

ABSTRACT I

Adoptive immunotherapy using chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells recently showed spectacular success in the treatment of leukemia and lymphoma. The classical “one-chain” polypeptide CAR is an artificial receptor which commonly uses a single-chain variable fragment (scFv) comprising the heavy and the light variable domain of a monoclonal antibody joined by a flexible linker for antigen-binding. However, the conversion of an antibody into the scFv format often results in loss of both binding affinity and stability which represents an obstacle in engineering a CAR with the concerning antigen-binding domain.

Therefore, to overcome this limitation, we developed the so-called “dual chain” CAR which consists of the two chains of a natural antibody comprising the immunoglobulin light and heavy chain with their constant regions. The heavy chain is genetically linked to TCR-derived transmembrane and intracellular signaling domains for T cell activation.

The novel dual chain CAR design was analyzed with regard to binding affinity, cytolytic activity and T cell activation and compared with the corresponding scFv CAR of the same specificity. We found that the novel CAR format binds specifically and with a high apparent binding affinity to its cognate antigen. Further, the dual chain CAR was highly efficient in activating T cells in an antigen-dependent fashion, thereby initiating the lysis of antigen-positive target cells. However, a reduced efficacy was observed compared to the corresponding scFv CAR. Taken together, this study provides strong evidence by two examples that the dual chain CAR is universally applicable and broadens the CAR T cell therapy by targeting a variety of antigens lacking a suitable scFv.

ABSTRACT II

Adoptive cell therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL) with CAR-engineered T cells targeting CD19 induced lasting remissions in a number of patients, as previously shown in many clinical trials. However, the treatment is associated with prolonged “on-target off-tumor” toxicities with lasting B cell aplasia due to the targeted elimination of healthy CD19⁺ B cells.

In this study, we engineered a second-generation CAR based on a newly designed IgM Fc receptor (FcμR)-specific binding domain that was derived from the anti-FcμR mAb producing rat hybridoma cell line 6B10 by recombinant DNA technology.

We identified FcμR as a promising candidate target for more selective treatment of CLL by CAR T cells. FcμR is preferentially expressed by CLL cells whereas only background levels are present on healthy B cells or other hematopoietic cells.

Fc μ R-specific CAR T cells efficiently responded towards Fc μ R-positive cell lines and patients' CLL cells with the release of various pro-inflammatory cytokines, lytic proteins and the elimination of antigen-positive cells. In contrast to CD19-specific CAR T cells, Fc μ R targeting CAR T cells did not attack healthy B cells. Notably, anti-Fc μ R modified autologous T cells eliminated CLL cells *in vitro*, whereas the number of healthy B cells was not substantially reduced by CAR-engineered T cells in an autologous setting.

Compared to the currently used CD19 CAR T cell therapy, this study strongly implies a superior therapeutic index of the Fc μ R-specific CAR T cells for the treatment of CLL.

ZUSAMMENFASSUNG I

Die adoptive Immuntherapie mit chimären Antigen Rezeptor (CAR) modifizierten T Zellen zeigte kürzlich spektakuläre Erfolge bei der Behandlung von Leukämien und Lymphomen. Der klassische „Ein-Ketten“ Polypeptid CAR ist ein artifizierender Rezeptor, der üblicherweise ein „single-chain variable fragment“ (scFv) als Antigen-Bindedomäne beinhaltet. Diese besteht aus der schweren und der leichten variablen Domäne eines monoklonalen Antikörpers, welche über einen kurzen Linker miteinander verbunden sind. Die Konvertierung eines Antikörpers in ein scFv Format geht jedoch oft mit einem Verlust der Bindeaffinität und der Stabilität des scFv einher, was die Konstruktion eines CARs mit solch einer Antigen-Bindedomäne erschwert.

Um diese Einschränkung zu überwinden, beschreiben wir in dieser Arbeit erstmals den so genannten „dual chain“ CAR, der aus den zwei Ketten eines natürlichen Antikörpers, also der leichten und der schweren Ketten eines Immunglobulins mit ihren jeweiligen konstanten Regionen, besteht. Um eine T-Zell Aktivierung auszulösen, ist die schwere Kette gentechnologisch an T-Zell Rezeptor-abgeleitete Transmembran- und intrazelluläre Signaldomänen gekoppelt.

Das neue dual chain CAR Design wurde im Hinblick auf Bindungsaffinität, zytolytische Aktivität und T-Zell Aktivierung untersucht und mit dem korrespondierenden scFv CAR gleicher Spezifität verglichen. Das neue CAR Format bindet spezifisch und mit einer hohen Bindungsaffinität an das entsprechende Antigen. Zusätzlich weist der dual chain CAR eine hocheffiziente, Antigen-abhängige Aktivierung der T Zellen auf und veranlasst dadurch die Lyse von Antigen-positiven Zielzellen, die jedoch im Vergleich zum korrespondierenden scFv CAR vermindert ist. Insgesamt liefert diese Studie, durch zwei Beispiele, einen aussagekräftigen Nachweis dafür, dass das neue dual chain CAR Design universell einsetzbar ist. Durch das Targeting einer Vielzahl von Antigenen, für die ein scFv nicht vorhanden ist, werden die Möglichkeiten der CAR T-Zell-Therapie erweitert.

ZUSAMMENFASSUNG II

Wie erst kürzlich in mehreren klinischen Studien gezeigt wurde, weist die adoptive Zelltherapie mit CAR-modifizierten T-Zellen, die gegen das Antigen CD19 gerichtet sind, langanhaltende Remissionen in einer Reihe von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) auf. Diese Behandlung wird jedoch, aufgrund der Eliminierung von gesunden CD19⁺ B Zellen durch den CD19-spezifischen CAR, mit einer anhaltenden „on-target off-tumor“ Toxizität, die mit einer nachhaltigen B Zell Aplasie einhergeht, in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit haben wir mittels rekombinanter DNA-Technologie einen CAR der zweiten Generation, basierend auf einer neuen IgM Fc Rezeptor (Fc μ R)-spezifischen Bindedomäne, generiert. Die DNA für diese Bindedomäne wurde dabei aus der Ratten-Hybridomzelllinie 6B10, die den monoklonalen anti-Fc μ R Antikörper produziert, gewonnen.

Der Fc μ R stellt ein vielversprechendes Zielantigen für eine selektivere CAR T Zell Behandlung der CLL dar, da dieser Rezeptor präferentiell von CLL Zellen exprimiert wird, wohingegen gesunde B-Zellen und andere hämatopoetische Zellen nur eine Hintergrundexpression des Proteins aufweisen.

Fc μ R-spezifische CAR T-Zellen zeigen eine effiziente T-Zell Antwort gegenüber Fc μ R-positiven Zelllinien und gegenüber CLL Zellen von Patienten, die mit der Freisetzung von unterschiedlichen pro-inflammatorischen Zytokinen, lytischen Proteinen und der Eliminierung von Antigen-positiven Zellen einhergeht. Im Vergleich zu CD19-spezifischen CAR-T Zellen, eliminieren allogene anti-Fc μ R CAR T-Zellen gesunde B Zellen nicht. Insbesondere eliminieren anti-Fc μ R modifizierte autologe T-Zellen CLL Zellen *in vitro*, wohingegen die Zahl gesunder B-Zellen durch diese CAR-modifizierten T-Zellen im autologen Umfeld nicht wesentlich verringert wird.

Im Vergleich zur derzeit verwendeten CD19 CAR T-Zell Therapie, implizieren unsere Ergebnisse einen besseren therapeutischen Index der Fc μ R-spezifischen CAR T-Zellen für die Therapie der CLL.