, Lymphom- und Melanomzellen durch
CD16-chimärer Antigen-Rezeptor-modifizierte T-Zellen
*in vitro***



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Asang
aus Penzberg
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Kobold

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. J. Eberle

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Felicitas Stein

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2021

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Florian Asang, an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Antikörper-abhängige Erkennung von humanen Pankreaskarzinom-, Lymphom- und
Melanomzellen durch CD16-chimärer Antigen-Rezeptor-modifizierte T-Zellen *in vitro*

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

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

Chieming, 27.01.2021

Florian Asang

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Onkologische Immuntherapie.....	8
1.2 Monoklonale Antikörper zur Tumorthherapie.....	8
1.2.1 Klinischer Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Tumorthherapie	8
1.2.2 Physiologie und Struktur von Antikörpern.....	9
1.2.3 Besonderheiten therapeutischer Antikörper	10
1.2.4 Wirkungsweise von tumorgerichteten, monoklonalen Antikörpern.....	11
1.2.5 Problematik von Tumorthapien mit monoklonalen Antikörpern.....	14
1.3 Etablierte, Zell-vermittelte Tumorthapien.....	15
1.3.1 T-Zellen als potente, anti-tumorale Immuneffektoren	15
1.3.2 Adoptiver Zelltransfer von nativen T-Zellen	15
1.3.3 Adoptiver Zelltransfer von genetisch modifizierten T-Zellen	17
1.4 Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) mit CD16	20
1.4.1 Prinzip von CD16-CAR	20
1.4.2 Problematik von CD16-CAR.....	20
1.5 Profil der in dieser Promotionsarbeit verglichenen Antikörper	21
1.5.1 Glykomodifikation der verglichenen Antikörper.....	21
1.5.2 Weitere Eigenschaften der verglichenen Antikörper	21
1.6 Zielsetzung dieser Promotionsarbeit	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Geräte und Reagenzien	23
2.1.1 Technische Geräte.....	23
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	24
2.1.3 Materialien für die Zellkultur	27
2.1.4 Zelllinien.....	29
2.1.5 FACS-Antikörper.....	30
2.1.6 Antikörper für Stimulationsassays	30
2.1.7 Primer zur Klonierung und Sequenzierung.....	31
2.1.8 Software.....	32
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1 Aufreinigung von DNA.....	32
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.3 Overlap extension PCR.....	33
2.2.4 Restriktionsverdau	34
2.2.5 Ligation.....	34
2.2.6 Hitzeschock-Transformation von Bakterien	34

2.2.7 Gewinnung von Einzelklon-Plasmiden	34
2.2.8 Vervielfältigung von DNS-Plasmiden.....	34
2.2.9 Sequenzierung.....	35
2.3 Zelluläre Methoden	35
2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	35
2.3.2 Bestimmung der Zellkonzentration	35
2.3.3 Beschichten von Zellkulturplatten.....	35
2.3.4 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien.....	35
2.3.5 Gewinnung von primären, humanen T-Zellen	36
2.3.6 Kultivierung von primären, humanen T-Zellen.....	36
2.3.7 Transfektion der Verpackungszelllinie Platinum A.....	36
2.3.8 Retrovirale Transduktion von primären, humanen T-Zellen.....	36
2.3.9 Stimulationsassay	37
2.4 Immunologische Methoden	37
2.4.1 Magnetic-activated cell sorting	37
2.4.2 Durchflusszytometrie.....	37
2.4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay	38
2.5 Statistische Analyse.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Analyse der Expression von CD16 auf primären, humanen T-Zellen	39
3.2 Generierung von chimären Antigen-Rezeptoren mit CD16.....	39
3.2.1 Aufbau der CD16-Fusionsrezeptoren.....	39
3.2.2 Nachweis der Exprimierbarkeit.....	40
3.2.3 Nachweis der Funktionalität	41
3.3 Analyse des Effekts von Antikörper-Glykomodifizierung auf die Aktivität CD16-CAR transduzierter T-Zellen.....	43
3.3.1 Untersuchung am Beispiel des anti-CD20 Antikörper GA101.....	43
3.3.2 Untersuchung am Beispiel des anti-MCSP Antikörper LC007	44
4. Diskussion.....	46
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4.2 Evaluation der neu generierten CD16-CAR.....	46
4.2.1 Struktur der neu generierten CD16-CAR.....	46
4.2.2 Funktionalität der neu generierten CD16-CAR	47
4.3 Analyse des Effekts von Antikörper-Glykomodifikation.....	49
4.3.1 Vergleich von glykomodifizierten und nicht-glykomodifizierten Antikörpern.....	49
4.3.2 Interaktion von glykomodifizierten Antikörpern mit verschiedenen CD16-Rezeptor-Genvarianten.....	50

4.4 Vorteile von CD16-CAR gegenüber anderen CAR.....	52
4.5 Risiko von Autoimmunität unter Therapie mit CD16-CAR-T-Zellen	52
4.6 Glykomodifizierte Antikörper als ideale Kombinationspartner für CD16-CAR-T-Zellen	53
4.7 Ausblick.....	54
5. Zusammenfassung.....	56
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	63
8. Danksagung.....	65
9. Veröffentlichungen.....	66

1. Einleitung

1.1 Onkologische Immuntherapie

Tumorerkrankungen sind mit 25 % die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und ihre Häufigkeit nimmt aufgrund der demographischen Entwicklung deutlich zu (Abu Sin et al. 2015; Kaatsch et al. 2017). Im fortgeschrittenen bzw. metastasierten Stadium weisen die etablierten Therapieformen, wie die Chirurgie, Chemo- oder Strahlentherapie, teils noch unzureichende Therapieergebnisse auf (Kaatsch et al. 2017; Sausville et al. 2016). Ein schwerwiegendes Problem dieser tumorzentrierten Therapieansätze ist die toxische Schädigung auch von gesunden Körperzellen (Kobold et al. 2015; Sausville et al. 2016). Dazu zählen unter anderem auch Immunzellen, welche selbst über eine ausgeprägte, anti-tumorale Potenz verfügen (Sausville et al. 2016). Diese Wirkung macht sich dagegen die anti-tumorale Immuntherapie zunutze (Kobold et al. 2015).

Grundlage dafür stellt das nähere Verständnis des Zusammenhangs von Immunsystem und Tumorzellen dar, welches in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte erfahren hat (Schreiber et al. 2011; Yang 2015). Im Folgenden wird eine Auswahl immuntherapeutischer Ansätze vorgestellt, welche zum Verständnis der vorliegenden Promotionsarbeit relevant ist.

1.2 Monoklonale Antikörper zur Tumortherapie

1.2.1 Klinischer Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Tumortherapie

Die Identifikation von Antigenen, die entweder tumorspezifisch sind, oder aber von Tumorzellen überexprimiert werden, ermöglichte in Kombination mit der 1975 entwickelten Hybridom-Technologie den Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAK) in der Onkologie (Bournazos et al. 2017; Kohler et al. 1975). Mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab wurde 1997 der erste, onkologisch eingesetzte mAK zugelassen (Salles et al. 2017). Für verschiedene B-Zell-Lymphome wurde Rituximab als Erweiterung von konventionellen Therapieschemata eingesetzt und zeigte in vielen Studien einen deutlichen Vorteil (Salles et al. 2017). Beispielsweise erhöhte sein Zusatz zu dem bereits etablierten Chemotherapieschema bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom die Rate kompletter Remissionen von 63 % auf 76 % (Coiffier et al. 2002).

Neben tumorgerichteten Antikörpern wurden immunmodulatorische Antikörper und auch viele strukturelle Varianten zur Tumorthherapie entwickelt, auf welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll (Bournazos et al. 2017). Insgesamt haben 2019 mehr als 80 verschiedene, monoklonale Antikörper eine behördliche Arzneimittelzulassung (Kaplon et al. 2019).

Monoklonale Antikörper haben sich inzwischen als eine der erfolgreichsten, therapeutischen Strategien für hämatologische und solide Tumoren etabliert und zählen deshalb mittlerweile zur Standardtherapie vieler Tumoren (Kudo et al. 2014; Scott et al. 2012).

1.2.2 Physiologie und Struktur von Antikörpern

Physiologischer Weise werden Immunglobuline von Plasmazellen produziert, welche einer differenzierten Form von B-Lymphozyten entsprechen (Murphy 2012, Kapitel 4). Ihre Struktur gleicht einem Y-förmigen Protein. Antikörper bestehen aus jeweils zwei identischen leichten (L) bzw. schweren (H) Polypeptidketten, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind (Bournazos et al. 2017). Die vier Ketten bestehen an ihrem Amino-Terminus aus einer variablen Region (V_L und V_H), die sich von Antikörper zu Antikörper sehr stark unterscheidet und eine spezifische Antigen-Bindung ermöglicht. An ihrem Carboxy-Terminus weisen die Polypeptidketten eine konstante Region auf (C_L und C_H) (Murphy 2012, Kapitel 4).

Die Leichtketten sind mit den V_H - und C_H1 -Domänen der schweren Ketten paarig in den beiden Armen des „Y“ angeordnet und bilden die beiden Antigen-bindenden Fragmente (Fab). Der Stamm des „Y“, genannt kristallisierbares Fragment (*crystallisable fragment, Fc*), setzt sich zusammen aus den C_H2 -, C_H3 - bzw. C_H4 -Domänen an den Carboxy-Termini der beiden schweren Ketten. Die beiden Fab und das Fc sind bei einigen Immunglobulin-Klassen durch eine flexible Gelenkregion verbunden (Abbildung 1) (Murphy 2012, Kapitel 4).

Anhand verschiedener Isotypen der schweren Ketten werden Antikörper in fünf Klassen unterteilt, manche des Weiteren in mehrere Subklassen. Physiologisch ist von allen Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM das Immunglobulin G (IgG) mit seiner Subklasse IgG1 das Häufigste (Bournazos et al. 2017). Analog dazu sind auch die meisten verwendeten therapeutischen Antikörper aus der Klasse IgG (Li et al. 2017).

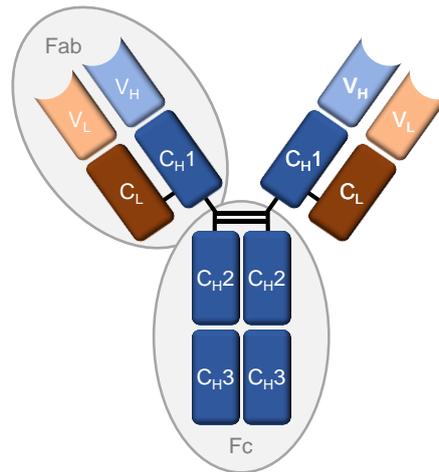


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur eines IgG-Antikörpers, modifiziert nach Murphy, 2012 (Kapitel 4). Ein IgG besteht aus zwei schweren (blau, H) und zwei leichten (rot, L) Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Antigen-bindende, variable Region (V) wird von der konstanten Region (C) unterschieden, welche bei schweren Ketten mehrere Domänen aufweist. Die C_{H2}- und C_{H3}-Domänen bilden das kristallisierbare Fragment (Fc), welches über eine Hinge-Region mit den beiden Antigen-bindenden Fragmenten verbunden ist (Fab).

1.2.3 Besonderheiten therapeutischer Antikörper

Physiologisch wird durch somatische Rekombination sichergestellt, eine größtmögliche Vielfalt an Antikörpern produzieren zu können. Mit mehr als 100 Milliarden möglichen Varianten besteht ein enormes Repertoire an Immunglobulinen, welche verschiedenste Antigene erkennen (Murphy 2012, Kapitel 5). Bei therapeutischem Einsatz von Antikörpern ist jedoch deren Homogenität essenziell, um ungewünschte Reaktionen zu vermeiden. Dies wird ermöglicht durch die Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAK), welche alle von einem Zellklon abstammen und damit in ihrer Struktur absolut identisch sind (Murphy 2012, Appendix I).

Die gezielte Antigen-Spezifität der Antikörper kann am einfachsten durch eine Immunisierung von Mäusen mit dem gewünschten Antigen erreicht werden, aus welchen anschließend B-Zellen extrahiert werden (Kohler et al. 1975; Murphy 2012, Appendix I). Aufgrund des murinen Ursprungs der auf diese Weise produzierten Antikörper, können diese jedoch in Patienten als fremd erkannt werden und damit schwere Immunreaktionen auslösen. Um die Immunogenität monoklonaler Antikörper zu reduzieren, wird mittels verschiedener Verfahren ihr muriner Anteil verringert. Bei

chimären mAK, wie beispielsweise Rituximab, besteht lediglich die variable Region aus murinen Proteinen, die konstante Region dagegen aus humanen. In humanisierten Antikörpern, wie Obinutuzumab, sind nur noch die *complementarity determining regions* murinen Ursprungs (Murphy 2012, Kapitel 16).

1.2.4 Wirkungsweise von tumorgerichteten, monoklonalen Antikörpern

1.2.4.1 ADCC als immunologischer Hauptmechanismus monoklonaler Antikörper in der Tumorthherapie

Der Effekt von zytotoxischen, anti-tumoralen Antikörpern kann sowohl durch deren Fragment Fab, als auch mit ihrem Fc-Fragment vermittelt werden. Durch ersteres können zum Beispiel Zelltod-aktivierende Signalwege induziert werden, oder Rezeptoren blockiert, beziehungsweise herunterreguliert werden. Das Fragment Fc kann sowohl das Komplementsystem, als auch Immunzellen zur Lyse einer Zielzelle anregen (Bournazos et al. 2017). Letzteres wird auch als Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) beschrieben und ist der bedeutendste, immunologische Wirkmechanismus monoklonaler Antikörper in der Tumorthherapie (Kohrt et al. 2012; Li et al. 2017).

Bei der ADCC werden Antikörper, sofern sie eine Zielzelle gebunden haben, von Immunzellen erkannt. Mittels membranständiger Fc-Rezeptoren binden diese das Fc-Fragment eines Antikörpers und führen zur Lyse oder Phagozytose der Zielzelle (Abbildung 2) (Kohrt et al. 2012). Für eine effektive Interaktion zwischen Immunzelle und Antikörper muss jedoch die Struktur der beiden Protagonisten ideal übereinstimmen (Bournazos et al. 2017).

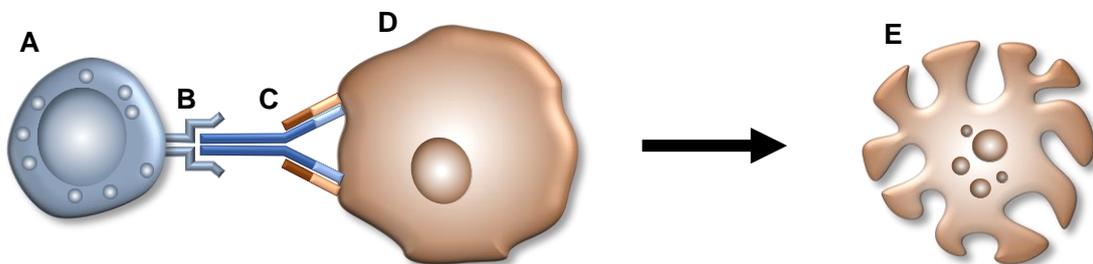


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines ADCC-Komplexes, modifiziert nach Mellor, 2013. Eine Fc-Rezeptor (B) exprimierende Effektorzelle (A) bindet einen Antikörper (C), welcher wiederum eine Zielzelle (D) gebunden hat und führt folgend zu deren Lyse (E).

1.2.4.2 Protagonisten der Antikörper-abhängigen, Zell-vermittelten Zytotoxizität

Im Menschen wird ADCC durch die Bindung von Antikörpern der Subklasse IgG1 an den Fc γ -Rezeptor IIIa (Fc γ RIIIa) vermittelt (Bournazos et al. 2017). Dieser Rezeptor wird auch als *cluster of differentiation* 16a (CD16a) bezeichnet und ist ein aktivierender Rezeptor mit niedriger Affinität, der von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie Makrophagen exprimiert wird – nicht jedoch von T-Zellen (Bournazos et al. 2017; Nagelkerke et al. 2014). Er gehört der Superfamilie der Immunglobuline an und besteht extrazellulär aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Abbildung 3). Diese können mit der C_H2-Domäne des Fc-Teils von Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG3 interagieren (Bournazos et al. 2017; Murphy 2012, Kapitel 10; Nagelkerke et al. 2014).

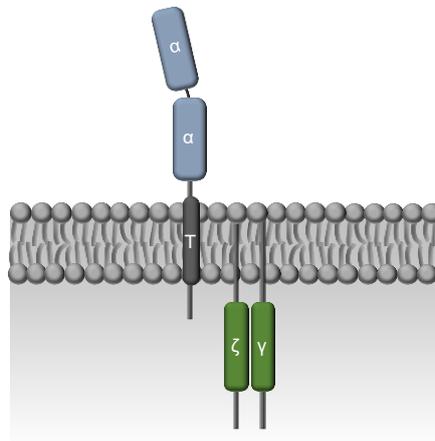


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von CD16, modifiziert nach Nagelkerke, 2015 und Murphy, 2012 (Kapitel 10). Extrazellulär besteht der CD16-Rezeptor aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen in seiner α Kette (α), die über eine Transmembrandomäne in der Zellwand verankert sind. Intrazellulär ist er mit aktivierenden Adaptorproteinen assoziiert, wie der CD3 ζ -Kette (ζ) und der γ -Kette (γ).

1.2.4.3 Einfluss von Rezeptor-Genvarianten auf die Antikörper-Bindung

Von dem Rezeptor CD16 existieren verschiedene Genvarianten, die in einer signifikanten Häufigkeit auftreten. Diese auch als Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) bezeichneten Variationen einzelner Basenpaare können zum Austausch von Aminosäuren führen (Mellor et al. 2013). So variieren beispielsweise an der Aminosäureposition 48 der extrazellulären Domäne von CD16 die Aminosäuren Leucin (48L), Arginin (48R) und Histidin (48H). Dieser SNP hat jedoch keinen Einfluss auf die Affinität des Rezeptors (Koene et al. 1997). An Position

158 treten sowohl Valin (158V) als auch Phenylalanin (158F) auf. Aufgrund seiner Lage innerhalb der Antikörper-bindenden Domäne beeinflusst dieser SNP die Affinität von CD16: Valin an Position 158 zeigt eine etwa 10-fach höhere Bindungsaffinität für IgG als Phenylalanin, ist jedoch mit einer Gen-Frequenz von 43 % bei Menschen die weniger häufige Variante (Koene et al. 1997; Pereira et al. 2018).

1.2.4.4 Einfluss des Glykosilierungsstatus von Antikörpern auf die Rezeptor-Bindung

Die Bindungsaffinität von Fc γ -Rezeptoren wird des Weiteren durch den Glykosilierungsstatus der korrespondierenden Antikörper beeinflusst (Bournazos et al. 2017). Verschiedene Oligosaccharide, die das Asparagin 297 innerhalb der C_H2-Domäne gebunden sind, modulieren durch intermolekuläre Interaktionen die Konformation eines Antikörpers (Abbildung 4). Dadurch wird dessen biologische Funktion beeinflusst - konkret dessen Effizienz, Stabilität, Aggregation und Immunogenität (Li et al. 2017).

Den bedeutendsten Einfluss hat dabei die Bindung von Fucose im Kern des Oligosaccharides. Über 80 % des humanen IgG ist auf diese Weise fucosyliert (Li et al. 2017). Die Abwesenheit dieses Monosaccharides führt zu einer Stabilisierung der Interaktion mit bestimmten Fc γ -Rezeptoren. Dadurch kann beispielsweise die Bindungsaffinität zu dem Rezeptor CD16 um bis zu 50-fach gesteigert werden und potenziert gleichzeitig dessen ADCC-Effektorfunktion (Pereira et al. 2018; Shields et al. 2002).

Physiologischerweise erfolgt die Glycan-Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat, wobei die Glycanstruktur dynamisch reguliert werden kann (Bournazos et al. 2017; Li et al. 2017). Um sich den Einfluss der Glycanstruktur auch therapeutisch zunutze zu machen, können monoklonale Antikörper entweder mit spezialisierten Produktionszellen hergestellt werden, oder *in vitro* chemoenzymatisch glykomodifiziert werden. Auf diese Weise können durch gezielte Glykomodifikation bestimmte Effektorfunktionen von Antikörpern gesteigert werden (Li et al. 2017).

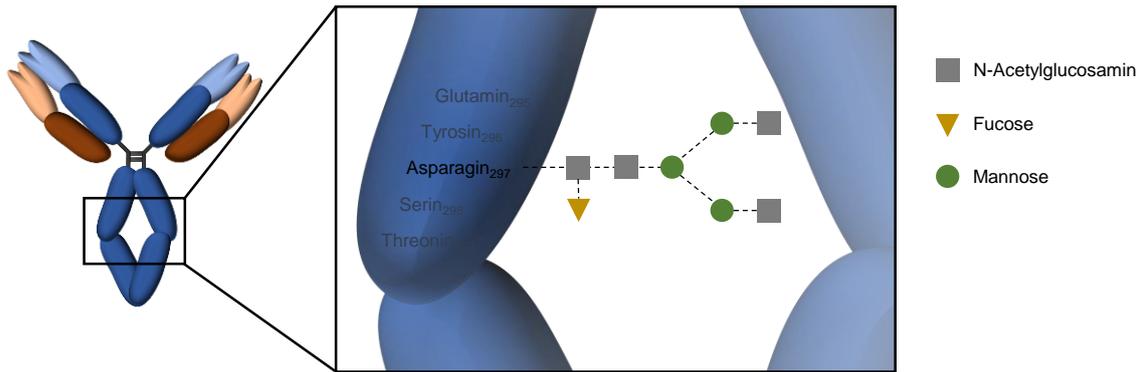


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Asparagin 297-gebundenen Glycanstruktur, modifiziert nach Bournazos, 2017 und Li, 2017. An das Asparagin 297, innerhalb der C_H2-Domäne von Antikörpern, ist eine N-verknüpfte Glycanstruktur konjugiert. Diese beeinflusst die Konformation des Fc-Fragments und moduliert somit die Bindungsaffinität zu Fcγ-Rezeptoren.

1.2.5 Problematik von Tumorthérapien mit monoklonalen Antikörpern

Der therapeutische Erfolg von monoklonalen Antikörpern in der Tumorthérapie wird durch partielle oder nur vorübergehende, klinische Wirksamkeit limitiert (Peterson et al. 2018). Dieser Problematik können verschiedenste Mechanismen zugrunde liegen (Singha et al. 2015). So können zum Beispiel Tumorzellen als Reaktion auf eine Antikörper-Thérapie das angezielte Antigen herunterregulieren (Ma et al. 2014; Singha et al. 2015). Auch die Mutation von Signalwegen kann zu verringertem Therapie-Ansprechen und Überleben führen. Aus diesem Grund wird beispielsweise Cetuximab nur bei Patienten eingesetzt, welche das Protein KRAS in seiner unmutierten Form exprimieren (Scott et al. 2012).

Außerdem kann Antikörpern der Zugang zu Tumorzellen Schwierigkeiten bereiten. Dies gilt insbesondere für solide Tumoren mit immunsuppressivem Tumormikromilieu (Singha et al. 2015). Desweiteren kann auch die von Patienten exprimierte CD16-Rezeptor-Genvariante Einfluss auf den individuellen Therapieerfolg von Antikörpern haben (Bournazos et al. 2017). Die heterogenen Erfolge mit monoklonalen Antikörpern in der Tumorthérapie verdeutlichen den Bedarf, diese Therapieform noch weiter zu entwickeln.

1.3 Etablierte, Zell-vermittelte Tumorthapien

1.3.1 T-Zellen als potente, anti-tumorale Immuneffektoren

Neben Antikörpern werden auch T-Zellen erfolgreich zur Therapie von Tumoren eingesetzt. Diese haben auch physiologisch eine große Bedeutung in der Entstehung von Tumoren: Eine Reduktion oder ein Fehlen von Lymphozyten, beispielsweise durch therapeutische Immunsuppression, führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Tumoren (Schreiber et al. 2011; Shankaran et al. 2001). Dies ist zurückzuführen auf deren zentrale Rolle bei der Tumorentstehung: Im Rahmen des *Immunoediting* eliminieren sie einerseits entartete Tumorzellen - andererseits formen sie auch deren Immunogenität (Schreiber et al. 2011). Eine starke Präsenz von T-Lymphozyten im Tumormikromilieu korreliert mit einer guten Prognose für viele solide Tumoren (Hui et al. 2015). Aufgrund dieser ausgeprägten anti-tumoralen Potenz stehen T-Zellen im Zentrum Zell-vermittelter Tumorthapien (Sausville et al. 2016).

1.3.2 Adoptiver Zelltransfer von nativen T-Zellen

1.3.2.1 Prinzip des adoptiven Zelltransfers

Beispiel für eine sehr effektive, Zell-vermittelte Methode zur Tumorthapie ist der adoptive Zelltransfer (AZT) (Rosenberg et al. 2011). Hierbei werden von Patienten T-Zellen isoliert und nach einer Behandlung sowie Expansion *ex vivo* anschließend wieder reinfundiert (Abbildung 5) (Kalos et al. 2013). Im Körper gebildete, tumorspezifische T-Zellen können sowohl aus Tumorgewebe, als auch aus peripherem Blut separiert werden. Dazu wird das gewonnene Zellmaterial unter Tumorantigen-Präsentierung stimuliert, auf diese Weise selektiert und über einen Zeitraum von mehreren Wochen expandiert (Rosenberg et al. 2015; Wang et al. 2014). Mit dieser Methode konnte in Pilotstudien bei bereits vorbehandelten Patienten mit metastasiertem Melanom objektive Ansprechraten von bis zu 72 % erreicht werden, darunter 40 % komplette Remissionen (Rosenberg et al. 2011).

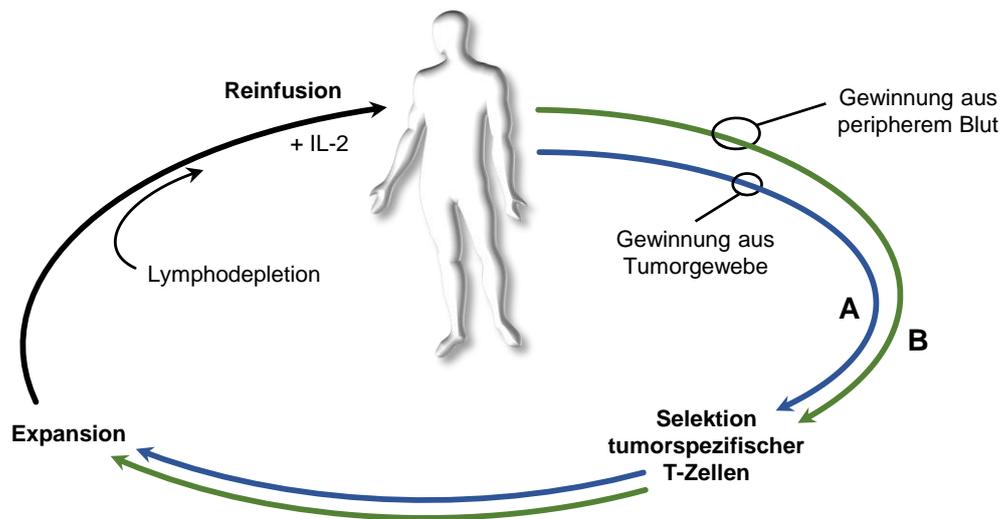


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Konzepts von adoptivem Zelltransfer, modifiziert nach Cadilha, 2017. Aus Tumorgewebe oder peripherem Blut isolierte T-Zellen werden entweder anhand ihrer Tumorspezifität selektiert, bevor sie dem Patienten nach einer Expansion wieder reinfundiert werden: **(A)** Tumor-infiltrierende Lymphozyten; **(B)** Antigen-induzierte, tumorspezifische T-Zellen.

1.3.2.2 Vorteile und Limitationen des adoptiven Zelltransfers von nativen T-Zellen

AZT ist eine zunehmend attraktiver werdende Perspektive zur Behandlung von Tumoren, da im Gegensatz zu anderen Immuntherapien nicht *in vivo* eine suffiziente Anzahl an anti-tumoralen T-Zellen gebildet werden muss (D'Aloia et al. 2016; Rosenberg et al. 2015). Außerdem ist das Abstoßungsrisiko beim Transfer autologer Immunzellen gering und klinisches Ansprechen zeigt sich meist schon innerhalb der ersten Tage oder Wochen (Kalos et al. 2013; Wang et al. 2014).

Obwohl aus nahezu jeder Tumorentität Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) gewonnen werden können, scheinen sie jedoch nur bei Patienten mit metastasiertem Melanom zu einer reproduzierbaren, potenten, anti-tumoralen Immunantwort zu führen (Rosenberg et al. 2015). Hintergrund ist, dass die Affinität von natürlichen T-Zell-Rezeptoren zu Tumorantigenen im Allgemeinen als niedrig gilt (Wang et al. 2014). In Kombination mit einem ausgeprägt immunsuppressiven Tumormikromilieu kann dies dazu führen, dass der Transfer von nativen T-Zellen nicht ausreicht, um eine effektive Immunantwort bei fortgeschrittenen Tumoren zu induzieren (Kalos et al. 2013).

Eine weitere Limitation nativer T-Zellen ist, dass sie mit ihrem T-Zell-Rezeptor Antigene nur erkennen können, sofern sie auf bestimmten MHC-Molekülen korrekt präsentiert

werden (Murphy 2012, Kapitel 4). Dies ist jedoch ein komplexer Prozess, der im Rahmen tumoraler Escape-Mechanismen verändert werden kann (June et al. 2018; Kalos et al. 2013).

1.3.3 Adoptiver Zelltransfer von genetisch modifizierten T-Zellen

1.3.3.1 Weiterentwicklung adoptiven Zelltransfers durch genetische Modifizierung von T-Zellen

Um das vielversprechende Potential des adoptiven Zelltransfers dennoch für mehrere Tumorentitäten zugänglich zu machen, wurden Techniken entwickelt, mit welchen anti-tumorale Rezeptoren in T-Zellen eingeschleust werden können (Rosenberg et al. 2015). Durch meist viralen Gen-Transfer kann somit jede T-Zelle genetisch verändert werden und damit Tumorspezifität erlangen (Abbildung 6) (Kalos et al. 2013; Kobold et al. 2015). Im Rahmen dessen wurden T-Zell-Rezeptoren entwickelt, welche eine substanziell verbesserte Affinität zu Tumorantigenen aufweisen. Damit bleibt jedoch weiterhin die Abhängigkeit von einer korrekten Antigen-Präsentierung auf MHC-Komplexen bestehen (June et al. 2018; Kalos et al. 2013).

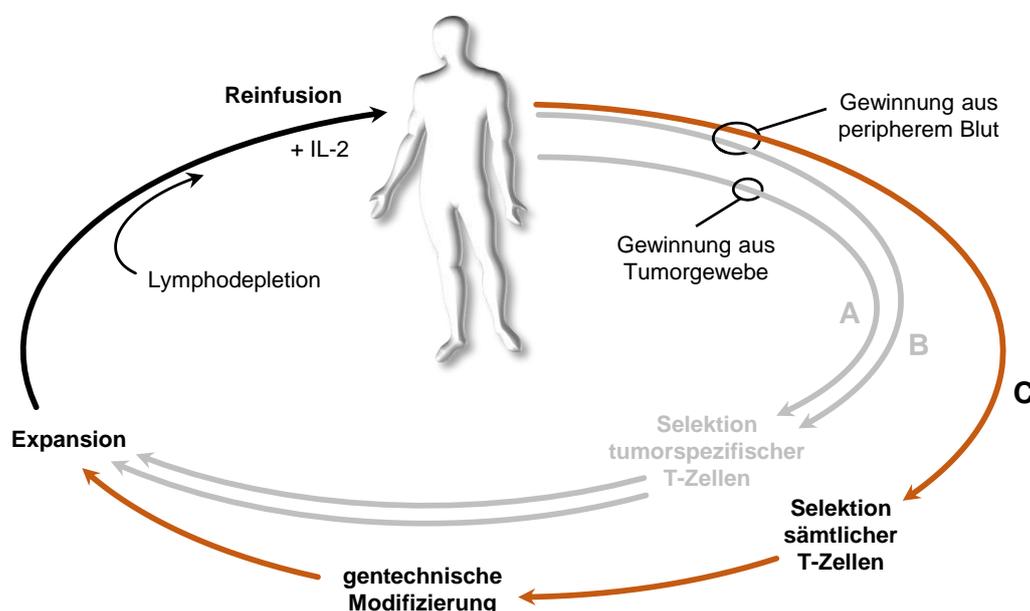


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Konzepts von adoptivem Zelltransfer mit genmodifizierten T-Zellen, modifiziert nach Cadilha, 2017.

Aus peripherem Blut werden sämtliche T-Zellen selektiert und gentechnisch modifiziert, bevor sie dem Patienten nach einer Expansion wieder reinfundiert werden: **(A)** Tumorinfiltrierende Lymphozyten; **(B)** Antigen-induzierte, tumorspezifische T-Zellen; **(C)** genetisch modifizierte T-Zellen.

1.3.3.2 Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) zum adoptiven Zelltransfer

Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) umgehen die MHC-Restriktion der physiologischen Antigen-Erkennung durch T-Zellen, weswegen sie als vielversprechender Ansatz gelten (Benmeharek et al. 2019). CAR sind synthetische Polypeptide und bestehen klassischer Weise aus drei Domänen: Einer Antigen-bindenden extrazellulären Domäne, welche für gewöhnlich aus zwei aneinandergereihten V_L - und V_H -Domänen eines Antikörpers (*single chain variable fragment*, scFv) besteht (Kalos et al. 2013; Stoiber et al. 2019). Eine Transmembran-Domäne verankert den CAR in der Zellmembran. Der intrazelluläre Anteil besteht mitunter aus mehreren Molekülen, die an der Signaltransduktion von T-Zellen beteiligt sind. Abhängig von deren Kombination werden CAR in Generationen eingeteilt (Abbildung 7) (June et al. 2018; Wang et al. 2014). Bindet ein solcher Rezeptor ein Antigen, wird die T-Zelle aktiviert und die Antigen-exprimierende Zelle lysiert (Kobold et al. 2015).

Derzeit werden in mehr als 550 klinischen Studien verschiedenste CAR-T-Zell-Therapien untersucht. Aufgrund beeindruckender Ergebnisse wurden 2017 bzw. 2018 mit Tisagenlecleucel und Axicabtagen-Ciloleucel bereits zwei anti-CD19 CAR zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie und dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom zugelassen (Kruger et al. 2019).

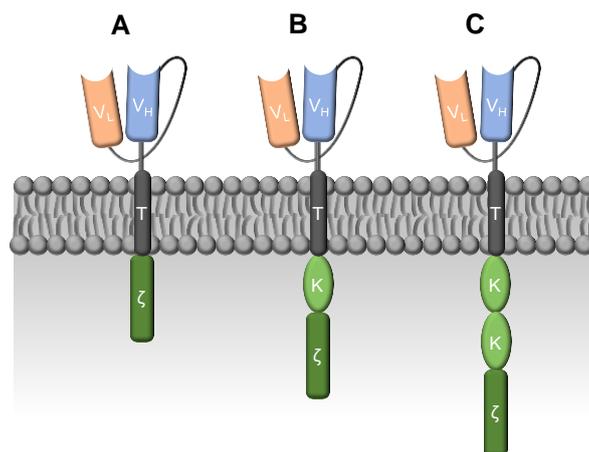


Abbildung 7: Schematische Darstellung von chimären Antigen-Rezeptoren, modifiziert nach June, 2018 und Benmeharek, 2019. Chimäre Antigen-Rezeptoren sind Fusionsproteine, deren extrazellulärer Anteil üblicherweise von Antikörpern abgeleitet ist (V_L und V_H). Neben einer Transmembrandomäne (T), welche den Rezeptor in der Zellwand verankert, weisen sie mitunter mehrere intrazelluläre

Moleküle auf, die an der Signaltransduktion von T-Zellen beteiligt sind: Bei CAR der ersten Generation ist dies typischerweise CD3 ζ (**A**), CAR der zweiten Generation besitzen zusätzlich noch eine kostimulatorische Endodomäne (K), meist bestehend aus CD28 oder 4-1BB (**B**). CAR der dritten Generation enthalten zwei kostimulatorische Domänen, die mit CD3 ζ fusioniert sind (**C**).

1.3.3.3 Vorteile und Limitationen von Therapien mit CAR-T-Zellen

Ein großer Vorteil gegenüber der Antigen-Erkennung mittels T-Zell-Rezeptoren ist, dass CAR-exprimierende T-Zellen keiner MHC-Restriktion unterliegen. Damit können sie auch Tumorzellen eliminieren, die im Rahmen von *Escape*-Mechanismen Abnormalitäten in der MHC-Antigen-Prozessierung entwickelt haben (Caratelli et al. 2017). Dies birgt jedoch gleichzeitig den Nachteil, dass sie somit auf die Erkennung von extrazellulären Zelloberflächen-Antigenen beschränkt bleiben (Kalos et al. 2013; June et al. 2018).

Obwohl mit Tisagenlecleucel bei 93 % der behandelten Patienten mit rezidivierter oder refraktärer B-Zell-ALL eine komplette Remission erreicht werden konnte, wird jedoch bei einer signifikanten Fraktion von Patienten der langfristige Erfolg von CAR-T-Zell-Therapien durch Tumor-*Escape*-Mechanismen, wie einem Verlust des angegriffenen Antigens, limitiert (Maude et al. 2018; Stoiber et al. 2019).

Außerdem ist bei Therapien mit CAR-T-Zellen das Auftreten verschiedenster Toxizitäten mit teils verheerenden Folgen zu beobachten (Stoiber et al. 2019). Ursächlich dafür ist der schmale Grat zwischen einer effektiven T-Zell-Aktivierung, die für eine anti-tumorale Aktivität erforderlich ist, und einer unkontrollierten T-Zell-Aktivierung, welche Immunpathologien hervorrufen kann (Gargett et al. 2014). Dazu zählen unter anderem *On-target-off-tumor*-Toxizität, das Tumolyseyndrom, das Zytokinfreisetzungssyndrom, oder Neurotoxizität (Stoiber et al. 2019). Modifizierte CAR sollen künftig die Patientensicherheit erhöhen, indem sie durch eine modulare Aktivierung von T-Zellen eine ausbalancierte Immunaktivität derselben ermöglichen (Stoiber et al. 2019). Ein vielversprechendes Beispiel dieser Modifikationen sind chimäre Antigen-Rezeptoren mit CD16.

1.4 Chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) mit CD16

1.4.1 Prinzip von CD16-CAR

Um sowohl die Vorteile von adoptiver Zelltherapie und Tumorthérapien mit monoklonalen Antikörpern zu vereinen, als auch einige deren Limitationen gegenseitig aufzuheben, wurde eine Modifikation von chimären Antigen-Rezeptoren entwickelt (D'Aloia et al. 2016). Dabei wird die extrazelluläre Domäne eines klassischen CAR ersetzt durch den extrazellulären Anteil des Fc γ -Rezeptors CD16a, der, wie oben beschrieben, das Fc-Fragment von Antikörpern bindet. Dieser CD16-CAR vermittelt nun ausschließlich in Kombination mit Antigen-gebundenen, monoklonalen Antikörpern anti-tumorale Aktivität (Caratelli et al. 2017; Clémenceau et al. 2006; Kudo et al. 2014).

Die Kernidee des Ansatzes ist, dass die Wirksamkeit von CD16-CAR-T-Zellen nur in Kombination mit Antikörpern vermittelt wird. Der Abbau des Antikörpers reduziert damit automatisch die Aktivierung der T-Zelle und die Zielspezifität kann durch Infusion eines alternativen Antikörpers variiert werden (Caratelli et al. 2017; Rataj et al. 2018).

Dadurch wird dem Ansatz eine breitere Anwendbarkeit als reinen CAR-T-Zellen vorhergesagt. Aufgrund vielversprechender präklinischer Ergebnisse werden CD16-CAR exprimierende T-Zellen bereits ersten klinischen Tests unterzogen (Motz et al. 2018; clinicaltrials.gov - Kennung: NCT03189836).

1.4.2 Problematik von CD16-CAR

Untersuchungen zeigten, dass CD16-CAR-transduzierte T-Zellen über eine ausgeprägte Zytotoxizität verfügen. Sie zeigten sogar eine zytotoxische Überlegenheit gegenüber NK-Zellen, nativen T-Zellen sowie CD19-CAR-T-Zellen (Clémenceau et al. 2006; Kudo et al. 2014; Tanaka et al. 2016). Dieses einerseits gewünschte Potenzial birgt jedoch andererseits auch die Gefahr, dass durch endogene Antikörper unter Umständen autoimmune Reaktionen hervorgerufen werden können (Rataj et al. 2018). Um dieser Problematik von CD16-CAR vorzubeugen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit deren Interaktion mit glykomodifizierten, monoklonalen Antikörpern untersucht werden, welche bevorzugt an CD16 binden.

1.5 Profil der in dieser Promotionsarbeit verglichenen Antikörper

1.5.1 Glykomodifikation der verglichenen Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, glykomodifizierten Antikörper wurden beide von der Firma Roche zur Verfügung gestellt. Sowohl der Antikörper GA101GE, als auch LC007GE, wurden von Glycotransferase-GnT3- sowie Man2-überexprimierenden CHO-Zellen produziert (Almagro et al. 2018; Mössner et al. 2012; Rataj et al. 2018). Diese Methode ist auch bekannt als GlycoMab-Technologie. Auf diese Weise hergestellte Antikörper weisen einen reduzierten Fucose-Anteil im Oligosaccharid-Kern auf (Almagro et al. 2018).

1.5.2 Weitere Eigenschaften der verglichenen Antikörper

Der Antikörper GA101GE, auch als Obinutuzumab bekannt, ist ein humanisierter IgG1 (Gagez et al. 2014). Er ist spezifisch für CD20, einem Zelloberflächen-Protein von humanen B-Lymphozyten, das von verschiedenen lymphoiden Malignomen überexprimiert wird (Gagez et al. 2014; Habibi-Anbouhi et al. 2015).

LC007GE, ein chimärer IgG1, ist gegen das Antigen MCSP (*melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*) gerichtet (Mössner et al. 2012). Dessen physiologische Gewebeexpression ist gering. MCSP wird jedoch in hohen Konzentrationen auf Perizyten der Tumor-Neovaskulatur von Melanomen sowie von lobulären Brustkarzinomen, Glioblastomen, Osteo- und Chondrosarkomen und Basalzellkarzinomen exprimiert (Mössner et al. 2012).

1.6 Zielsetzung dieser Promotionsarbeit

Mit CD16-CAR transduzierte T-Zellen sollen die klinische Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern verbessern (Kudo et al. 2014). Es ist bekannt, dass die Antikörper-abhängige, physiologischerweise NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sowohl durch die Genvariante des Fc γ -Rezeptors, als auch durch den Glykosilierungsstatus des damit korrespondierenden Antikörpers beeinflusst wird. Rezeptoren mit dem SNP 158V und Fucose-reduzierte Antikörper weisen eine stärkere Bindungsaffinität auf und führen bei nativen NK-Zellen zu einer Verstärkung der ADCC-Immunantwort (Li et al. 2017; Nagelkerke et al. 2014). Die Frage, ob diese Erkenntnisse gleichbedeutend auf CD16-CAR-T-Zellen übertragen werden können, stellte Grundlage für die vorliegende Arbeit dar. Von Interesse war des Weiteren, welche Genvariante des Rezeptors am stärksten von einer Antikörper-Glykomodifikation profitieren kann.

Nach initialem Klonieren mehrerer Varianten eines humanen CD16-CAR der zweiten Generation war das Ziel, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- 1) Welche Transmembran-Variante der neuen CD16-CAR kann am besten von primären, humanen T-Zellen exprimiert werden?
- 2) Vermitteln die neu erstellten Rezeptoren transduzierten T-Zellen *in vitro* Antikörper-abhängige Immunaktivität?
- 3) Welchen Einfluss hat die Fucose-Glykomodifikation der Antikörper GA101GE und LC007GE auf die Aktivität CD16-CAR-transduzierter T-Zellen *in vitro*?
- 4) Können einzelne Genvarianten des Rezeptors unterschiedlich stark von dieser Antikörper-Glykomodifikation profitieren?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Technische Geräte

Technische Geräte	Hersteller
Abzugschrank 2-453-JAND	Köttermann Systemlabor (Hänigsen, Deutschland)
Alpha Imager HP gel imager	Alpha Innotech (Kasendorf, Deutschland)
Assay Platte, stark bindend	Corning (Corning, USA)
CO ₂ -Brutschrank (BD6220)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim, Deutschland)
FACSCanto II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubationsschüttler Innova44	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C, -20 °C)	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Lamin Air HeraSAFE KS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Magnetrührer RH BASIC 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikrowelle	Siemens (München, Deutschland)
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Minizentrifuge Sprout	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Mithras LB940 ELISA Reader	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifugen 3L-R, X3 and 4KR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer Zählkammer	MTG (Sulzbach, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettenset Research plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
PowerPac™ Universal Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

Technische Geräte	Hersteller
Schüttelwasserbad 1083	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tisch-Schüttler DOS-10L	ELMI (Calabasas, USA)
Transilluminator Macrovue	LKB Bromma (Stockholm, Schweden)
Vakuum-Pumpe	Promega (Fitchburg, USA)
Vortexer RS VA 10	Phoenix Instrument (Garbsen, Deutschland)
Waage ENTRIS224-1S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5418r	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
0,9 % w/v Natriumchlorid	Baxter International (Deerfield, USA)
Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Biocoll	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Calcium Chlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CD3 Microbeads human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Counting Beads Count Bright	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Cut Smart Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs (Ipswich, USA)
DNA Ligase Puffer T4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA Ligase T4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Färbung Clear G	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
DNA-Polymerase Q5	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
EcoRI High-Fidelity	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Ethanol 100 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Heparin-sodium 2.500 IE / 5 ml	B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Hexadimethrine bromide	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LB Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Loading Dye, 6 x	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NotI High-Fidelity	New England Biolabs (Ipswich, USA)
O'GeneRuler DNS Standard Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Polybrene Transfection Reagent	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Q5 GC Enhancer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Q5 Reaction Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RetroNectin	Takara Bio (Kusatsu, Japan)
Schwefelsäure (2 N)	Apotheke Klinikum der Universität München (München, Deutschland)
TAE Puffer Rotiphorese (50 x)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TMB Substrat Reagenz Set	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 3: Reagenziensätze

Reagenziensätze	Hersteller
DNS Isolierungs Kit, Jet quick	GenoMed (Stuttgart, Deutschland)
Human IFN- γ ELISA Kit	BioLegend (San Diego, USA)
Maxiprep System, PureYield Plasmid	Promega (Fitchburg, USA)
Miniprep Kit, GeneJet Plasmid	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MycoAlert Kit	Lonza (Basel, Schweiz)

Tabelle 4: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Antikörper <i>Blocking</i> -Puffer	PBS 10 % FBS
ELISA <i>Coating</i> -Puffer, pH 9,5	1,0 L ddH ₂ O 8.4 g NaHCO ₃ 3.56 g Na ₂ CO ₃
ELISA Verdünnungs-Puffer	PBS 10 % FBS
ELISA Wasch-Puffer	PBS 0,05 % Tween20
FACS Puffer	PBS 2 % FBS
MACS-Puffer	PBS 2 mM EDTA 0,5 % BSA
RetroNectin <i>Blocking</i> -Puffer	PBS 2 % BSA
RetroNectin Wasch-Puffer	PBS 1 M HEPES
TAE-Puffer	ddH ₂ O 2 % TAE Puffer Rotiphorese (50x)
Transfektions-Puffer	100 ml ddH ₂ O 1,6 g NaCl 74 mg KCl 50 mg Na ₂ HPO ₄ 1,0 g HEPES

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 5: Materialien für die Zellkultur

Materialien	Hersteller
Blasticidin	InvivoGen (San Diego, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	PAA (Pasching, Österreich)
Fetales Bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Humanes Serum, steril filtriert	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, Österreich)
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA, 100 x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin, Streptomycin (100 x)	PAA (Pasching, Österreich)
Puromycin	InvivoGen (San Diego, USA)
RPMI-1640	PAA (Pasching, Österreich)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin (10 x)	PAA (Pasching, Österreich)
VLE (Very Low Endotoxine) RPMI 1640	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Well-Platten	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturflaschen	Corning (Corning, USA)

Tabelle 6: Medien für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur	Zusammensetzung
DMEM-Medium für Platinum A	DMEM Vollmedium 10 µg/ml Puromycin 1 µg/ml Blasticidin
DMEM Vollmedium	DMEM 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
Humanes T-Zell Assay-Medium	VLE RPMI 1640 2,5 % humanes Serum 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 1 mM Natrium-Pyruvat 1 µM MEM NEAA 50 µM β-Mercaptoethanol
Humanes T-Zell Medium	humanes T-Zell Assay-Medium 200 U/ml IL-2 5 ng/ml IL-15
RPMI-Medium für Raji	RPMI Vollmedium 1 mM Natrium-Pyruvat 1 mM HEPES
RPMI Vollmedium	RPMI 1640 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 10 U/ml Streptomycin

Tabelle 7: Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokine und Wachstumsfaktoren	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Anti-human CD3 (Klon OKT3), Functional Grade Purified	2 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-human CD28 (Klon CD28.2), Functional Grade Purified	2 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dynabeads Human T-Activator anti-CD3 anti-CD28	33 µl	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rekombinantes humanes IL-2	200 U/ml	Novartis (Basel, Schweiz)
Rekombinantes humanes IL-15	5 ng/ml	Peptotech (Rocky Hill, USA)

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Medium	Herkunft
5-alpha	Kompetente <i>E. coli</i>	LB Medium	New England Biolabs (Ipswich, USA)
MV3	Humane Melanom-Zelllinie	RPMI Vollmedium	Roche (Penzberg, Deutschland)
Panc-1	Humane Pankreas-karzinom-Zelllinie	DMEM Vollmedium	European collection of cell cultures (Porton Down, England)
Platinum A	Retrovirale, amphitrope Verpackungszelllinie	DMEM-Medium für Platinum A	Cell Biolabs (San Diego, USA)
Raji	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	RPMI-Medium für Raji	American Type Culture Collection (Manassas, USA)

2.1.5 FACS-Antikörper

Tabelle 9: FACS-Antikörper

Konjugierte Primärantikörper	Klon	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Anti-human CD16 APC	3G8	5 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-human EGFR APC	AY13	5 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-human MCSP FITC	EP-1	5 µg/ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti-human PD-L1 APC	29E.2A3	5 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-mouse IgG1, κ Isotyp APC	MOPC-21	5 µg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
Anti-mouse IgG1, κ Isotyp FITC	IS5-21F5	5 µg/ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Unkonjugierte Primärantikörper		Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Rituximab		10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)
Sekundärantikörper			Hersteller
Alexa Fluor 488 Goat anti-Human IgG (H+L) Secondary Antibody		20 µg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.6 Antikörper für Stimulationsassays

Tabelle 10: Antikörper für Stimulationsassays

Antikörper	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Cetuximab	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Panitumumab	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Amgen (Thousand Oaks, USA)
Rituximab	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)

Antikörper	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
GA101	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)
GA101GE / Obinutuzumab	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)
LC007	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)
LC007GE	0,1 sowie 1 und 10 µg/ml	Roche (Penzberg, Deutschland)

2.1.7 Primer zur Klonierung und Sequenzierung

Tabelle 11: Primer zur Klonierung und Sequenzierung

Adressiertes Gen	Sequenz
Not1 - CD16 (extrazelluläre Domäne)	F: 5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG TGG CAG CTG CTC CTC C-3'
CD16 (extrazelluläre Domäne) - CD28 (Transmembran-Domäne)	F: 5'-CAT TCT TTC CAC CTG GGT ACC AAT TTT GGG TGC TGG TGG TGG-3' R: 5'-CCA CCA CCA GCA CCC AAA ATT GGT ACC CAG GTG GAA AGA ATG-3'
CD16 (Transmembran-Domäne) - CD28 (intrazelluläre Domäne)	F: 5'-GTG GAC ACA GGA CTA TAT TTC TCT GTG AGG AGT AAG AGG AGC AGG CTC-3' R: 5'-GAG CCT GCT CCT CTT ACT CCT CAC AGA GAA ATA TAG TCC TGT GTC CAC-3'
CD3ζ (intrazelluläre Domäne) - EcoR1	R: 5'-TAA TGA ATT CTT AGC GAG GGG GCA GG-3'
CD28 (Transmembran-Domäne)	R: 5'-TAA TGA ATT CTT ACA CCC AGA AAA TAA TAA AGG CCA CTG-3'
CD16 (Transmembran-Domäne)	R: 5'-TAA TGA ATT CTT ACA CAG AGA AAT ATA GTC CTG TGT CCAC-3'
CD16 (extrazelluläre Domäne) Mutationsprimer: 158V > 158F	F: 5' – GCA GGG GGC TTT TTG GGA GTA AAA ATG – 3' R: 5' - CAT TTT TAC TCC CAA AAA GCC CCC TGC - 3'

2.1.8 Software

Tabelle 12: Software

Software	Hersteller
Endnote	Thompson Reuter (Carlsbad, USA)
FACS Diva	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
FlowJo	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
SnapGene	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Aufreinigung von DNA

2.2.1.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung nach Ladung und Größe wurden 50 µl DNS-Proben zunächst mit 8,3 µl eines *Loading Dye* gemischt. Anschließend wurde die Lösung in die Taschen eines 1,5 %igen Agarose-Gels gefüllt, welches 6 µl einer DNS-färbenden Reagenz enthielt und in TAE-Puffer eingelegt war. Durch Anlegen von etwa 80 mV Spannung über ca. 30 Minuten wurden die Moleküle aufgetrennt. Die auf diese Weise entstandenen Banden konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Zur Orientierung diente ein parallel aufgetragener Standard, der verschiedene Basenpaarlängen markierte.

2.2.1.2 Gelextraktion

Mit einem DNS Isolierungs Kit wurde aus Agarose-Gelausschnitten protokollgemäß zunächst die Agarosestruktur des Gels gelöst, die Lösung mehrmals gewaschen sowie filtriert und anschließend die DNS mit doppelt-destilliertem Wasser (ddH₂O) resuspendiert.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung spezifischer DNS-Sequenzen wurden 0,5 µM Primer, 1 U Polymerase, 20 ng DNS, 0,4 mM dNTP, je 10 µl an *GC-Enhancer* und Polymerasepuffer mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl verdünnt. Diese

Lösung wurde im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mehreren thermischen Zyklen unterzogen. Nach einer initialen Denaturierung bei 98 °C über 30 Sekunden wurde ein Zyklus aus Denaturierung (bei 98 °C für 10 s), Primerhybridisierung (für die eingesetzten Primer bei 60 °C über 30 s) und Elongation (bei 72 °C für 40 s) insgesamt 35 Mal wiederholt. Abschließend folgte eine finale Elongation bei 72 °C über 120 Sekunden.

2.2.3 Overlap extension PCR

Die Fusion verschiedener Proteine bzw. das Einbringen von Mutationen in vorhandene DNS-Stränge erforderte den Einsatz speziell erstellter Primer. Diese wurden mit der Software SnapGene designt und von Metabion individuell anfertigt. Zur Fusion zweier DNS-Moleküle wurden die Primer so konstruiert, dass sie am zu verbindenden Ende des einen DNS-Moleküls einen etwa zwanzig Basenpaare langen 5'-Überhang (engl. *overlap*) aufwiesen, der komplementär zum Ende des anderen DNS-Moleküls war. Dies erfolgte jeweils für beide benötigten DNS-Moleküle. Nach einer ersten PCR, die getrennt erfolgte, wurden die beiden DNS-Stücke in einer zweiten PCR zusammengefügt (Abbildung 8). Zwischen diesen beiden Schritten musste die DNS aufgereinigt werden. Um eine spezifische Mutation einzufügen wurde die entsprechende Nukleotid-Sequenz im Primer ausgetauscht.

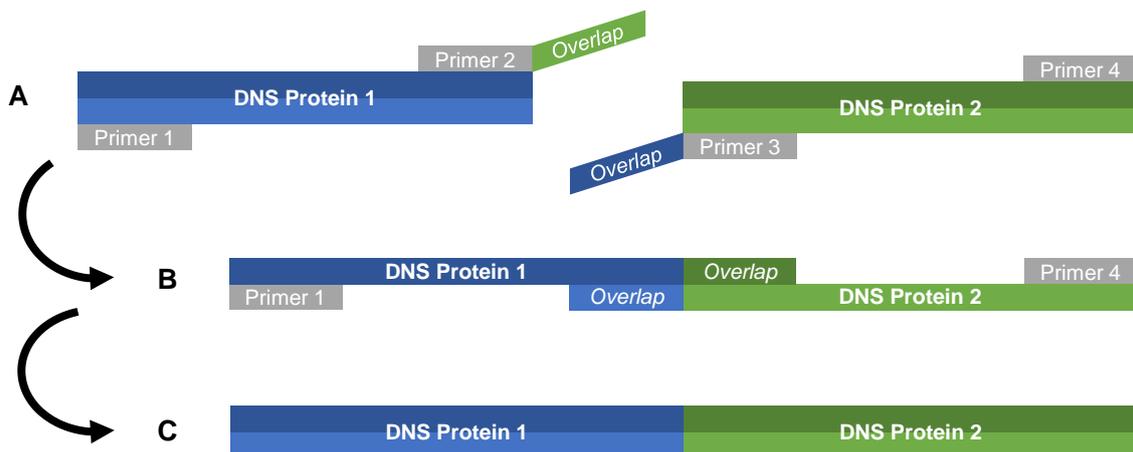


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Fusion zweier DNS-Sequenzen mittels overlap extension PCR. (A) Erste, getrennt erfolgende PCR mit zwei verschiedenen DNS-Sequenzen und Primern mit 5'-Überhang. **(B)** Hybridisierung der DNS-Stränge während der zweiten PCR. **(C)** Fusionierte DNS-Sequenzen.

2.2.4 Restriktionsverdau

Um für die Ligation einen Einzelstrang-Überhang zu generieren, wurde 1 µg aufgereinigter DNS mit 2 µl Restriktionspuffer mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 19 µl verdünnt. Anschließend wurden 5 U eines Restriktionsenzymes hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Ligation

Restringierte und aufgereinigte DNS-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 von Vektor zu *Insert* gemischt. Mit 2 µl eines Ligase-Puffers und 400 U einer Ligase wurde die Suspension mit ddH₂O auf 20 µl verdünnt und für 16 Stunden bei 16 °C inkubiert.

2.2.6 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

E. coli des Stammes MACH1 wurden auf Eis langsam aufgetaut, 1 µg der DNS in Plasmid-Form hinzugegeben und zusammen für ca. 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten, bevor die Proben weiterverarbeitet wurden.

2.2.7 Gewinnung von Einzelklon-Plasmiden

Transformierte MACH1 wurden für eine Stunde in 1 ml LB-Flüssigmedium geschwenkt und anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen; jeweils unter Inkubation bei 37 °C. Bakterien, welche das Ampicillin-Resistenz-vermittelnde Plasmid in sich aufgenommen hatten und Kolonien bildeten, konnten mit einer Pipettenspitze einzeln geerntet werden.

2.2.8 Vervielfältigung von DNS-Plasmiden

Transformierte oder wie in 2.3.7 beschrieben selektierte MACH1 wurden in 5 bzw. 300 ml ampicillinhaltigem LB-Flüssigmedium gehalten und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der Plasmide mithilfe des Miniprep bzw. Maxiprep Systems – protokollkonform durch Lyse der Bakterien, mehrmaliges Waschen und Filtrieren sowie anschließendes Resuspendieren mit ddH₂O.

2.2.9 Sequenzierung

Zur Bestimmung der exakten Basenabfolge wurden 4 bis 7 ng einer DNS-Probe in einem Gesamtvolumen von 17 µl mit 0,5 µM eines entsprechenden Primers an die Firma Eurofins Genomics übersandt und dort sequenziert.

2.3 Zelluläre Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der Umgang mit ihnen erfolgte ausschließlich in einer Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen.

2.3.2 Bestimmung der Zellkonzentration

Anhand des Trypanblau-Exklusionstests wurde zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden. Die Zellzahl wurde unter adäquater Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und folgenderweise berechnet:

Zellzahl pro ml = gezählte Zellen in einer Kammer x Verdünnungsfaktor x 10⁴

2.3.3 Beschichten von Zellkulturplatten

In Zellkulturplatten wurden 2 µg/ml eines gewünschten Antikörpers oder 12,5 µg/ml RetroNectin in PBS verdünnt ausgebracht und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Vor dem Auftragen der Zellen wurde die Platte mit Antikörper- bzw. RetroNectin-*Blocking*-Puffer für 30 Minuten geblockt und anschließend einmal mit PBS bzw. RetroNectin Wasch-Puffer gewaschen.

2.3.4 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

In dieser Arbeit verwendete, immortalisierte Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen gehalten und lichtmikroskopisch regelmäßig auf Zeichen von Zelltod oder mikrobieller Infektion untersucht. Abhängig von ihrer individuellen Konfluenz wurden sie in regelmäßigen Abständen passagiert. Dabei wurden die Zellen gewaschen und anschließend in frischem Medium kultiviert; adhärente Zelllinien zuvor mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Eine Kontamination mit Mycoplasmen wurde durch regelmäßige molekularbiologische Tests ausgeschlossen.

2.3.5 Gewinnung von primären, humanen T-Zellen

Zur Isolation primärer, humaner T-Zellen wurde eine heparinisierte, venöse Blutprobe mit einer Separierlösung der Dichte 1,077 g/ml zentrifugiert. Der dabei entstandene Gradient trennte Erythrozyten von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), welche folglich mittels einer Stripette separiert werden konnten. Anschließend wurden CD3 positive T-Zellen mittels *magnetic-activated cell sorting* (MACS) selektiert.

2.3.6 Kultivierung von primären, humanen T-Zellen

Täglich wurden die in 6-Well-Platten kultivierten, primären T-Zellen unter dem Lichtmikroskop auf ihre Vitalität überprüft. Im Abstand von 48 Stunden wurden sie auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml in frischem, humanen T-Zell Medium eingestellt.

2.3.7 Transfektion der Verpackungszelllinie Platinum A

Die zur Virusproduktion eingesetzten Platinum A wurden in 6-Well-Platten ausgebracht und über Nacht inkubiert, bis deren Konfluenz etwa 60 bis 70 % erreichte. 37,5 μ mol Kalziumchlorid und 18 μ g Plasmid-DNA wurden mit ddH₂O auf 150 μ l verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit oben beschriebenem Transfektionspuffer gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung auf den plattierten Zellen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde nach den ersten 6 Stunden erneuert, bevor nach 48 und 72 Stunden der Virusüberstand geerntet wurde.

2.3.8 Retrovirale Transduktion von primären, humanen T-Zellen

Zur Vorbereitung wurden je vier Millionen primäre, humane T-Zellen mit 33 μ l anti-CD3-anti-CD28 Dynabeads für 48 Stunden in anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 6-Well-Platten vorstimuliert. Der durch die Transfektion von Platinum A gewonnene Virusüberstand wurde für 90 Minuten bei 3.000 x g und 32 °C auf RetroNectin-beschichtete 24-Well-Platten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand aus den Wells ersetzt durch jeweils etwa 0,5 Millionen T-Zellen, versetzt mit 4 ng/ml Polybrene. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 800 x g und 32 °C für 30 Minuten wurden 90 % des Überstandes durch humanes T-Zell-Medium ohne Polybrene

ausgetauscht. Im Abstand von 24 Stunden erfolgten zwei Transduktionen. Die erreichte Transduktionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

2.3.9 Stimmulationsassay

300.000 T-Zellen wurden mit 30.000 Tumorzellen in 96-Well-Platten kokultiviert. Das Medium wurde dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Antikörper versetzt. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen und deren IFN- γ -Gehalt mittels *ELISA* untersucht.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Magnetic-activated cell sorting

Je 10^7 PBMC wurden in 80 μ l kaltem MACS-Puffer suspendiert und mit 20 μ l humanen CD3 Microbeads für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach anschließendem Auswaschen ungebundener *Microbeads* durch Zentrifugation wurden die suspendierten Zellen in eine Säule pipettiert, die in einem MACS-Rack montiert war. Nach erneutem Waschen wurde die Säule aus dem magnetischen Rack genommen und die mit MACS-Puffer unter Druck ausgespülten, CD3-positiven Zellen aufgefangen.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Expression von Zelloberflächen-Proteinen wurde FACS Canto II von BD Biosciences verwendet. Vorbereitend wurden jeweils 5×10^5 Zellen in FACS Puffer gelöst und mit 0,5 bis 1 μ g eines Antikörpers für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen. Zur Bindung der Oberflächenantigene wurden entweder fluoreszenzmarkierte oder ungekoppelte Antikörper eingesetzt. Letztere mussten in einem weiteren Schritt mit 1 bis 1,5 μ g eines fluoreszenzmarkierten Sekundär-antikörpers angefärbt werden. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurden sie nochmals zweimal mit FACS Puffer gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in 1 ml FACS Puffer resuspendiert. Auf diese Weise ermittelte Daten wurden mit der Software FlowJo ausgewertet.

2.4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

Für *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) wurde der *Capture Antibody* 1:200 in *Coating-Puffer* verdünnt, je 50 µl in eine 96-Well Assay Platte pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zwischen mehrmaligem, intermittierendem Spülen mit Wasch-Puffer wurden die Assay Platten anschließend unter ständigem Schwenken sequenziell mit jeweils 50 µl inkubiert: Für eine Stunde mit Verdünnungs-Puffer; anschließend für zwei Stunden mit in Serie verdünntem IFN-γ-Standard sowie ebenfalls in Verdünnungs-Puffer verdünnten Kokultur-Überständen; folgend mit 1:200 verdünntem *Detection Antibody* über eine Stunde; im Anschluss daran mit 1:10³ verdünntem Avidin-HRP für 30 Minuten und mit *TMB Substrate Solution*, bis ein adäquater Farbumschlag erreicht war und die Reaktion mit Schwefelsäure abgestoppt werden konnte. Mit einem Photometer wurde anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert. In Relation zu dem aufgetragenen Standard konnten die IFN-γ-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

2.5 Statistische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler desselben (*standard error of the mean, SEM*) dargestellt. Ihre statistische Signifikanz wurde durch den zweiseitigen Student t-Test ermittelt, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als signifikant angenommen wurde. Die Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software Version 5.0.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Expression von CD16 auf primären, humanen T-Zellen

Durchflusszytometrische Untersuchungen mit einem anti-human CD16-Fluoreszenzantikörper zeigten keine Anfärbung von primären, humanen T-Zellen. Somit konnte bestätigt werden, dass diese Zellen über keine endogene Expression von CD16 verfügen (Abbildung 9).

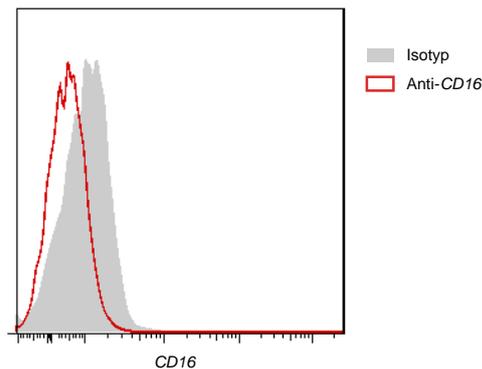


Abbildung 9: Analyse der Expression von CD16 auf primären, humanen T-Zellen.

Durchflusszytometrische Untersuchung primärer, humaner T-Zellen mittels anti-human CD16-Fluoreszenzantikörper und dessen entsprechenden Isotyp zur Negativkontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängig durchgeführter Untersuchungen.

3.2 Generierung von chimären Antigen-Rezeptoren mit CD16

3.2.1 Aufbau der CD16-Fusionsrezeptoren

Mittels *overlap extension* PCR wurden unterschiedliche Abschnitte von verschiedenen Proteinen fusioniert. Für die neuen, chimären Antigen-Rezeptoren wurde die Extrazellulärdomäne des Rezeptors CD16a übernommen. Um den Einfluss bekannter Genvarianten untersuchen zu können, wurden drei verschiedene Konstrukte erstellt: Der als hochaffin beschriebene SNP 158V kombiniert mit 48L beziehungsweise 48H sowie der als niedrigaffin beschriebene SNP 158F gemeinsam mit 48L. Diese drei Genvarianten wurden jeweils mit der Transmembrandomäne von CD28 fusioniert. Als Variante wurden auch Rezeptoren mit der transmembranen Domäne von CD16 erstellt. Die intrazellulären Rezeptoranteile bestehen aus einer Fusion der entsprechenden Protein-Domänen von CD3 ζ , welches physiologischer Weise mit dem T-Zell Rezeptor assoziiert ist und CD28, das ein kostimulatorisches Signal vermittelt (Murphy 2012, Kapitel 7). Als Negativkontrolle für funktionelle Versuche wurden außerdem Konstrukte ohne intrazelluläre Signaldomänen kloniert (Abbildung 10).

Für alle beschriebenen Konstrukte wurde als *Backbone* der Vektor pMP71 verwendet. Beim Abgleich mit der Datenbank BLAST® ergaben die klonierten Konstrukte eine Übereinstimmung von 100 % mit den Proteinen CD16, CD28 beziehungsweise CD3ζ.

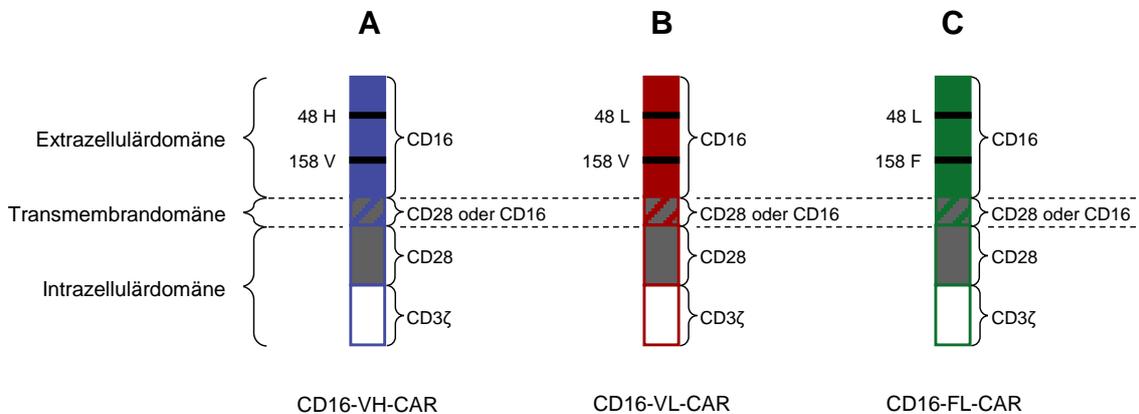


Abbildung 10: Schematische Darstellung der CD16-CAR. Die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren stammt von CD16 und enthält unterschiedlich kombinierte Einzelnukleotid-Polymorphismen: **(A)** 48H und 158V; **(B)** 48L und 158V; **(C)** 48L und 158F. Als Transmembrandomäne wurden entsprechende Abschnitte von CD28 bzw. von CD16 übernommen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer Fusion von CD28 und CD3ζ. Zur Negativkontrolle für funktionelle Versuche wurden jeweils auch Varianten ohne Intrazellulärdomäne erstellt (nicht dargestellt).

3.2.2 Nachweis der Exprimierbarkeit

Primäre, humane T-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Konstrukten transduziert. Die Expressionsrate der CD16-CAR wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei zeigten chimäre Antigen-Rezeptoren mit der Transmembrandomäne von CD16 eine geringere Expressionsrate, als ihre Pendants mit CD28 im transmembranären Abschnitt (Abbildung 11). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente mit Rezeptoren der CD28-Transmembran-Variante durchgeführt.

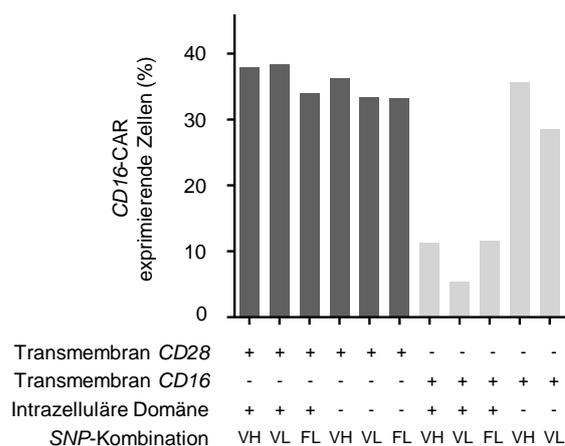


Abbildung 11: Expression der CD16-CAR in transduzierten primären, humanen T-Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der CD16-CAR exprimierenden primären T-Zellen, zwei Tage nach Transduktion. Nachgewiesen anhand von Durchflusszytometrie nach Färbung mit einem anti-human CD16 Fluoreszenz-Antikörper. Zur Kontrolle diente dessen Isotyp. Die Daten sind repräsentativ für zwei biologisch unabhängige Experimente.

3.2.3 Nachweis der Funktionalität

Zur Überprüfung des Versuchskonzepts für den späteren Vergleich der glykomodifizierten Antikörper, wurde im nächsten Schritt die Funktionalität der klonierten Rezeptoren untersucht. Dazu wurden primäre, humane T-Zellen transduziert und in einem Stimulationsversuch mit humanen, EGFR-exprimierenden Panc-1 Pankreaskarzinomzellen für 48 Stunden in Kokultur gehalten. Dies geschah jeweils unter dem Zusatz von klinisch zugelassenen anti-EGFR Antikörpern: Der IgG2-Subklassen-Antikörper Panitumumab als Negativkontrolle sowie aufsteigende Konzentrationen des IgG1-Subklassen-Antikörpers Cetuximab. Als Parameter für das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung wurde anschließend die Konzentration von IFN- γ im Überstand bestimmt (Abbildung 12).

Untransduzierte oder mit CD16-del-CAR transduzierte T-Zellen konnten durch Antikörperzugabe zu keiner verstärkten Sekretion von IFN- γ angeregt werden. Dagegen zeigten mit CD16-VH- und CD16-VL-CAR transduzierte T-Zellen eine dosisabhängige IFN- γ -Ausschüttung unter Anwesenheit von Tumorzellen und Cetuximab. Da der Rezeptor CD16 keine Antikörper der Subklasse IgG2 binden kann, führte Panitumumab auch in Kombination mit diesen CAR erwartungsgemäß zu keiner

gesteigerten IFN- γ -Freisetzung. Mit dem CD16-FL-CAR transduzierte T-Zellen konnten durch Cetuximab lediglich zu einer geringfügig erhöhten, aber dennoch gesteigerten IFN- γ -Sekretion angeregt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass CD16-CAR spezifisch T-Zell-Aktivität vermitteln.

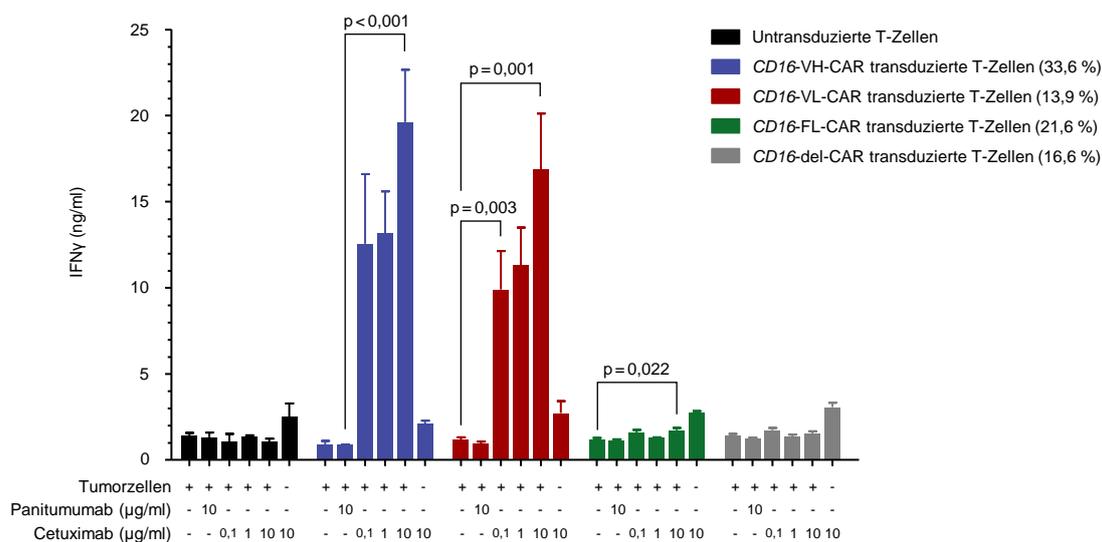


Abbildung 12: Kokultur von CD16-CAR transduzierten, primären T-Zellen und EGFR⁺ Tumorzellen mit anti-EGFR Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG2.

Anhand von ELISA ermittelte IFN- γ -Konzentrationen im Überstand einer 48 Stunden andauernden Kokultur von CD16-CAR-transduzierten, primären T-Zellen und EGFR⁺ Pankreastumorzellen (Panc-1) im Verhältnis von 10:1 (E:T). Zugewetzt waren anti-EGFR Antikörper der Subklassen IgG2 (10 $\mu\text{g/ml}$ Panitumumab) und IgG1 (0,1; 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ ohne Tumorzellen). Die jeweiligen Transduktionseffizienzen zu den einzelnen Rezeptorvarianten sind in der Legende mit angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei technischen Replikaten. Die Daten sind repräsentativ für drei biologisch unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben.

3.3 Analyse des Effekts von Antikörper-Glykomodifizierung auf die Aktivität CD16-CAR transduzierter T-Zellen

3.3.1 Untersuchung am Beispiel des anti-CD20 Antikörper GA101

Um den Einfluss der Antikörper-Glykomodifizierung in Abhängigkeit von den SNP-Varianten der CD16-CAR zu untersuchen, wurde der klinisch bereits zugelassene Antikörper Obinutuzumab alias GA101GE verwendet, sowie dessen wildtyp-Variante GA101. Als Positivkontrolle diente der anti-CD20 Antikörper Rituximab, als Negativkontrolle der anti-EGFR Antikörper Cetuximab. Mit CD16-CAR transduzierte, primäre T-Zellen wurden für 48 Stunden mit humanen Burkitt-Lymphomzellen Raji kokultiviert, welche CD20 exprimieren, EGFR dagegen nicht. Im Anschluss daran wurde als T-Zell-Aktivitätsparameter der IFN- γ -Gehalt im Überstand analysiert (Abbildung 13).

T-Zellen, die nicht, oder aber mit CD16-del-CAR, transduziert wurden, konnten durch die Zugabe von Antikörpern zu keiner vermehrten IFN- γ -Sekretion angeregt werden. Ebenso verhielten sich T-Zellen mit funktionellen CD16-Fusionsrezeptoren in der mitgeführten Negativkontrolle mit Cetuximab. In der Positivkontrolle mit Rituximab zeigten diese dagegen eine stark erhöhte Freisetzung von IFN- γ . Unter Titration der beiden, zu vergleichenden anti-CD20 Antikörpern ist eine dosisabhängige Steigerung der IFN- γ -Ausschüttung zu erkennen - jedoch nur, sofern Antigen-tragende Tumorzellen kokultivierten. Dabei zeigte bei allen getesteten Rezeptorvarianten die Fucose-reduzierte Form des Antikörpers eine deutliche Überlegenheit gegenüber GA101 sowie gegenüber Rituximab.

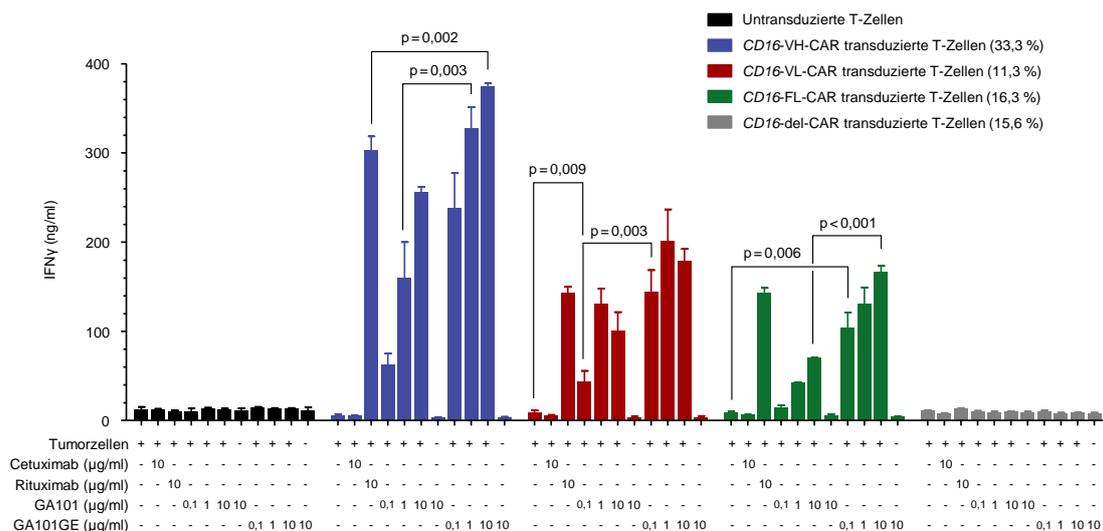


Abbildung 13: Vergleich von GA101 und GA101GE in einer Kokultur von CD16-CAR-transduzierten, primären T-Zellen und CD20⁺ Tumorzellen.

Mittels ELISA gemessene IFN- γ -Konzentrationen im Überstand nach 48 Stunden Kokultur von untransduzierten bzw. CD16-CAR-transduzierten, primären T-Zellen und Raji-Tumorzellen im Verhältnis von 10:1 (E:T). Jeweils unter Zusatz von Antikörpern zur Negativ- (10 μ g/ml Cetuximab) beziehungsweise Positivkontrolle (10 μ g/ml Rituximab) sowie GA101 und GA101GE in verschiedenen Dosierungen (0,1; 1 und 10 μ g/ml sowie 10 μ g/ml ohne Tumorzellen). Die jeweiligen Transduktionseffizienzen der einzelnen Rezeptorvarianten sind in der Legende mit angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei technischen Replikaten. Die Daten sind repräsentativ für drei biologisch unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben.

3.3.2 Untersuchung am Beispiel des anti-MCSP Antikörper LC007

Der Effekt von Antikörper-Glykomodifizierung wurde des Weiteren anhand des anti-MCSP Antikörper LC007 untersucht und seine glykomodifizierte Form (LC007GE) mit seiner wildtyp-Form (LC007) verglichen. Erneut wurde der Überstand einer 48 Stunden dauernden Kokultur von CD16-CAR-transduzierten T-Zellen mit humanen, MCSP-exprimierenden Melanomzellen MV3 auf dessen IFN- γ -Gehalt getestet (Abbildung 14).

Dabei zeigten sämtliche Konditionen ohne Tumorzellen eine leicht erhöhte Freisetzung von IFN- γ . Eine Erhöhung der IFN- γ -Sekretion konnte dagegen ausschließlich Antigen-gebundener LC007GE in T-Zellen mit funktionellen CAR hervorrufen. Diese wies dabei eine Dosisabhängigkeit auf.

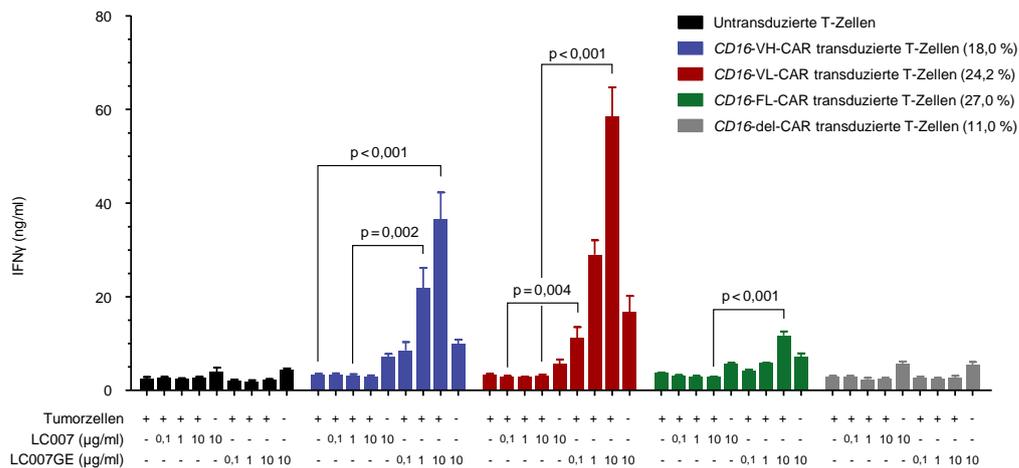


Abbildung 14: Vergleich von LC007 und LC007GE in einer Kokultur von CD16-CAR-transduzierten, primären T-Zellen und MCSP⁺ Tumorzellen.

Nach 48 Stunden Kokultur von CD16-Rezeptor transduzierten, primären T-Zellen und MV3-Tumorzellen im Verhältnis von 10:1 (E:T) wurde die IFN- γ -Konzentration in deren Überständen mittels ELISA bestimmt. Neben einer Titration der beiden MCSP-Antikörper (jeweils 0,1; 1; 10 µg/ml und 10 µg/ml ohne Tumorzellen) wurde eine Kondition ohne den Zusatz der Antikörper eingeschlossen. Die jeweiligen Transduktionseffizienzen der einzelnen Rezeptorvarianten sind in der Legende mit angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens drei technischen Replikaten. Die Daten sind repräsentativ für drei biologisch unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mit einem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte Stichproben.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue, funktionelle CD16-CAR mit verschiedenen Kombinationen von Einzelnukleotid-Polymorphismen erstellt werden. Dabei zeigten Rezeptoren mit einem Anteil von CD28 im transmembranären Abschnitt die beste Expressionsrate. Es wurde nachgewiesen, dass die CD16-CAR fähig sind, transduzierte T-Zellen zu aktivieren – sowohl Antikörperdosis-abhängig, als auch spezifisch. Folglich führten sie ausnahmslos zur T-Zell-Aktivierung unter gleichzeitiger Präsenz eines IgG1-Antikörpers sowie von Tumorzellen, welche das entsprechende Antigen exprimieren.

Beim Vergleich des anti-CD20 Antikörpers GA101 mit seiner glykomodifizierten Variante GA101GE konnten zwar beide Formen eine dosisabhängige Aktivierung der transduzierten T-Zellen hervorrufen, jedoch führte die Glykomodifikation des Antikörpers zu einer Verstärkung der T-Zell-Antwort. Mit dem anti-MCSP Antikörper LC007 konnte in den durchgeführten Experimenten keine T-Zell-Aktivierung erreicht werden. Dessen glykomodifizierte Variante aktivierte dagegen CD16-CAR-transduzierte T-Zellen dosisabhängig.

4.2 Evaluation der neu generierten CD16-CAR

4.2.1 Struktur der neu generierten CD16-CAR

Die Struktur der in dieser Arbeit generierten Rezeptoren unterscheidet sich in einigen Punkten von bisher publizierten CD16-CAR. Diese trugen in der Mehrzahl der Veröffentlichungen den Einzelnukleotid-Polymorphismus 158V in deren Extrazellulärdomäne (Clémenceau et al. 2006; D'Aloia et al. 2016; Kudo et al. 2014; Ochi et al. 2014). Im Gegensatz dazu, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Rezeptoren mit dem SNP 158F sowie Kombinationen mit verschiedenen SNP an Aminosäureposition 48 kloniert.

Im transmembranären Abschnitt bestanden die CD16-CAR der Gruppe Clémenceau et al. aus FcεR1γ, die Rezeptoren von Ochi et al. aus CD3ζ und Kudo et al. sowie D'Aloia et al. implizierten Abschnitte des Proteins CD8 (Clémenceau et al. 2006; D'Aloia et al. 2016; Kudo et al. 2014; Ochi et al. 2014). Die beiden letzteren verwendeten Proteine haben gemein, dass sie physiologischer Weise von T-Zellen exprimiert werden (Murphy 2012, Kapitel 7). Dies stützt die Beobachtung aus vorliegender Arbeit, dass

das T-Zell-eigene CD28 im transmembranen Rezeptorabschnitt zu einer höheren Expressionsrate führt, als CD16, welches nicht physiologisch von T-Zellen exprimiert wird (Murphy 2012, Kapitel 7; Nagelkerke et al. 2014).

Da bekannt ist, dass strukturelle Unterschiede der intrazellulären CAR-Endodomänen Einfluss auf die T-Zell-Funktionen haben, verglich die Gruppe von Kudo et al. den bis dahin publizierten CD16-CAR der ersten Generation mit dem von ihnen entworfenen CD16-CAR der zweiten Generation (D'Aloia et al. 2016; Kudo et al. 2014). Dieser enthält eine zusätzliche, kostimulatorische Endodomäne und führte zu einer stärkeren Aktivierung, Proliferation und Zytotoxizität der transduzierten T-Zellen (Kudo et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch bei anderen chimären Antigen-Rezeptoren beobachten (June et al. 2018). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die in dieser Promotionsarbeit generierten CD16-CAR die intrazelluläre Domäne von CD3 ζ mit der des kostimulatorischen Proteins CD28 kombiniert, um eine optimale Funktionalität der Rezeptoren zu gewährleisten.

4.2.2 Funktionalität der neu generierten CD16-CAR

4.2.2.1 CD16-CAR ermöglichen T-Zellen Antikörper-abhängige Tumorzell-Lyse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klonierten CD16-CAR *in vitro* zu einer Aktivierung von T-Zellen führen können. Dass sie außerdem Zytotoxizität vermitteln, konnten Rataj et al. ebenfalls *in vitro* nachweisen (Rataj et al. 2018). Dies war bei untransduzierten T-Zellen nicht der Fall, welche physiologischer Weise kein CD16 exprimieren (Bournazos et al. 2017; Murphy 2012, Kapitel 10). Die Zusammenschau führt zu dem Schluss, dass die generierten Rezeptoren T-Zellen zu Antikörper-abhängiger Tumorzell-Lyse befähigen.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit Erfahrungen von sechs weiteren Arbeitsgruppen (Clémenceau et al. 2006; D'Aloia et al. 2016; Kudo et al. 2014; Motz et al. 2018; Ochi et al. 2014; Tanaka et al. 2016). Dass diese Erkenntnisse auch auf *in vivo* Experimente übertragbar sind, konnten die Gruppen von Ochi, Kudo und Tanaka et al. zeigen. Hier führte der adoptive Zelltransfer von CD16-CAR transduzierten T-Zellen zu einer Inhibition des Tumorwachstums sowie zum verlängerten Überleben bei Mäusen mit B-Zell-Lymphomen bzw. mit adulter T-Zell-Leukämie (Kudo et al. 2014; Ochi et al. 2014; Tanaka et al. 2016). Dieser von CD16-CAR-T-Zellen vermittelte Effekt wird jedoch von verschiedenen Faktoren beeinflusst.

4.2.2.2 Beeinflussende Faktoren auf den Effekt von CD16-CAR-T-Zellen

Der zytotoxische Effekt von CD16-CAR-T-Zellen scheint von mehreren Faktoren abhängig zu sein: Ochi et al. zeigten, dass das Antigen-Expressionslevel einer Zielzelle das Ausmaß der vermittelten T-Zell-Zytotoxizität beeinflusst (Ochi et al. 2014). Auch die Subklasse des eingesetzten Antikörpers ist entscheidend: Da Panitumumab nicht zu einer Aktivierung CD16-CAR transduzierter T-Zellen führte, bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit gängige Literatur dahingehend, dass CD16 keine IgG2-Antikörper binden kann (Murphy 2012, Kapitel 10).

Des Weiteren zeigen sämtliche veröffentlichte Untersuchungen mit CD16-CAR, inklusive der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, dass es ausschließlich unter gleichzeitiger Präsenz von Antigen und passendem Antikörper zu einem Effekt kommt (Clémenceau et al. 2006; D'Aloia et al. 2016; Kudo et al. 2014; Ochi et al. 2014; Rataj et al. 2018; Tanaka et al. 2016). Dieser Aspekt ist von besonderer klinischer Relevanz im Hinblick auf die Patientensicherheit dieses Therapieansatzes. Selbst bei einer Überdosierung des Antikörpers kommt es ohne Beisein eines Antigens zu keiner Aktivität von CD16-CAR-T-Zellen (Clémenceau et al. 2006). Liegt jedoch ein Antigen vor, hängt das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung von der eingesetzten Antikörperkonzentration ab. Auch in diesem Punkt decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit mit denen weiterer Arbeitsgruppen (Ochi et al. 2014; Tanaka et al. 2016).

Schließlich haben auch die Genvarianten der Rezeptoren Einfluss auf den Effekt, der von CD16-CAR transduzierten T-Zellen vermittelt wird. Bei vorliegender Promotionsarbeit stellte die methodisch bedingte, ausgeprägte Heterogenität der einzelnen Transduktionseffizienzen eine große Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurde gegen eine Angleichung derselben vor funktionellen Versuchen entschieden - auch, wenn somit kein direkter Vergleich der einzelnen Rezeptorvarianten möglich ist.

Kudo et al. konnten jedoch anhand des Beispiels Rituximab zeigen, dass die oben bereits beschriebene, höhere Affinität der 158V-Rezeptorvarianten auch für CD16-CAR gilt (Kudo et al. 2014). Für Cetuximab, LC007GE sowie die drei auch in dieser Arbeit verwendeten anti-CD20 Antikörper konnten Rataj et al. nachweisen, dass die 158V-tragenden CD16-CAR zu einer stärkeren T-Zell-Aktivität führen. Der SNP 48H bzw. 48L zeigte darauf keinen Einfluss (Rataj et al. 2018).

In Kombination mit Cetuximab konnte der CD16-FL-CAR in transduzierten Zellen lediglich eine geringfügige Aktivierung hervorrufen. Eine ähnliche Beobachtung für Cextuximab-Therapien machten auch Taylor et al.: NK-Zellen von Spendern mit homozygotem Genotyp 158 F/F wiesen im Vergleich zu solchen mit mindestens einem 158V-Allel eine unterlegene, zytotoxische Aktivität auf (Taylor et al. 2009). In weiteren Untersuchungen zeigten Taylor und seine Gruppe aber, dass der Rezeptor-Genotyp alleine keinen Rückschluss auf klinische Resultate, wie beispielsweise das progressionsfreie Überleben, erlauben (Taylor et al. 2015).

Trotz einer widersprüchlichen Studienlage bezüglich des Einflusses der CD16-Genotypen unter Cetuximab-Therapie, decken sich diese Erkenntnisse von Taylor et al. mit dem sich abzeichnenden Konsens, dass der SNP 158 kein prädiktiver Biomarker für klinische Ergebnisse zu sein scheint (Liu et al. 2016; Mellor et al. 2013; Ying et al. 2015). Ähnliches zeichnet sich auch für Rituximab-Therapien ab (Kenkre et al. 2016; Mellor et al. 2013).

4.3 Analyse des Effekts von Antikörper-Glykomodifikation

4.3.1 Vergleich von glykomodifizierten und nicht-glykomodifizierten Antikörpern

Um den Effekt der Antikörper-Glykomodifikation im Rahmen dieser Arbeit zu analysieren, wurden die Ergebnisse der wildtyp- und glykomodifizierten Antikörpervarianten in den Stimulationsversuchen mithilfe des zweiseitigen Student t-Tests verglichen. Hierbei zeigte sich eine eindeutige Überlegenheit der Fucose-reduzierten Antikörper. Um diese Überlegenheit noch detaillierter zu untersuchen, kann die IFN- γ -Sekretion der stimulierten T-Zellen, jeweils vermittelt durch die beiden Antikörpervarianten, zu einander ins Verhältnis gesetzt werden:

$$\text{GE-Faktor} = \frac{\text{IFN}\gamma\text{-Sekretion, vermittelt durch glykomodifizierten Antikörper}}{\text{IFN}\gamma\text{-Sekretion, vermittelt durch nicht-glykomodifizierten Antikörper}}$$

Damit spiegelt der GE-Faktor die Vervielfachung der IFN- γ -Sekretion wider, welche durch die Antikörper-Glykomodifikation bedingt ist.

In sämtlichen Konditionen betrug der GE-Faktor > 1 . Dies zeigt, dass die untersuchten, Fucose-reduzierten Antikörper eine stärkere Aktivierung der CD16-CAR transduzierten T-Zellen induzieren, als ihre nicht-glykomodifizierten Varianten. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten bereits, dass diese Glykomodifikation *in vitro* zu einer Verbesserung von ADCC führt (Mirschberger et al. 2013; Mössner et al. 2012; Rataj et

al. 2018; Shields et al. 2002). Laut Shields et al. wirkt sich dies insbesondere bei niedrigeren Antikörper-Konzentrationen aus (Shields et al. 2002). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit für den Antikörper GA101GE bestätigt werden: Bei einer Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml führte die glykomodifizierte Antikörpervariante in abgebildetem Stimulationsversuch zu einer 4,7-fach höheren IFN-γ-Sekretion, als deren wildtyp-Variante. Wurden die untersuchten Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, betrug die Steigerung der IFN-γ-Ausschüttung nur mehr den Faktor 1,9.

LC007GE verhielt sich jedoch gegensätzlich: In dem oben gezeigten Stimulationsassay betrug der GE-Faktor bei einer Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml den Wert 2,6. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration führte jedoch auch zu einem größeren Unterschied zwischen den beiden Antikörper-Varianten (GE-Faktor bei einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml: 12,1). Grund für diese positive Korrelation des GE-Faktors mit der eingesetzten Antikörperkonzentration ist, dass die nicht-glykomodifizierte Antikörpervariante keinerlei T-Zell-Aktivität induzieren konnte.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Antikörper-vermittelte T-Zell-Aktivierung einer Suppression gegenüberstand, welche nur von der Fucose-reduzierten Antikörpervariante überwunden werden konnte. Eine Suppression könnte außerdem die leicht erhöhte T-Zell-Aktivität in Konditionen ohne die Tumorzellen MV3 erklären. Diese Annahme würde zudem Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen stützen, die zeigen, dass glykomodifizierte Antikörper weniger disponiert gegenüber inhibitorischer Einflüsse sind. Sie wiesen nach, dass eine Fucose-Reduktion von Antikörpern den inhibitorischen Effekt endogener IgG aus Patientenplasma abmildert (Iida et al. 2006; Mossner et al. 2010). Doch auch die Genvariante des gebundenen Fcγ-Rezeptors hat Einfluss darauf, wie ausgeprägt der Vorteil einer Antikörper-Glykomodifikation zu tragen kommt.

4.3.2 Interaktion von glykomodifizierten Antikörpern mit verschiedenen CD16-Rezeptor-Genvarianten

Grundlegend für die verbesserte Effektivität Fucose-reduzierter Antikörper ist deren erhöhte Bindungsaffinität zu CD16 (Li et al. 2017; Mössner et al. 2012; Shields et al. 2002). Dies gilt prinzipiell für beide Genvarianten des Rezeptors (Mossner et al. 2010; Shields et al. 2002). Dennoch wurde festgestellt, dass in einigen Fällen die niedrigaffine 158F-Variante durch eine solche Glykomodifikation einen größeren

Zugewinn an Affinität erzielen kann (Shields et al. 2002). Auch in Experimenten im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wies die FL-Variante des CD16-CAR in Kombination mit Obinutuzumab stets den größten GE-Faktor auf, welcher eben diesen Zugewinn funktionell widerspiegelt. Dies war auch der Fall, wenn der CD16-FL-CAR nicht die höchste Transduktionseffizienz aller funktionellen Rezeptoren aufwies, was darauf hinweist, dass der Effekt davon unabhängig zu sein scheint. Folgend sind exemplarisch die GE-Faktoren aus oben dargestelltem CD20-Stimulationsversuch bei einer Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml aufgeführt:

Tabelle 13: GE-Faktoren aus abgebildetem CD20-Stimulationsversuch bei einer Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml

Rezeptor-Genvariante	Transduktionseffizienz	GE-Faktor
CD16-VH-CAR	33,3 %	3,8
CD16-VL-CAR	11,3 %	3,4
CD16-FL-CAR	16,3 %	6,9

Kombiniert mit dem Antikörper LC007, profitierten hingegen CD16-CAR mit der Genvariante 158V stets stärker von dieser Glykomodifikation. Dieser Effekt war ebenfalls unabhängig von schwankenden Transduktionseffizienzen. Welcher SNP an Position 48 vorteilhafter scheint, war hingegen abhängig von der vorliegenden Transduktionseffizienz:

Tabelle 14: GE-Faktoren aus abgebildetem MCSP-Stimulationsversuch bei einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml

Rezeptor-Genvariante	Transduktionseffizienz	GE-Faktor
CD16-VH-CAR	18,0 %	13,1
CD16-VL-CAR	24,2 %	19,0
CD16-FL-CAR	27,0 %	4,0

Die Zusammenschau führt zu der Schlussfolgerung, dass vom jeweiligen Antikörper abhängt, welche Rezeptor-Genvariante mehr von einer Reduktion an Fucose profitieren kann.

4.4 Vorteile von CD16-CAR gegenüber anderen CAR

Gegenüber anderen, chimären Antigen-Rezeptoren weisen CD16-CAR diverse zusätzliche Vorteile auf. Der Bedeutendste darunter ist die dadurch ermöglichte Flexibilität: Allein limitiert durch die Verfügbarkeit zugelassener, monoklonaler Antikörper, können mit einem einzelnen zellulären Produkt verschiedenste Tumorantigene anvisiert werden – sowohl gleichzeitig als auch sequenziell (Caratelli et al. 2017; Rataj et al. 2018). Insbesondere vor dem Hintergrund, dass der Verlust oder die Veränderung der Antigen-Präsentierung häufige Escape-Mechanismen unter klassischen CAR-T-Zell-Therapien darstellen, ist dies ein entscheidender Vorteil zur Prävention derselben bzw. zur vereinfachten Anpassung der anti-tumoralen Therapie (Kudo et al. 2014; Rataj et al. 2018; Stoiber et al. 2019).

Auch im Hinblick auf deren Kommerzialisierung birgt die große Flexibilität von CD16-CAR einen enormen Vorteil: Denn die Bereitstellung einer großen Serie an zugelassenen CAR für verschiedenste Antigene scheint nicht realistisch; einerseits aus methodischen Gründen, andererseits aufgrund erheblicher regulatorischer Auflagen für die Entwicklung und Herstellung von gentechnisch veränderten Zellen (Ochi et al. 2014; Rataj et al. 2018).

Hinsichtlich der Patientensicherheit gelten CD16-CAR ebenfalls als vielversprechend: Unter Behandlung mit CD16-CAR-T-Zellen kann bei Auftreten von Komplikationen die Applikation des eingesetzten monoklonalen Antikörpers ausgesetzt werden, wodurch deren Wirkungsfähigkeit versiegt (Caratelli et al. 2017; Rataj et al. 2018). Zudem besteht die extrazelluläre Domäne von Antikörper-abgeleiteten CAR meist aus scFv murinen Ursprungs. Dies kann zu einer Immunantwort seitens des Patienten führen, was deren klinische Anwendung einschränken würde (D'Aloia et al. 2016). Doch die effektive Kollaboration von CD16-CAR-T-Zellen mit Antikörpern birgt das Risiko, dass sie aufgrund endogener, autoimmuner Immunglobuline auch weitere, körpereigene Antigene unbestimmt attackieren.

4.5 Risiko von Autoimmunität unter Therapie mit CD16-CAR-T-Zellen

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Antikörper binden zu können, werfen CD16-CAR die Frage nach möglicherweise vermittelter Autoimmunität auf. Zwar sollten infundierte CD16-CAR-T-Zellen nicht von endogenen, nicht-Antigen-gebundenen Antikörpern

stimuliert werden, dennoch könnten sie von Autoantikörpern zu einer Reaktion gegen körpereigenes Gewebe verleitet werden (Caratelli et al. 2017; Kudo et al. 2014).

Erste *in vitro* Untersuchungen mit polyklonalen, humanen Immunglobulinen in physiologisch vorkommenden Konzentrationen zeigten eine erhöhte Aktivierung und Zytotoxizität von hochaffinen, 158V-tragenden CD16-CAR-T-Zellen. In vivo könnte dieses Maß an T-Zell-Aktivierung zu Autoimmunität oder einem Zytokinsturm führen (Rataj et al. 2018). Zwar konnten zugesetzte PBMC sowohl die Aktivierung als auch die Zytotoxizität von CD16-CAR-T-Zellen hemmen und damit dem Effekt der polyklonalen Immunglobuline entgegenwirken (Rataj et al. 2018). Trotzdem sollte dieser Aspekt im Hinblick auf die Patientensicherheit weiter untersucht werden. Am Ende könnten deren Ergebnisse den Ausschluss von autoimmunerkrankten Patienten für CD16-CAR-Therapien erforderlich machen (Rataj et al. 2018). Um diesem Szenario entgegenzuwirken, werden Strategien untersucht, mittels derer CD16-CAR-T-Zellen die therapeutisch verabreichten Antikörper bevorzugt binden sollen.

4.6 Glykomodifizierte Antikörper als ideale Kombinationspartner für CD16-CAR-T-Zellen

Mit dem Ziel, CD16-CAR-T-Zellen die Diskrimination zwischen therapeutisch verabreichten und konkurrierenden, endogenen Antikörpern zu erleichtern, können Fucose-reduzierte, monoklonale Antikörper eingesetzt werden (Caratelli et al. 2017; Rataj et al. 2018). Diese weisen eine höhere Bindungsaffinität zu CD16 auf, als die mehrheitlich fucosyliert vorliegenden, endogenen Immunglobuline (Li et al. 2017). Einerseits erhofft man sich davon eine erhöhte Patientensicherheit und Effizienz der Therapie, andererseits eine Reduktion der benötigten Antikörper-Dosierungen, mit welchen jedoch ein äquivalentes, klinisches Ergebnis erzielt werden kann (Rataj et al. 2018; Shields et al. 2002).

Bisher sind mit Obinutuzumab, Mogamulizumab und Benralizumab drei monoklonale Antikörper mit teilweise oder komplett entfernter Fucose zugelassen, 23 weitere werden derzeit in klinischen Studien untersucht (Pereira et al. 2018). In Kombination mit CD16-CAR-T-Zellen wurde neben den Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit Obinutuzumab bereits Mogamulizumab mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht (Rataj et al. 2018; Tanaka et al. 2016).

4.7 Ausblick

CD16-CAR-T-Zellen sind ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von Tumoren. Gegenüber klassischen CAR implizieren sie mehrere Vorteile, insbesondere bezüglich ihrer klinischen Anwendbarkeit. Eine große Herausforderung stellt jedoch noch die Vermeidung von autoimmuner Aktivität dar. Dafür ist erforderlich, die Synergie zwischen therapeutischen Antikörpern und CD16-CAR zu optimieren.

Der Vorteil einer Fucose-Reduktion von Antikörpern konnte in dieser Promotionsarbeit herausgearbeitet werden. Im nächsten Schritt sollten CD16-CAR-T-Zellen jedoch gleichzeitig sowohl therapeutischen, glykomodifizierten Antikörpern sowie endogenen Immunglobulinen ausgesetzt werden, um die physiologische Konkurrenzsituation zu simulieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, welche Genvariante der CD16-CAR am stärksten von der Fucose-Reduktion der Antikörper profitiert. Für die Auswahl der optimalen Rezeptorvariante ist jedoch entscheidend, welche Polymorphismen-Kombination zur absolut gemessenen, stärksten Aktivierung der T-Zellen führt. Hierfür ist es notwendig, die Transduktionseffizienzen vor Stimulations- oder Zytotox-Versuchen anzugleichen.

Doch nicht nur durch das Angleichen der Transduktionseffizienzen können die Untersuchungen dieser CD16-CAR verbessert werden. In Titrationsversuchen mit selbiger könnte die ideale Transduktionseffizienz ermittelt werden, die zu dem maximalen Effekt führt.

Eine weitere Möglichkeit, den Ansatz von CD16-CAR-T-Zellen zugunsten der Patientensicherheit weiterzuentwickeln wäre, die aktuellen Rezeptoren um einen modularen Aufbau zu ergänzen: Durch eine Separation von CD3 ζ und der kostimulatorischen CD28-Domäne in zwei verschiedene Rezeptoren, die jeweils unterschiedliche Antigene anvisieren, kann eine höhere Spezifität erreicht werden. Möglich ist beispielsweise auch, die Transkription des zweiten Rezeptors erst bei Bindung des ersten Rezeptors anzuregen und auf diese Weise eine bispezifische Tumorantigen-Erkennung zu ermöglichen (Stoiber et al. 2019). Hierbei könnte der CD16-CAR führend eingesetzt werden, der jedoch nur zur Aktivierung einer T-Zelle führt, sofern der zweite, kostimulatorische CAR ebenfalls sein Antigen bindet.

Auch die Kombination mit einem inhibitorischen CAR kann die Patientensicherheit erhöhen (Stoiber et al. 2019). Darüber hinaus ermöglicht das Einbringen von Suizid-Genen eine selektive Ablation der transduzierten T-Zellen mittels kleiner Moleküle oder Antikörper (Jones et al. 2014). Zusammenfassend wird die weitere klinische Entwicklung von CD16-CAR-T-Zellen ihre Stärken und Grenzen aufzeigen.

5. Zusammenfassung

Als vielversprechender Ansatz zur Therapie von Tumoren sind CAR-T-Zellen bereits für bestimmte hämatologische Tumoren behördlich zugelassen. Das Auftreten von ausgeprägten Toxizitäten sowie unzureichenden langfristigen Therapieerfolgen, beispielsweise aufgrund veränderter Antigen-Präsentierung, limitieren jedoch deren klinischen Einsatz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Rezeptoren erstellt, welche T-Zellen nur in Kombination mit Antigen-gebundenen Antikörpern aktivieren und damit eine erhöhte Sicherheit sowie Flexibilität ihrer Zielspezifität ermöglichen. Diese Rezeptoren sind CAR der zweiten Generation und exprimieren verschiedene Genvariationen der extrazellulären Domäne des Fc γ -Rezeptors CD16a. Es konnte gezeigt werden, dass transduzierte CD16-CAR mit einem transmembrären Abschnitt von CD28 auf primären, humanen T-Zellen exprimiert werden können und in Kombination mit Antigen-gebundenen IgG1 T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen vermitteln.

Im Patientenplasma konkurrieren jedoch endogene Immunglobuline mit verabreichten, therapeutischen Antikörpern um die Fc γ -Rezeptorbindung und schwächen dadurch deren Effekt. Vor diesem Hintergrund gewinnen Faktoren an Bedeutung, die durch eine gesteigerte Bindungsaffinität zwischen therapeutischen Antikörpern und CD16 auch die Antikörper-vermittelte Immunantwort verstärken. Zu diesen zählt einerseits die hochaffine Genvariante 158V des Rezeptors selbst, andererseits eine Reduktion des Fucose-Anteils in der Glykosylierung von Antikörpern. In dieser Arbeit konnte anhand der Antikörper GA101 und LC007 gezeigt werden, dass der Vorteil einer Antikörper-Glykomodifikation auch bei CD16-CAR zu tragen kommt: Die Fucose-reduzierten Antikörper zeigten eine erhöhte T-Zell-Aktivierung bzw. konnten selbige unter Umständen induzieren, bei denen dies der nicht-glykomodifizierten Variante nicht möglich war. Welche Genvariante des Rezeptors CD16a am meisten Nutzen aus dieser Glykomodifikation ziehen kann, ist vom jeweils eingesetzten Antikörper abhängig: Unter der Präsenz von GA101 konnten CD16-FL-CAR-T-Zellen am meisten davon profitieren; in Kombination mit LC007 dagegen SNP-158V-tragende CAR.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Genvarianten eines CD16-CAR erstellt werden, die T-Zellen zu Antikörper-abhängiger Tumorzell-Lyse befähigen. Es konnte gezeigt werden, dass auch in diesem Ansatz eine Fucose-Reduktion von Antikörpern zu einer verstärkten Immunantwort führt. Welche damit kombinierte Genvariante des Rezeptors am stärksten davon profitiert, scheint vom jeweils eingesetzten Antikörper abzuhängen.

6. Literaturverzeichnis

Abu Sin M, Askar M, Beermann S, Bertz J, Buda S, Busch M, Du Y, Dudareva-Vizule S, Ellert U, Fehr A, Frank C, Fuchs J, Gärtner B, Gößwald A, Hamouda O, Hapke U, Hauer B, Heidemann C, Hense S, Hoebel J, Hölling H, Horch K, Jordan S, Kamtsiuris P, Knopf H, Krause L, Kraywinkel K, Kroll LE, Krug S, Kuntz B, Lampert T, Lange C, Langen U, Laußmann D, Manz K, Maske U, Matysiak-Klose D, Mensink GBM, Neuhauser H, Niemann H, Nowossadeck E, Paprott R, Poethko-Müller C, Prütz F, Rabenberg M, Rattay P, Rommel A, Ryl L, Saß AC, Scheidt-Nave C, Schienkiewitz A, Schilling R, Schlack R, Schlaud M, Schmitz R, Starker A, Thelen J, Varnaccia G, von der Lippe E, Wienecke A, Ziese T, Zimmermann R, Cordes M, Giesel F, Hundertmark-Mayser J, Mannschreck M, Maretzke S, Nowossadeck S, Ottovay K, Paul S, Pohlner S, Riedel-Heller S, Schelhase T, Thiel W, Wiese F, Wurm S. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 3. Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut; 2015.

Almagro JC, Daniels-Wells TR, Perez-Tapia SM, Penichet ML. Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy. *Frontiers in Immunology* 2018; 8:1751.

Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20.

Bournazos S, Wang TT, Dahan R, Maamary J, Ravetch JV. Signaling by antibodies: Recent progress. *Annual Review of Immunology* 2017; 35:285-311.

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. FCgamma chimeric receptor-engineered T cells: Methodology, advantages, limitations, and clinical relevance. *Frontiers in Immunology* 2017; 8:457.

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

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346:235-42.

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-opsinized target cells. *Cytotherapy* 2016; 18:278-90.

Gagez AL, Cartron G. Obinutuzumab: A new class of anti-CD20 monoclonal antibody. *Current Opinion in Oncology* 2014; 26:484-91.

Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5:235.

Habibi-Anbouhi M, Azadmanesh K, Behdani M, Hajizadeh-Saffar E, Vahabpour R, Shokrgozar MA. Development and characterization of a new antipeptide monoclonal antibody directed to human CD20 antigen. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 2015; 30:310-6.

Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters* 2015; 368:7-13.

Iida S, Misaka H, Inoue M, Shibata M, Nakano R, Yamane-Ohnuki N, Wakitani M, Yano K, Shitara K, Satoh M. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:2879-87.

Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Frontiers in Pharmacology* 2014; 5:254.

June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018; 359:1361-5.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U. Krebs in Deutschland für 2013/14. 11. Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; 2017.

Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity* 2013; 39:49-60.

Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *mAbs* 2019; 11:219-38.

Kenkre VP, Hong F, Cerhan JR, Lewis M, Sullivan L, Williams ME, Gascoyne RD, Horning SJ, Kahl BS. Fc gamma receptor 3a and 2a polymorphisms do not predict response to rituximab in follicular lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2016; 22:821-6.

Kobold S, Duewell P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S. Immunotherapy in tumors. *Deutsches Ärzteblatt International* 2015; 112:809-15.

Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997; 90:1109-14.

- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 1975; 256:495-7.
- Kohrt HE, Houot R, Marabelle A, Cho HJ, Osman K, Goldstein M, Levy R, Brody J. Combination strategies to enhance antitumor ADCC.
Immunotherapy 2012; 4:511-27.
- Kruger S, Ilmer 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.
Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 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 Research 2014; 74:93-103.
- Li W, Zhu Z, Chen W, Feng Y, Dimitrov DS. Crystallizable fragment glycoengineering for therapeutic antibodies development.
Frontiers in Immunology 2017; 8:1554.
- Liu G, Tu D, Lewis M, Cheng D, Sullivan LA, Chen Z, Morgen E, Simes J, Price TJ, Tebbutt NC, Shapiro JD, Jeffery GM, Mellor JD, Mikeska T, Virk S, Shepherd LE, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Zalcborg JR, Karapetis CS, Dobrovic A. Fc-gamma receptor polymorphisms, cetuximab therapy, and survival in the NCIC CTG CO.17 trial of colorectal cancer.
Clinical Cancer Research 2016; 22:2435-44.
- Ma T, Sun X, Cui L, Gao L, Wu Y, Liu H, Zhu Z, Wang F, Liu Z. Molecular imaging reveals trastuzumab-induced epidermal growth factor receptor downregulation in vivo.
Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine 2014; 55:1002-7.
- 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, Leibold D, Pulsipher MA, Grupp SA. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia.
The New England Journal of Medicine 2018; 378:439-48.
- Mellor JD, Brown MP, Irving HR, Zalcborg JR, Dobrovic A. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer.
Journal of Hematology & Oncology 2013; 6:1.
- Mirschberger C, Schiller CB, Schraml M, Dimoudis N, Friess T, Gerdes CA, Reiff U, Lifke V, Hoelzlwimmer G, Kolm I, Hopfner KP, Niederfellner G, Bossenmaier B. RG7116, a therapeutic antibody that binds the inactive HER3 receptor and is optimized for immune effector activation.
Cancer Research 2013; 73:5183-94.
- 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.

Mössner E, Tuffin G, Colombetti S, Freytag O, Moser S, Dunn C, Bacac M, Herter S, Otz T, Waldhauer I, Fauti T, van Puijenbroek E, Nicolini V, Freimoser A, Jäger C, Mundigl O, Georges G, Culton L, Manigold T, Gerdes C, Umana P, Klein C. Abstract LB-236: M4-3-ML2, a novel glycoengineered humanized IgG1 antibody, targeting a membrane-proximal epitope of MCSP/CSPG4 exhibits potent ADCC induction in vitro and in vivo anti-tumoral efficacy in disseminated melanoma models.
Cancer Research 2012; 72.

Motz G, Whiteman K, Shin J, Pai T, Judge C, Barnitz A, Hemphill J, Kim J, Ranger A, Huet H, McGinness K, Schultes B, Hodge G, Vasconcelles M, Ettenberg S. Abstract B105: ACTR707: A novel T-cell therapy for the treatment of relapsed or refractory CD20+ B cell lymphoma in combination with rituximab.
Molecular Cancer Therapeutics 2018; 17:B105-B.

Murphy K. Janeway's Immunobiology.
8. Auflage. New York: Garland Sciences; 2012.

Nagelkerke SQ, Kuijpers TW. Immunomodulation by IVIg and the role of Fc-gamma receptors: Classic mechanisms of action after all?
Frontiers in Immunology 2014; 5:674.

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 Immunology Research 2014; 2:249-62.

Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z. The "less-is-more" in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.
mAbs 2018; 10:693-711.

Peterson GM, Thomas J, Yee KC, Kosari S, Naunton M, Olesen IH. Monoclonal antibody therapy in cancer: When two is better (and considerably more expensive) than one.
Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 2018; 43:925-30.

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.
British Journal of Cancer 2018.

Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.
Science 2015; 348:62-8.

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2011; 17:4550-7.

Salles G, Barrett M, Foa R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience.

Advances in Therapy 2017; 34:2232-73.

Sausville E, Longo D. 103e Grundlagen der Krebstherapie. 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag; 2016.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.

Science 2011; 331:1565-70.

Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy.

Cancer Immunity 2012; 12:14.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.

Nature 2001; 410:1107-11.

Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity.

Journal of Biological Chemistry 2002; 277:26733-40.

Singha NC, Nekoroski T, Zhao C, Symons R, Jiang P, Frost GI, Huang Z, Shepard HM. Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy.

Molecular Cancer Therapeutics 2015; 14:523-32.

Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy.

Cells 2019; 8.

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.

Clinical Cancer Research 2016; 22:4405-16.

Taylor RJ, Chan SL, Wood A, Voskens CJ, Wolf JS, Lin W, Chapoval A, Schulze DH, Tian G, Strome SE. Fc γ RIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck.

Cancer Immunology, Immunotherapy 2009; 58:997-1006.

Taylor RJ, Saloura V, Jain A, Goloubeva O, Wong S, Kronsberg S, Nagilla M, Silpino L, de Souza J, Seiwert T, Vokes E, Villaflor V, Cohen EE. Ex vivo antibody-dependent cellular cytotoxicity inducibility predicts efficacy of cetuximab.

Cancer Immunology Research 2015; 3:567-74.

Wang M, Yin B, Wang HY, Wang RF. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy.

Immunotherapy 2014; 6:1265-78.

Yang Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer.
Journal of Clinical Investigation 2015; 125:3335-7.

Ying HQ, Wang F, Chen XL, He BS, Pan YQ, Jie C, Liu X, Cao WJ, Peng HX, Lin K, Wang SK. FCGR2A, FCGR3A polymorphisms and therapeutic efficacy of anti-EGFR monoclonal antibody in metastatic colorectal cancer.
Oncotarget 2015; 6:28071-83.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

AZT	Adoptiver Zelltransfer
ADCC	Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD16	<i>Cluster of differentiation</i> 16; Fc γ -Rezeptor IIIa
C _H	Konstante Domäne der schweren Polypeptidkette eines Antikörpers
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
C _L	Konstante Domäne der leichten Polypeptidkette eines Antikörpers
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	Antigen-bindendes Fragment von Antikörpern
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FBS	Fötales bovines Serum
Fc	Kristallisierbares Fragment von Antikörpern
Fc γ RIIIa	Fc γ -Rezeptor IIIa; CD16
FöFoLe	Förderprogramm für Forschung und Lehre
GA101GE	Fucose-reduzierte Varietät von GA101; Obinutuzumab
IgG	Immunglobulin G
IL-15	Interleukin-15
IL-2	Interleukin-2
LC007GE	Fucose-reduzierte Varietät von LC007
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCSP	<i>Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
V _H	Variable Domäne der schweren Polypeptidkette eines Antikörpers
V _L	Variable Domäne der leichten Polypeptidkette eines Antikörpers

8. Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Sebastian Kobold danken. Sowohl für die Chance, in der Abteilung für Klinische Pharmakologie meine Promotionsarbeit zu absolvieren sowie für die Auswahl und Zuteilung dieses interessanten Themas; als auch für sein außerordentliches Engagement, uns Doktoranden durch ein strukturiertes Veranstaltungsprogramm im wissenschaftlichen Arbeiten gezielt zu fördern. Herrn Professor Stefan Endres, Leiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie, bin ich sehr dankbar für seinen intensiven Einsatz um eine produktive und freundschaftliche Atmosphäre in der Abteilung. Seine eindrucksvolle Leidenschaft, Wissen aus Klinik und Forschung verständlich zu vermitteln, wird mir stets Vorbild sein. Darüber hinaus war es sehr wertvoll, bei ihm immer eine offene Tür für persönliche Anliegen zu wissen. Mein besonderer Dank gilt des Weiteren meiner Betreuerin Frau Doktor Felicitas Stein für ihre engagierte Betreuung, ihr stets offenes und klares *Feedback* sowie für unzählige Gespräche über Forschung - aber auch Themen darüber hinaus - bei welchen ich viel lernen konnte.

Für die Förderung im Rahmen des *International Graduate Program i-Target* sowie des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) gilt mein Dank insbesondere den jeweiligen Trägern, dem Elitenetzwerk Bayern bzw. der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie deren engagierten Mitarbeitern. Der Firma Roche danke ich für die Bereitstellung der glykomodifizierten Antikörper.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Abteilung für Klinische Pharmakologie herzlich bedanken, für die außerordentlich freundliche Aufnahme, die kollegiale Zusammenarbeit sowie die gegenseitige Unterstützung – sowohl fachlich, als auch moralisch. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Jennifer Heinrich, Bruno Cadilha, Susanne Wenk, Constanze Heise und Monika Fahrenkamp.

Ein ganz besonderer, herzlicher Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für ihre unermüdliche ideelle und finanzielle Unterstützung auf dem gesamten Weg meines Studiums. Ihnen, wie auch meiner Schwester Vroni und meinen Freunden danke ich für ihr großes Verständnis und motivierende Worte von ganzem Herzen.

9. Veröffentlichungen

Originalarbeit

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. *British Journal of Cancer* 2018; 120:1-9

Vortrag

Asang F. Kombination aus monoklonalen Antikörpern und CD16-Fusionsprotein-transduzierten T-Zellen zur Tumorthherapie. Statusseminar des Promotionsstudiums "Molekulare Medizin" und "Systembiologische Medizin", Herrsching, Deutschland, 2016.

Posterpräsentationen

1. **Asang F**, Rataj F, Kraus F, Endres S and Kobold S. Genetic engineering of T cells by retroviral transduction as a tool to enhance T cell efficacy for cancer therapy. DoktaMed 2015, München, Deutschland, 2015.

2. Rataj R, **Asang F**, Endres S and Kobold S. Arming T cells with activating FcR3a receptors for antibody redirected lysis of cancer cells. 3. ITOC Immunotherapy of Cancer Conference, München, Deutschland, 2016