

**BISPEZIFISCHE INHIBITOREN DER INTERLEUKIN-6
TRANS-SIGNALTRANSDUKTION UND
WEITERENTWICKLUNG SYNTHETISCHER
ZYTOKINREZEPTOREN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Ettich
aus Korenowsk

Düsseldorf, Juli 2024

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Korreferent: Prof. Dr. med. Klaus Dieter Pfeffer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2025

So if it's just us ... seems like an awful waste of space

- Contact (1997)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
AMINOSÄUREN	IX
EINLEITUNG	I-1
1. Eine Vorstellung der adressierten Zytokine und ihre Interaktionen	I-2
1.1. Die Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie	I-2
1.2. Der Interleukin-7 Rezeptor	I-4
1.3. Die Interleukin-12 Familie	I-5
1.4. Die Interleukin-6 Familie	I-7
2. Die Physiologie und Signaltransduktion von IL-6	I-8
2.1. Die IL-6 Signaltransduktion und das Puffersystem	I-9
2.2. Die klinische Bedeutung und Intervention von IL-6 Trans-signaling	I-11
2.2.1. From Bench to Bedside: Olamkicept bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	I-13
2.2.2. Weiterentwicklung des sgp130Fc zum Designermolekül cs130Fc	I-15
3. Coronavirus Disease 2019	I-18
4. Synthetische Zytokinrezeptoren	I-22
ZIELSETZUNG	I-26
PUBLIKATION 1	II-27
PUBLIKATION 2	III-41
PUBLIKATION 3	IV-59
PUBLIKATION 4	V-78
DISKUSSION	VI-93
1. <i>Next Generation</i> Trans-signaling Inhibitoren	VI-93
1.1. Erhöhung der Spezifität des sgp130Fc	VI-95
1.2. Spezifischer IL-11 Trans-signaling sgp130Fc Inhibitor	VI-97
1.3. Entwicklung bispezifischer cs130Fc Varianten	VI-101
1.4. Potentielle Kandidaten für die Erweiterung von cs130Fc	VI-105
1.5. Inhibition von IL-6 Trans-signaling und SARS-CoV-2 mit c19s130Fc	VI-107
2. Weiterentwicklung synthetischer Zytokinrezeptoren	VI-111
2.1. Die SyCyR-Technologie wird zur therapeutischen Applikation angepasst	VI-111
2.2. Die AIP ^{VHH} SyCyR sind biologisch aktiv	VI-113
2.3. Die Architektur beeinflusst die Signaltransduktion der AIP ^{VHH} SyCyR	VI-115
2.4. AIP ^{VHH} aktivieren Apoptose mit Fas SyCyR	VI-117
2.5. Die Fas SyCyR-Technologie in der Aufklärung von Fas Signalwegen	VI-120
2.6. Die Anwendung von Fas SyCyR in der CAR-T-Zelltherapie	VI-121
2.7. Konstitutiv aktive Rezeptoren über eine PPCL-Insertion	VI-123
2.8. Einsatzmöglichkeiten der SyCyR _{PPCL}	VI-127

LITERATURVERZEICHNIS.....	VI-129
DANKSAGUNG	VII-153
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	VIII-154

ZUSAMMENFASSUNG

Proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF steuern das Immunsystem und zelluläre Prozesse. Eine Fehlfunktion kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Entzündungen und Krebs beitragen. Therapeutische Strategien zielen darauf ab, Zytokine an der Interaktion mit ihren jeweiligen Rezeptoren zu hindern und damit die Signaltransduktion zu unterbinden. Während die klassische IL-6 Signalantwort mit regenerativen Prozessen in Verbindung gebracht wird, induziert das IL-6 Trans-signaling chronisch-entzündliche Prozesse. Die Trans-signaling-Blockade mit löslichem gp130 (sgp130) verbesserte in verschiedenen präklinischen Modellen das Bild von chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Zudem konnte die Wirksamkeit von sgp130Fc in einer Phase IIa Studie zur Behandlung von Patienten mit Colitis ulcerosa gezeigt werden.

Darauf aufbauend habe ich drei verschiedene bispezifische Inhibitoren entwickelt. Diese Inhibitoren basieren auf dem cs130Fc, einer Weiterentwicklung von sgp130, das mit einem Nanobody (VHH) erweitert wurde. Zunächst konnte ich mit c19s130Fc die gleichzeitige Blockade von IL-6 Trans-signaling und der SARS-CoV-2 Infektion zeigen. Mit diesem *proof-of-concept* einer modularen Bauart des cs130Fc, habe ich das cs130Fc mit IL-12/IL-23^{VHH} und TNF^{VHH} erweitert, um einen synergistischen Vorteil zu erzielen. cs130-IL-12/23^{VHH}Fc neutralisierte gleichzeitig die Aktivität von IL-6 Trans-signaling und IL-12 bzw. IL-23, während cs130-TNF^{VHH}Fc die TNF-induzierte Apoptose so effektiv verhinderte wie TNF^{VHH} allein. Diese Targets wurden ausgewählt, weil bei Autoimmunerkrankungen, wie in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) oder rheumatoider Arthritis (RA), erhöhte Mengen mehrerer proinflammatorischer Zytokine gemessen werden, die zum pathologischen Bild führen. Dazu gehören die Trans-signaling-Komponenten IL-6 und sIL-6 α , TNF und IL-12 sowie IL-23. Erste klinische Studien untersuchten den vorteilhaften Effekt einer Kombinationstherapie, wodurch die Inhibitoren cs130-TNF^{VHH}Fc und cs130-IL-12/23^{VHH}Fc zu neuen interessanten Kandidaten werden könnten.

Synthetic cytokine receptors (SyCyRs) wurden für verschiedene Rezeptoren entwickelt, um die Signaltransduktion zu imitieren. Anstelle einer Zytokinbindestelle werden VHHs als extrazelluläre Domäne mit GFP oder mCherry adressiert, um Signale ins Zellinnere weiterzuleiten. Für eine potentielle klinische Anwendung, wie die adaptive Immuntherapie, generierte ich im zweiten Teil der Arbeit vier anti-idiotypische VHH gegen Palivizumab (AIP^{VHH}). Palivizumab konnte die AIP^{VHH} SyCyR mit gp130 nicht aktivieren, jedoch aktivierte eine Kreuzvernetzung und das Palivizumab als *single-chain variable fragment* (scFv) die AIP^{VHH}1-3 Varianten. Zudem induzierten AIP^{VHH}1 und 3 als Fas SyCyR

die Apoptose mit Hilfe von dimeren und tetrameren scFv Liganden. Diese Weiterentwicklung der SyCyR-Technologie ermöglicht Signalwege von Zytokinen spezifisch und hintergrundfrei zu aktivieren, ohne eine Immunantwort im Menschen auszulösen.

Zuletzt analysierte ich, ob der Transfer der PPCL-Insertion aus der Transmembrandomäne von IL-7R α von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie in andere Rezeptoren zu einer ligandenunabhängigen Rezeptordimerisierung und konstitutiven Aktivierung führt. Die PPCL-Insertion in der IL-7R α SyCyR Variante führte über eine Rezeptorhomodimerisierung zu einer γ c-unabhängigen STAT5- und ERK-Phosphorylierung und damit zu einer ligandenunabhängigen Proliferation. Der Transfer der IL-7R α Transmembrandomäne mit der PPCL-Insertion in natürliche und synthetische Zytokinrezeptoren der IL-6-, IL-12- und Interferon-Familien führte ebenfalls zu einer konstitutiven Signaltransduktion. Zusammenfassend ist die ligandenunabhängige Zytokinrezeptoraktivierung durch natürlich vorkommende *gain-of-function* Mutanten übertragbar und somit ein nützliches Werkzeug in der Synthetischen Biologie.

Im Rahmen der synthetischen Biologie beschäftigen sich beide Themenschwerpunkte mit neuen bispezifischen Inhibitoren zur Aufklärung der Mechanismen proinflammatorischer Trans-signaling-Prozesse sowie mit der Weiterentwicklung synthetischer Rezeptoren für therapeutische Zwecke und der Charakterisierung einer konstitutiv aktivierenden Mutation in Zytokinrezeptoren.

SUMMARY

Proinflammatory cytokines such as IL-6 or TNF control the immune system and cellular processes, whose malfunctions may lead to the development of cancer, inflammatory diseases, and autoimmune diseases. Therapeutic strategies aim to prevent cytokines from interacting with their respective receptors, thus preventing signal transduction. While the classic IL-6 signaling is associated with regenerative processes, IL-6 trans-signaling induces chronic inflammatory processes. In various preclinical models, blockade with soluble gp130 (sgp130) attenuated chronic inflammatory diseases. A phase IIa study demonstrated the efficacy of sgp130Fc in treating ulcerative colitis.

Based on this, I developed three different bispecific inhibitors. These inhibitors based on cs130Fc, which was extended with a nanobody (VHH). Initially, I demonstrated the simultaneous blockade of IL-6 trans-signaling and SARS-CoV-2 infection with c19s130Fc. With this proof-of-concept of a modular design of cs130Fc, I extended cs130Fc with IL-12/IL-23^{VHH} and TNF^{VHH} to achieve a synergistic advantage. cs130-IL-12/23^{VHH}Fc simultaneously inhibited the activity of IL-6 trans-signaling and IL-12 or IL-23, while cs130-TNF^{VHH}Fc prevented TNF-induced apoptosis as effectively as TNF^{VHH}. These cytokines were selected as targets in autoimmune diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD) or rheumatoid arthritis (RA), with elevated levels of several proinflammatory cytokines contributing to the pathology. Among these are IL-6 and sIL-6R α , TNF, IL-12, and IL-23. Furthermore, clinical studies are exploring the combined effect of therapy, making cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc inhibitors promising future drug candidates.

Synthetic Cytokine Receptors (SyCyR) have been developed with different receptors to phenocopy signal transduction. Instead of a cytokine binding domain, a VHH directed against GFP or mCherry is addressed as extracellular domain to transmit signals. In the context of adoptive immunotherapy and clinical application, I generated four anti-idiotypic VHH against Palivizumab (AIP^{VHH}). Palivizumab failed to activate the AIP^{VHH} SyCyR with gp130, but cross-linking and a single-chain variable fragment (scFv) of Palivizumab activated the AIP^{VHH}1-3 variants. In addition, AIP^{VHH}1 and 3 induced apoptosis as Fas SyCyR using dimeric and tetrameric scFv ligands. This advancement in SyCyR technology enables the specific and background-free activation of signal pathways without triggering an immune response in humans.

Finally, I analyzed whether transferring a PPCL insertion from the transmembrane domain of IL-7R α from patients with acute lymphoblastic leukemia to other receptor family leads to ligand-independent dimerization and constitutive activation. The PPCL insertion in

the IL-7R α SyCyR variant induced γ c-independent STAT5 and ERK phosphorylation via receptor homodimerization and, thus, ligand-independent proliferation. The transfer of the IL-7R α transmembrane domain with the PPCL insertion into natural and synthetic cytokine receptors of the IL-6, IL-12, and interferon family also induced constitutive signal transduction. In summary, ligand-independent cytokine receptor activation by naturally occurring gain-of-function mutants is transferable and, thus, a useful tool in synthetic biology.

The two central themes rely on synthetic biology, specifically a novel bispecific inhibitor to elucidate the mechanisms underlying inflammatory trans-signaling-associated processes as well as synthetic receptor development to implement therapeutic approaches and characterization of the transfer of a constitutive activating mutation in cytokine receptors.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(v/w)	Volumen/Gewicht	CT-1	Cardiotrophin-1
(w/w)	Gewicht/Gewicht	DC	<i>Dendritic cells</i>
Å	Ångström	DD	<i>Death domain</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
AIP ^{VHH}	Anti-idiotypischer Palivizumab VHH	DMSO	Dimethylsulfoxid
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie	EBV	Epstein-Barr Virus
Ba/F3	Murine pro-B-Zelllinie	EBI3	<i>Epstein-Barr virus-induced gene 3</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	ECD	<i>Extracellular domain</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
bsAbs	Bispezifische Antikörper	eng.	Englisch
bzw.	Beziehungsweise	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ca.	<i>Circa</i>	ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
CC	2xmCherry	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
CDR	<i>Complementarity-determining regions</i>	FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>	Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>	FNIII	Fibronektin Typ III
CLCF1	<i>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>	g	Gravitation
CLF	<i>Cytokine-like factor-1</i>	G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
CNTF	<i>Ciliary neutrophic factor</i>	gp130	Glykoprotein 130
CRS	<i>Cytokine release syndrome</i>	GG	2xGFP
CRP	C-reaktives Protein	GC	GFP-mCherry
CSF	<i>Colony-stimulating factor</i>	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
cs130Fc	<i>Chimeric sgp130Fc</i>	GOF	<i>Gain-of-function</i>

h	Human	LOF	<i>Loss-of-function</i>
HIL-6	Humanes IL-6-sIL-6R α Fusionsprotein	MAPK	<i>Mitogen-activated protein-kinase</i>
HIL-12	Humanes Interleukin-12 Fusions- protein	MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
HIL-23	Humanes Interleukin-23 Fusions- protein	MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
HA	<i>Hyaluronic acid</i>	min	Minute
hACE2	<i>Human angiotensin converting enzyme 2</i>	NC	Nitrocellulose
HFD	<i>High fat diet</i>	NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>	NK	Natürliche Killerzellen
ICD	Intrazelluläre Domäne	OSM	Oncostatin-M
IFN	Interferon	OSMR β	OSM-Rezeptor
IFNAR	Interferon α/β Rezeptor	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
IL-	Interleukin-	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
IL-6R α	Interleukin-6 α -Rezeptor	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
IL-7R α	Interleukin-7 Rezeptor	Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
IL-11R α	Interleukin-11 α -Rezeptor	RA	Rheumatoide Arthritis
IL-12R β 1	Interleukin-12 Rezeptor β 1	rh	Rekombinant, human
IL-12R β 2	Interleukin-12 Rezeptor β 2	RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 1</i>
IL-23R	Interleukin-23 Rezeptor	rpm	Runden pro Minute
Ig	Immunoglobulin	RT	Raumtemperatur
IgG1	Immunoglobulin G1 Antikörper	SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>
JAK	Januskinase	S-RBD	<i>Receptor binding domain des Spike-Proteins</i>
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis	ssRNA	<i>Positive-sense, single-stranded ribonucleic acid</i>
JNK	c-Jun-N-terminale-Kinase	scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
kDa	Kilodalton	SDS	Sodiumdodecylsulfat
K _D	Dissoziationskonstante	sec	<i>Second</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>	sgp130Fc	<i>Soluble glycoprotein 130 Fc</i>
LIFR β	LIF-Rezeptor		

sgp130-RAPS	<i>sgp130-rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form</i>
sIL-11R α	<i>Soluble IL-11Rα</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SyCyR	<i>Synthetic cytokine receptor</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor-converting enzyme</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TME	<i>Tumor micro environment</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
T _H	T-Helferzellen
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TS	TwinStrep [®]
TYK	Tyrosinkinase
VHH	<i>Variable heavy domain of heavy chain antibody (Nanobody)</i>
VHH _{GFP} V _G	<i>Green fluorescent protein nanobody</i>
VHH _{mCherry} V _C	<i>mCherry nanobody</i>
γ c	<i>Common gamma chain</i>

AMINOSÄUREN

Aminosäure	3-(1)-Buchstabencode
Alanin	Ala (A)
Arginin	Arg (R)
Asparagin	Asn (N)
Asparagin-säure	Asp (D)
Cystein	Cys (C)
Glutamin-säure	Glu (E)
Glutamin	Gln (Q)
Glycin	Gly (G)
Histidin	His (H)
Isoleucin	Ile (I)
Leucin	Leu (L)
Lysin	Lys (K)
Methionin	Met (M)
Phenylalanin	Phe (F)
Prolin	Pro (P)
Serin	Ser (S)
Threonin	Thr (T)
Tryptophan	Trp (W)
Tyrosin	Tyr (Y)
Valin	Val (V)

EINLEITUNG

Aus der griechischen Mythologie entspringt aus Echidna und Typhon ein Ungeheuer namens *Chimaira*, zu Deutsch Chimäre [1, 2]. Homer beschreibt dieses feuerspeiende Mischwesen, was über den Schultern den Kopf eines Löwen besaß, in ihrem Nacken sich der Kopf einer Ziege befand und ihr Schwanzende mit dem Kopf einer Schlange bzw. eines Drachens geziert war. So brachte die Chimäre nichts als Zerstörung und Verwüstung über Mensch und Tier, bis Bellerphon mit Hilfe eines anderen Mischwesens *Pegasos*, das von Poseidon als geflügeltes Pferd kreiert wurde, in den Kampf zog. Nur mit Hilfe der neuen Flugfähigkeit von *Pegasos* gelang es Bellerphon, die Chimäre in einem Luftangriff zu besiegen. Die griechische Mythologie prägt bis heute Kultur und Sprache der Menschheit [1]. So versteht man im Kontext der synthetischen Biologie unter einer Chimäre eine Fusion verschiedener Proteine, die neue Funktionen mit Vorteilen aus den verschiedenen „Wesen“ erhalten.

Das neue Forschungsfeld *synthetic immunity* ist das Zusammenspiel von synthetischer Biologie und Immunologie. Im Rahmen der Immunregulation kann die synthetische Biologie in der personalisierten Medizin eingesetzt werden. Dabei werden chimäre Fusionsproteine kombiniert, um neuartige Rezeptoren und Zytokine mit vorteilhaften Eigenschaften auszustatten, zu verbessern, zu spezifizieren und regulierbar zu machen. Dieser Bereich hat ein großes Potential für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für eine Vielzahl von Krankheiten, die das Immunsystem und chronische Krankheiten betreffen [3].

Die Grundlage der vorgestellten Projekte ist die Interleukin-6 Signalantwort, die nach heutigem Kenntnisstand auf drei Arten stattfindet. Eine davon ist das Trans-signaling, das im Zusammenhang mit chronischen und Autoimmunerkrankungen beschrieben wurde. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf dem rationalen Proteindesign zur Untersuchung der immunologischen Relevanz des Interleukin- (IL-)6 Trans-signaling und dessen potentielltem Interventionsansatz bei Autoimmunerkrankungen. Als Basis des Proteindesigns wurde der Inhibitor Olamkicept verwendet und die modulare Weiterentwicklung unter Einbeziehung des Tumornekrosefaktors (TNF), der IL-12 Familie und COVID-19 gezeigt. In den weiteren zwei Publikationen liegt der Fokus in der Weiterentwicklung synthetischer Zytokinrezeptoren unter Verwendung von Rezeptoren aus der IL-6-, IL-12-, Interferon-Familie und TNF-Superfamilie, die *in vitro* charakterisiert wurden. Im Folgenden werden nacheinander die Zytokin Familien vorgestellt, deren Signaltransduktion entweder durch Inhibitoren blockiert oder durch synthetische Rezeptoren aktiviert wurde.

1. EINE VORSTELLUNG DER ADRESSIERTEN ZYTOKINE UND IHRE INTERAKTIONEN

Unter Zytokine (griechisch *zyto* - Zelle und *kinese* - Bewegung, d.h. „sich zwischen den Zellen bewegend“) werden in etwa 15-25 kDa große, kurzlebige, glykosylierte Proteinmediatoren bezeichnet, die mit hormonähnlicher Wirkung an grundlegenden biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Homöostase und der Entwicklung und Regulation des Immunsystems beteiligt sind. Zytokine sind entsprechend einer strukturellen Ähnlichkeit, der biologischen Funktion oder der konvergenten Rezeptoren klassifiziert. Auf Basis ihrer biologischen Funktion werden Zytokine klassifiziert in Interferone (IFN), Interleukine (IL-), Chemokine, koloniestimulierende Faktoren (*colony-stimulating factor* CSF), und TNF [4].

Die Klassifizierung stammt vom gemeinsamen Gebrauch bestimmter Rezeptoren (*common receptor*). Dabei binden Zytokine an multimere Rezeptorkomplexe, in denen häufig ein gemeinsamer Rezeptor von verschiedenen Zytokinen zur intrazellulären Signaltransduktion geteilt wird. Die Rezeptoren werden nach ihrer strukturellen Homologie in verschiedene Klassen eingeteilt: Typ-I- (Hämatopoetin-Familie) und Typ-II- (IFN-Familie) Zytokinfamilie, TNF-Rezeptor-Superfamilie, IL-1 und die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), IL-17 Rezeptoren, die *transforming growth factor* β (TGF- β) Superfamilie, Rezeptortyrosinkinasen, Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen und die Chemokinrezeptoren [5].

1.1. DIE TUMORNEKROSEFAKTORREZEPTOR-SUPERFAMILIE

Die TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie besteht aus 19 trimeren Liganden und 29 Rezeptoren mit zentralen immunregulatorischen Funktionen [6, 7]. Hauptsächlich antigenpräsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC), B-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK) produzieren TNF Liganden. Die membrangebundenen Trimere können bereits Signalwege induzieren. Des Weiteren überführen Matrix-Metalloproteinase *TNF-converting enzyme* (TACE, alternativ *A Disintegrin and Metalloprotease* (ADAM)17) und andere Proteasen diese Trimere in eine lösliche Form, welche darüber hinaus weitere Signaltransduktionswege vermitteln [8, 9].

Die zelluläre Antwort der TNF/TNFR-Superfamilie ist aufgrund umfangreicher Signalwege außerordentlich pleiotrop [10, 11]. Nach der Ligandenbindung hängt die initiierte Signalkaskade von Adaptermolekülen ab, die mit der aktivierten intrazellulären Domäne (ICD) des Rezeptors assoziiert sind (**Abbildung 1**). Die TNFR-Superfamilie kann in drei Gruppen unterteilt werden: Die Todesrezeptoren, Rezeptoren mit *TNFR associated factor* (TRAF) *interacting motif* (TIM) und die *Decoy*-Rezeptoren. Die Todesrezeptoren (z.B.

TNFR1, TRAIL-R 1, 2, 4 und *cluster of differentiation* (CD) (CD95/Fas)) tragen eine intrazelluläre Todesdomäne (DD). Der TNFR1 reguliert ubiquitär Zelltod und Entzündung durch die Bindung von membrangebundenem und löslichem TNF [12]. Die Todesdomäne induziert über Adapterproteine, *TNFR-associated death domain* TRADD oder *Fas-associated death domain* FADD, Apoptose, Nekroptose oder promitogene Wege. TRADD assoziiert nur unter bestimmten Bedingungen mit FADD, wie z.B. bei gestörter Proteinsynthese oder fehlenden *downstream* Adapterproteinen und induziert über den Komplex IIa eine Caspase-8-vermittelte Apoptose [10, 12-14]. Ansonsten überwiegt die Aktivierung von Signalwegen, die entzündliche Prozesse vermitteln und die Apoptose verhindern. Dazu bildet TRADD über den Komplex I mit TRAF2 und der *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1), was zu inflammatorischen Prozessen führt [15, 16]. Der Komplex I reguliert verschiedene Signalwege wie die Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B), *mitogen-activated protein-kinase* (MAPK; c-Jun-N-terminale-Kinase (JNK), p38, *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) [11]. Welche Art von Signalkaskade mit TNFR1 aktiviert wird, ist komplex reguliert und hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. dem metabolischen Status der Zelle, der Stärke des TNF-Signals, der Ubiquitinierung von RIPK1 und der Caspaseaktivität [10, 17].

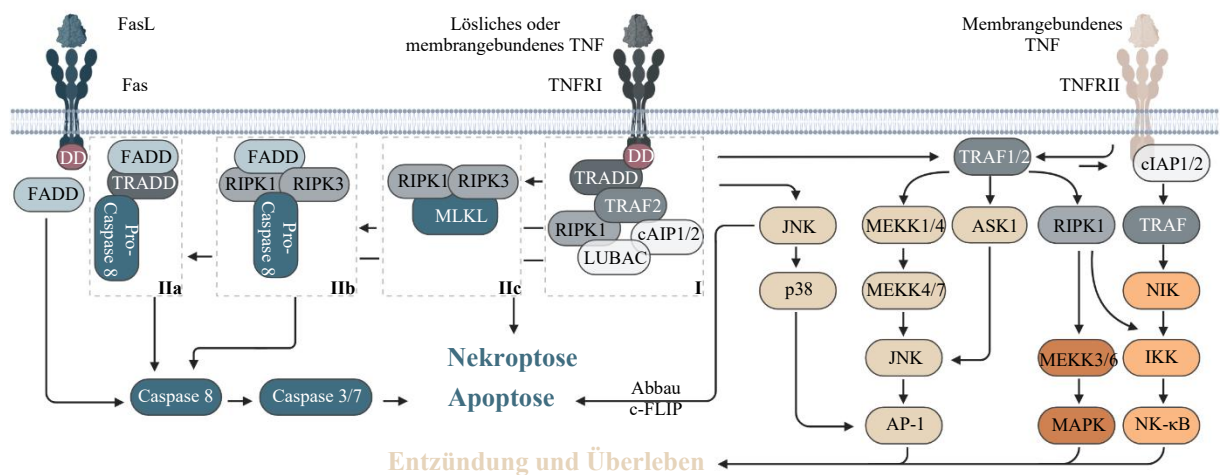


Abbildung 1: Übersicht der Signaltransduktion von Fas, TNFR1 und TNFR2 (vereinfachtes Schema): Der Fas Rezeptor bindet an FasL und bildet über DD einen Komplex aus FADD und Pro-Caspase 8, der die Apoptose induziert. Die Bindung von löslichem oder membrangebundenem TNF an den TNFR1 leitet verschiedene Signalwege ein. Komplex I aus TRADD, TRAF2 und RIPK1 reguliert die Aktivierung von NF- κ B, MAPK (JNK, ERK, 38 und Akt/PI3K) und transkribiert Zielgene für Überleben, Apoptose oder Entzündung. Der Komplex IIa induziert über TRADD, FADD und Pro-Caspase-8 eine Caspase-vermittelte Apoptose. Der Komplex IIb aktiviert ohne TRADD über FADD, RIPK1, RIPK3 und Pro-Caspase-8 die Caspase-vermittelte Apoptose. Der Komplex IIc aktiviert über FADD, RIPK1, RIPK3 die MLKL-vermittelte Nekroptose. Der TNFR2 induziert über TRAF verschiedene Signalwege für Homöostase, Entzündung und Regeneration. Abbildung mit Biorender erstellt und modifiziert nach [11].

Der TNFR2 als Vertreter der zweiten Gruppe agiert direkt über TIM mit TRAF1/2 und *cellular inhibitor of apoptosis 1/2* (cIAP1/2) und reguliert Immunzellen, Neuronen oder Endothelzellen durch membranständiges TNF. Der TNFR2 steuert dabei viele biologische

Prozesse wie Überleben, Differenzierung, Geweberegeneration, Homöostase und Inflammation [12, 18, 19]. Die dritte TNFR-Subgruppe umfasst diverse *Decoy*-Rezeptoren, die keine Signaltransduktion einleiten, jedoch mit den anderen TNF-Rezeptoren um ihre Liganden konkurrieren. Zudem kann ADAM17 die extrazelluläre Domäne von TNFRI und TNFRII in lösliche Formen überführen, die TNF neutralisieren [8].

Die Summe der gemeinsamen Nutzung von Liganden und Rezeptoren innerhalb dieser Superfamilie ergibt ein komplexes Kommunikationsnetzwerk mit einer Vielzahl von Zelltypen, die auf vielfältige Weise mit der zentralen Regulation des Immunsystems und der Homöostase interagieren. TNF spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Infektionskrankheiten, indem es die Inflammation und die Akute-Phase-Reaktion im Abwehrmechanismus reguliert [10, 20]. TNF ist somit ein entscheidender Mediator bei der Immunantwort, während eine Dysregulation an der Entstehung verschiedener chronischer Entzündungen, Gewebeschäden und Krankheiten beteiligt ist. Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung, sowie Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasis, entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (*crohns disease* CD) oder Colitis ulcerosa (UC), chronische Bronchitis, chronisch obstruktive Lungenerkrankung und Asthma werden damit in Verbindung gebracht [10, 11, 21-23]. Therapeutische Ansätze zur Hemmung von TNF haben sich bei chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Osteoporose oder Transplantatabstoßung bewährt [24, 25].

1.2. DER INTERLEUKIN-7 REZEPTOR

Der IL-7R α (CD127) wird zusammen mit dem *common γ -chain* Rezeptor (γ c, CD132) von IL-7 zur Signalweiterleitung über die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT)5 durch Januskinase (JAK)1 (CD127) und JAK3 (CD132) verwendet und gehört durch den gemeinsam genutzten γ c Rezeptor zusammen mit IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21 und Thymus-Stroma-Lymphopoietin (TSLP) zur IL-2 Familie (**Abbildung Publikation 4**) [26]. IL-7 wird von Stromazellen im Knochenmark und Thymus, DC, Epithelzellen und Fibroblasten sezerniert und stimuliert die Differenzierung lymphoider Progenitorzellen. IL-7 ist an der Reifung von B-Zellen, dem Überleben von NK- und T-Zellen, der T-Zell-Entwicklung und der Homöostase beteiligt [27]. Als Transkriptionsfaktor fungiert aktiviertes STAT5, das anti-apoptotische, proliferative, metabolische Faktoren und negative Rückkopplungsmediatoren, darunter *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), Cyclin D1, c-Myc und *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-1, aktiviert [28]. Alternative Signalmoleküle von IL-7 sind STAT1, STAT3, Akt/PI3K und Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)/ERK. Die Regulation des MEK/ERK Signalweges ist bei der Entwicklung,

Proliferation und Homöostase von T-Zellen abhängig von der TCR- und IL-2R-Aktivierung [29]. Die Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges durch IL-7 steht dagegen im Zusammenhang mit der akuten lymphatischen T-Vorläuferzell-Leukämie (T-ALL) [29].

IL-7 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der T-Zell-Subpopulation über die Expression von CD127 und der T-Zell-Antwort bei Autoimmun- und Infektionskrankheiten [29]. Die Deletion von IL-7R α führt zur *severe combined immunodeficiency* (SCID), einer genetisch und klinisch heterogenen Gruppe angeborener Erkrankungen, die durch eine Beeinträchtigung der humoralen und zellvermittelten Immunität, Leukopenie und eine verminderte Antikörperantwort gekennzeichnet sind. Aktivierende IL-7R α *single nucleotide polymorphism* (SNP) zeigen das Ausmaß der Dysregulation der Immunantwort in Form von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, RA und Typ-1-Diabetes [30, 31]. Insbesondere *gain-of-function* (GOF) Mutationen im IL-7R α -Gen führen zu T-ALL [32, 33]. Etwa 10% der Patienten mit T-ALL weisen aktivierende Mutationen in der Juxtamembran- oder innerhalb der Transmembrandomäne (TMD) des IL-7R α auf, wobei es sich fast ausschließlich um *in frame*-Insertionen mit einem ungepaarten Cystein handelt [34]. Die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken führt zu einer Homodimerisierung von IL-7R α , das konstitutiv unabhängig von IL-7, JAK3 oder γ c, JAK1 und STAT5 phosphoryliert. Shochat und Kollegen beschrieben eine somatische Insertion mit den Aminosäuren Prolin-Prolin-Cystein-Leucin (PPCL) innerhalb der TMD-Region von IL-7R α aus Patienten mit *B cell precursor acute lymphoblastic leukemia* (BCP-ALL) [33, 35]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Insertion eines ungepaarten Cysteins in der Juxtamembran oder der TMD ein Mechanismus für die konstitutive Aktivierung von Klasse-I-Zytokinrezeptoren sein könnte [36].

1.3. DIE INTERLEUKIN-12 FAMILIE

Die IL-12 Familie weist strukturelle Homologien mit der IL-6 Familie auf und besteht aus IL-12, IL-23, IL-27, IL-35 und IL-39, die zu der Klasse I hämatopoetischen Zytokine gehört [37]. Die α -Untereinheit (p35, p19 und p28) assembliert mit einer der β -Untereinheiten (p40 und *Epstein-Barr virus-induced gene 3* EBI3) zum aktiven Zytokin (**Abbildung 2**) [38]. IL-12, bestehend aus p35 und p40, und IL-23, bestehend aus p19 und p40, sind als proinflammatorische Zytokine an der Differenzierung von T-Helferzellen (T_H1 und T_H17) beteiligt [38]. Weitere Mitglieder der IL-12 Familie erfüllen sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Funktionen, die in [38, 39] aufgeführt sind.

Die kombinatorische Assemblierung der α - und β -Untereinheiten der IL-12 Familie zeigt die Verwendung gemeinsamer Rezeptoren. Die Bindung von IL-12 erfolgt mit der β -

Untereinheit p40 an den IL-12 Rezeptor $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$), während die α -Untereinheit p35 mit dem IL-12 Rezeptor $\beta 2$ (IL-12R $\beta 2$) interagiert [40]. IL-12R $\beta 1$ ist mit der Tyrosinkinase (Tyk) 2 und IL-12R $\beta 2$ mit der JAK2 assoziiert, die primär zur STAT4-Phosphorylierung vermittelten Signaltransduktion führen [38].

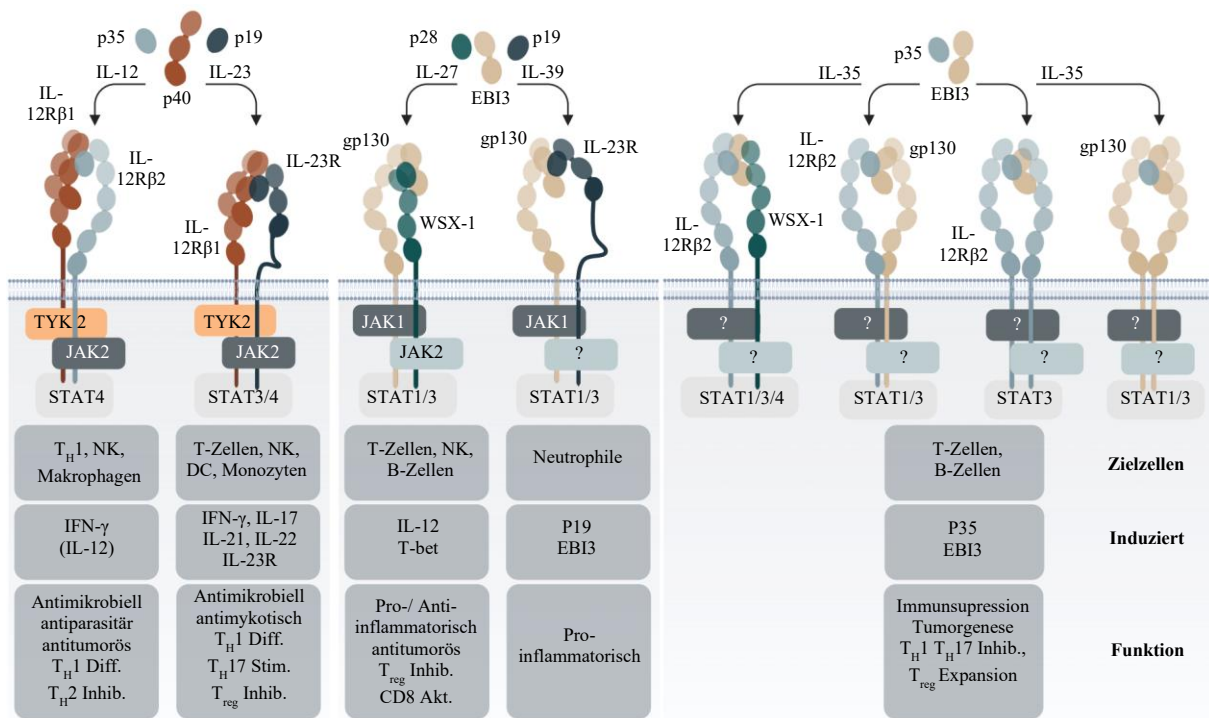


Abbildung 2: Die Rolle der IL-12 Familie in der Regulation des Immunsystems mit Übersicht über Zielzellen, Induktion und Funktion. IL-12 Zytokine setzen sich aus einer α - (p35, p19, p28, p35) und β - (p40, EBI3) Untereinheit zusammen und interagieren über gemeinsame Rezeptoren. IL-12 aktiviert IL-12R $\beta 1$::IL-12R $\beta 2$, IL-23 IL-12R $\beta 1$::IL-23R und IL-27 WSX-1::gp130. IL-39 aktiviert über IL-23R::gp130. IL-35 kann verschiedene Rezeptorkomplexe (IL-12R $\beta 2$::WSX-1, IL-12R $\beta 2$::gp130, Homodimere IL-12R $\beta 2$ oder gp130) aktivieren. Die aktivierten Rezeptorkomplexe phosphorylieren kanonisch JAK/STAT-Moleküle, die verschiedene Funktionen innerhalb des Immunsystems regulieren. Differenzierung (Diff.), Inhibition (Inhb.), Stimulation (Stim.), Aktivierung (Akt.). Abbildung mit Biorender erstellt und modifiziert nach [40-43].

Die β -Untereinheit p40 von IL-23 interagiert ebenfalls mit IL-12R $\beta 1$, während die α -Untereinheit p19 mit dem IL-23 Rezeptor (IL-23R) interagiert [40]. Nach Ligandenbindung erfolgt die Signaltransduktion über die IL-23R-assozierte JAK2 und IL-12R $\beta 1$ -assozierte Tyk2 und die daraus resultierende STAT3- und STAT4-Phosphorylierung [43]. Die Zytokine der IL-12 Familie, die adressierten Zellen und die Art der Signaltransduktion mit Zellantwort sind in **Abbildung 2** zusammengefasst.

IL-12 wird von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen während einer akuten Entzündung produziert und ist an der Differenzierung und Aktivierung von T_H1-Zellen beteiligt. IL-12 fördert die Produktion von IFN-gamma (IFN- γ), was wiederum die Proliferation von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T_H1-Zellen stimuliert und zu einer erhöhten Expression von IFN- γ führt. Dieser positive Feedbackloop erhöht die IL-12-Sekretion, die wiederum die Differenzierung von naiven T- Zellen in T_H1-Zellen verstärkt. Zudem verstärkt es die Makrophagenaktivität und somit die antimikrobielle

und antiparasitäre Abwehr sowie die antitumoröse Aktivität, die unter anderem auf IL-12 und IFN- γ zurückzuführen ist. IL-23 wiederum induziert die Reifung und Aufrechterhaltung von TH17-Zellen, die durch die Sekretion von IL-17 und anderen proinflammatorischen Faktoren wie TNF, IL-6 und IFN- γ eine Rolle in der antimikrobiellen und antimykotischen Abwehr spielen [44].

Pathologisch sind beide Zytokine an der Entwicklung entzündlicher und autoimmunen Erkrankungen beteiligt. Eine Überproduktion von IL-12 kann zu chronischen Entzündungen und Autoimmunreaktionen führen, indem es eine übermäßige TH1-Antwort fördert. IL-23 wird mit Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) in Verbindung gebracht, da eine übermäßige TH17-Aktivität zu Gewebeschäden und chronischen Entzündungen führt. Die TH17-Zellen regen die dendritischen Zellen in den Mesenteriallymphknoten zur Sekretion von IL-12 und IL-23 an, welche die TH1-Zellen stimulieren. In Biopsien aus pathologisch veränderten Abschnitten von Patienten mit CED wurden vermehrt TH1- und TH17-Zellen nachgewiesen [45].

Therapeutische Ansätze, die auf die Hemmung dieser Zytokine abzielen, haben sich bei der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen als wirksam erwiesen. Sie zielen auf die Inhibition von p40 zur Blockade des IL-12R- und IL-23R-Komplexes und auf die Inhibition von p19 zur Blockade des IL-23R-Komplexes ab und sind für die Behandlung von Psoriasis und CED zugelassen [44].

1.4. DIE INTERLEUKIN-6 FAMILIE

Die IL-6 Familie ist durch eine Glykoprotein 130 (gp130)-abhängige Signaltransduktion definiert [46]. Eine detaillierte Interaktion von Zytokinen und Rezeptoren mit den Signaltransduktionskomponenten ist in **Abbildung 3** dargestellt. Alle Zytokine der IL-6 Familie, mit Ausnahme von IL-31, verwenden mindestens einen gp130 β -Rezeptor zur Signaltransduktion. Dazu gehören IL-6, IL-11, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin-M* (OSM), *Cardiotrophin 1* (CT-1), *Ciliary Neutrophic Factor* (CNTF) und *Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1* (CLCF1) [47]. Abhängig vom Zytokin agiert gp130 entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit einem der drei β -Rezeptoren LIF-Rezeptor (LIFR β), OSM-Rezeptor (OSMR β) oder WSX-1.

Einige Zytokine binden zur Signaltransduktion nur an zwei β -Rezeptoren, andere Mitglieder benötigen einen α -Rezeptor, um eine Dimerisierung der β -Rezeptoren zu induzieren [48]. Die JAK/STAT Signaltransduktion der verschiedenen Rezeptorkonstellationen weist zunächst eine Ähnlichkeiten auf, jedoch unterscheidet sich die Aktivität verschiedener JAK (JAK1, 2, 3 und Tyk2) und STAT (1, 2, 3, 4, 5A, 5B, 6) Moleküle in

verschiedenen Rezeptorkomplexen [49]. Darüber hinaus werden α - und β -Rezeptoren unterschiedlich exprimiert, was die Signalantwort von gp130 nach Bindung eines Zytokins der IL-6 Familie spezifiziert [50].

2. DIE PHYSIOLOGIE UND SIGNALTRANSDUKTION VON IL-6

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das an der Regulation verschiedener immunologischer und homöostatischer Funktionen beteiligt ist. Das IL-6 wird von Immunzellen wie B- und T-Zellen, Monozyten und Makrophagen sowie von anderen Zellpopulationen wie Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten oder Tumorzellen sekretiert [51]. Der pleiotrope Charakter von IL-6 zeigt sich in der Zellantwort, die nach je Zelltyp, der Umgebung und vorliegenden Signalwegen variiert [51].

Die IL-6 Familienmitglieder besitzen pleiotrope Funktionen bei der Modulation von Entzündungen bei akuten und chronischen Erkrankungen. Dabei entfalten die IL-6 Familie-Zytokine antiinflammatorische Effekte in Modellen akuter Entzündungen und proinflammatorische Effekte bei chronischen Erkrankungen [48, 52]. Der klassische IL-6 Signalweg ist an einer Vielzahl von Funktionen in der Leber beteiligt (**Abbildung 3**). Die Aktivitäten reichen von der Aufrechterhaltung der Homöostase, der Induktion von Akute-Phase-Proteinen und C-reaktivem Protein (CRP) während einer akuten Entzündungsreaktion über die Regulation der Expression des Blutgerinnungsfaktors Fibrinogen bis hin zur Regulation des enterohepatischen Kreislaufs [53-55]. Darüber hinaus reguliert IL-6 die Regeneration von geschädigtem Gewebe, einschließlich der Leberregeneration bei akutem Masseverlust [48].

IL-6 ist ein zentrales Protein der antigenspezifischen Antwort, indem es an der Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen und als Bestandteil des zellulären Metabolismus involviert ist. In IL-6 defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Pathogenlast bei Infektion mit verschiedenen Erregern beschrieben [48, 56]. IL-6 aus Adipozyten kann eine Insulinresistenz und Entzündung hervorrufen, während IL-6 aus Skelettmuskel die Steigerung der Glykolyse und Insulinfreisetzung unterstützt [57]. Weitere Funktionen sind der Schutz der Muskelfasern vor oxidativem Stress [58]. Diese gegensätzlichen Wirkungen können unter anderem mit der Art des IL-6 Signalwegs zusammenhängen. Während der klassische Signalweg positive Effekte bei der metabolischen Regulation haben kann, zeigt das IL-6 Trans-signaling der Adipozyten negative Effekte. Sowohl die Quelle der IL-6 Produktion als auch die Art der Signaltransduktion bestimmen die physiologische Rolle von IL-6 im Stoffwechsel [50].

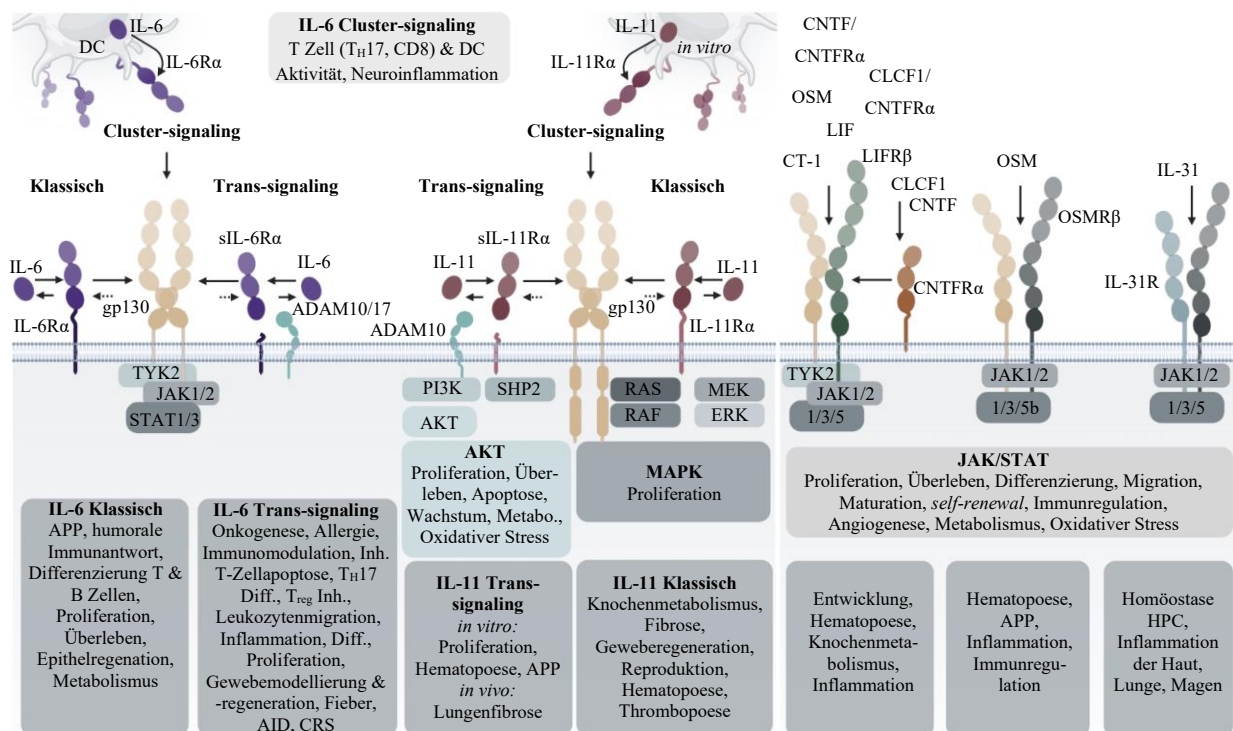


Abbildung 3: Die Signaltransduktion der IL-6 Familie über klassische, Trans- und Cluster-signaling mit schematisch vereinfachter Darstellung der JAK/STAT-, MAPK- und AKT-Signalwege und deren Funktion im Immunsystem. Bei der klassischen Signaltransduktion erfolgt zunächst die Bindung von IL-6 bzw. IL-11 an eine spezifische α -Rezeptoruntereinheit (IL-6R α bzw. IL-11R α), um anschließend als Komplex die Bindung an die signalübertragenden Homodimere des gp130 β -Rezeptors zu ermöglichen. Das Trans-signaling wird durch sIL-6R α oder sIL-11R α vermittelt, die durch alternatives *splicing* oder ADAM10/17 *ectodomain shedding* in Lösung gebracht werden und alle Zielzellen mit gp130 auf der Oberfläche aktivieren können. Das IL-6 Cluster-signaling wird durch dendritische Zellen (DC) induziert, die IL-6 über membrangebundenes IL-6R α binden und T-Zellen über gp130 aktivieren. Die Zellpopulation für IL-11 Cluster-signaling noch nicht beschrieben. IL-6, IL-11 und IL-35 induzieren die Signaltransduktion ausschließlich über gp130. Die anderen Zytokine der IL-6 Familie leiten die Signaltransduktion über heterodimere β -Rezeptorkomplexe ein. Während CLC, CNTF den membrangebundenen oder löslichen CNTFR α als α -Rezeptor benötigen und als Heterodimer über gp130 und LIFR signalisieren, interagieren die Zytokine LIF, OSM, IL-27 und IL-31 direkt mit zwei β -Rezeptoruntereinheiten ohne die Hilfe eines ligandenbindenden α -Rezeptors. Lösliche β -Rezeptoren (sgp130, sOSMR, sLIFR, sIL-31R, sWSX-1) sind natürliche Inhibitoren der Signaltransduktion, während lösliche α -Rezeptoren (sIL-6R α , sIL-11R α , sCNTFR α) einen agonistischen Charakter aufweisen. Akute-Phase-Proteine (APP), Inhibition (Inh.), Differenzierung (Diff.), *autoimmune diseases* (AID), *cytokine release syndrome* (CRS), *hematopoietic progenitor cells* (HPC). Abbildung mit Biorender erstellt und modifiziert nach [47, 59-62].

2.1. DIE IL-6 SIGNALTRANSDUKTION UND DAS PUFFERSYSTEM

Die Zytokine IL-6 und IL-11 binden an den respektiven membranständigen α -Rezeptor, der daraufhin als Komplex mit dem gp130 β -Rezeptor den klassischen Signalweg induziert (**Abbildung 3**). Da diese Zytokine keine Affinität zum gp130 β -Rezeptor besitzen erfolgt die Homodimerisierung erst nach der Bindung an den membranständigen α -Rezeptor [63, 64]. Während die klassische Signaltransduktion von IL-6 auf Hepatozyten, Megakaryozyten, sowie auf Leukozyten (B-Zellen, T-Zellen, Neutrophile, Makrophagen und Monozyten) und einige Subpopulationen von Epithelzellen beschränkt ist, ist die klassische Signaltransduktion von IL-11 aufgrund der exklusiven Expression des membranständigen α -Rezeptors auf Osteoblasten, Megakaryozyten, Hepatozyten, Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen auf andere Zielzellen begrenzt [50, 65].

Der signaltransduzierende β -Rezeptor gp130 kommt ubiquitär vor und kann anderweitig angesteuert werden [63]. Entweder erreichen weitere Mitglieder der IL-6 Familie eine Heterodimerisierung des β -Rezeptors oder die Homodimerisierung erfolgt über das Trans-signaling [47]. Dabei können potentiell alle Zellen stimuliert werden, da ein Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6R α (*soluble* IL-6R α , sIL-6R α) oder IL-11 und löslichem IL-11R α (*soluble* IL-11R α , sIL-11R α) einen ternären Komplex mit dem membranständigen β -Rezeptor gp130 bildet. Durch das Trans-signaling wird die Reichweite auf alle Zielzellen, die den β -Rezeptor gp130 auf der Zelloberfläche tragen, enorm erweitert. Im menschlichen Körper kann das IL-6 Trans-signaling entweder durch alternatives *Splicing* (ca. 15%) oder durch die posttranslationale Modifikation, das sogenannte *ectodomain shedding* der *stalk*-Region des α -Rezeptors (ca. 85%), induziert werden [50]. Das *ectodomain shedding* durch die Proteasen ADAM10 oder ADAM17 setzt einen streng regulierten Prozess in der inflammatorischen Immunantwort voraus, da es nicht nur Zytokine, sondern auch membranständige Rezeptoren wie IL-6R α oder TNFR1/II spaltet [18, 66-69]. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression und Aktivität von ADAM10 und ADAM17 mit pathologisch-inflammatorischen Prozessen assoziiert. Dazu zählen die Entwicklung von CED, RA oder Morbus Alzheimer [70-73].

Die Aktivität von ADAM10 ist konstitutiv, während ADAM17 unter bestimmten Bedingungen durch Zytokine wie TNF, *epidermal growth factor* (EGF), Proteinasen, Proteinkinase C, G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Apoptose aktiviert wird [74]. Die ADAM17 Aktivität ist in der Homöostase gering und die physiologische Konzentration von sIL-6R α ist auf einen Bereich von 40-75 ng/ml begrenzt. Dahingegen steigt die ADAM17 Aktivität und damit die sIL-6R α Konzentration bei akuter oder chronischer Inflammation um das 2-10-fache an [75-77]. Unter physiologischen Bedingungen liegt die IL-6 Konzentration im niedrigen Bereich von 1-10 pg/ml und steigt unter akuter oder chronischer Inflammation, wie z.B. bei RA oder Castleman Syndrom, auf 20-200 pg/ml an [78]. Bei Sepsis oder *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zell-assoziierten *cytokine release syndrom* (CRS) werden erhöhte Werte von 1000-3000 pg/ml IL-6 gemessen [79].

Mit dem systemischen Anstieg von sIL-6R α und IL-6 steigt die Menge des IL-6/sIL-6R α Komplexes im Blut an. IL-6 zeigt im Serum eine ähnliche Affinität zu sIL-6R α wie zu membranständigem IL-6R α (1 nM). Die Bindung von IL-6/sIL-6R α wird mit einer sehr niedrigen Affinität zu gp130 (10 pM) stabilisiert, was zum Trans-signaling in der Zelle führt [47]. Die Plasmakonzentration von sgp130 liegt bei gesunden Patienten zwischen 100-300 ng/ml und ist bei Patienten mit Multipler Sklerose oder Melanom erhöht [80, 81]. Alternatives *splicing* von gp130 führt zu einer im Blut löslichen Variante, wobei neuere

Erkenntnisse das *ectodomain shedding* von gp130 durch die Protease BACE1 zeigen [82, 83]. Bei einem basalen sgp130-Level kann der Anstieg von sIL-6R α als natürliches Puffersystem mit kompetitiver Wirkung für das IL-6 Trans-signaling fungieren. Da die Menge an sgp130 unter physiologischen Bedingungen die von sIL-6R α nicht übersteigt, hängt die sgp130 Pufferkapazität von sIL-6R α ab [84, 85]. Dabei steigt die sgp130 Menge unter inflammatorischen Bedingungen bedingt an, so dass ein Überschuss an sIL-6R α zu IL-6 Trans-signaling und dauerhaft zum pathologischen Bild beitragen kann [86-88].

2.2. DIE KLINISCHE BEDEUTUNG UND INTERVENTION VON IL-6 TRANS-SIGNALING

Während die klassische Signaltransduktion mit homöostatischen Prozessen und der Immunantwort in Verbindung gebracht wird, überwiegt das Trans-signaling bei chronischen Entzündungsreaktionen, pathologischen Prozessen und der Tumorgenese [49, 60, 89]. Therapiestrategien für verschiedene chronisch-entzündliche Erkrankungen, COVID-19 oder für CAR-T-Zell-assoziierten CRS bei Krebspatienten befinden sich in klinischen Studien [49, 90-95]. Sie richten sich als Antikörper gegen die globale IL-6 Blockade oder als *small molecule* gegen einen Effektor der Signaltransduktionskaskade wie JAK [96]. Eine Vielzahl von JAK-Inhibitoren wurde in den letzten Jahren zugelassen, um als entzündungshemmende Medikamente die intrazelluläre Signalweiterleitung zu blockieren [49]. Obwohl JAK-Inhibitoren als immunmodulatorische Wirkstoffe neben der IL-6 Signalkaskade weitere intrazelluläre Signalwege blockieren, überwiegt bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen der Nutzen, auch wenn es mit risikobehafteten Nebenwirkungen verbunden ist [90, 93, 97].

Eine Inhibition von IL-6 durch spezifische Antikörper ermöglicht eine gezielte Intervention eines Signalweges ohne Beeinträchtigung anderer Zytokine in ihrer Signalkaskade. Dabei unterscheiden sich in der Therapie oder klinischen Studien eingesetzten monoklonalen Antikörper (mAb) in der Art der Neutralisierung. Einige neutralisieren über die Bindung an IL-6, andere mAb binden an IL-6R α [50]. Beide Ansätze blockieren jedoch das klassische und Trans-signaling, was mit Nebenwirkungen verbunden ist [49]. Siltuximab bindet an die *site I* von IL-6 und blockiert so die Interaktion mit IL-6R α (**Abbildung 4A**) [98]. Siltuximab ist für die Behandlung der multizentrischen Castleman-Krankheit zugelassen und entfaltet entzündungshemmende und immunsuppressive Eigenschaften mit Nebenwirkungen wie Infektionen, Neutropenie, Thrombozytopenie, Gewichtszunahme, Juckreiz oder makulopapulösem Hautausschlag [98]. Clazakizumab bindet *site I* von IL-6 und wurde in einer klinischen Studie zu RA und Psoriasis als sicher eingestuft, befindet sich jedoch in einer Phase-III-Studie zur chronisch-aktiven Antikörper-vermittelten Abstoßung

nach Nierentransplantation [99-101]. Im Gegensatz zu den genannten mAb bindet Olokizumab an *site III* von IL-6 und blockiert so die Bildung des Rezeptorkomplexes mit gp130 (**Abbildung 4A**) [102]. In einer Phase-III-Studie sprachen Patienten mit RA auf die Therapie vergleichbar mit Adalimumab an. Wie Tocilizumab und Sarilumab neigen auch IL-6-mAb-Therapien zu Hypercholesterinämie und erhöhten Leberwerten [99, 102, 103].

Ein Interventionsansatz bei Patienten mit Multiplen Myelom mit einem neutralisierenden IL-6-mAb führte zunächst zu einer Remission. Jedoch erhöhte sich aufgrund des vergrößerten IL-6-mAb Komplexes die Halbwertszeit von IL-6 mit schweren Nebenwirkungen bis hin zur Sepsis, weshalb die Behandlung abgebrochen wurde [104-106]. Diese Erfahrung unterstützte die Entwicklung eines neutralisierenden IL-6R α -mAbs, um die Ausscheidung von IL-6 über die Niere zu gewährleisten. Heute befindet sich der IL-6R α -mAb Tocilizumab unter dem Handelsnamen RoActemra® in einer klinischen Phase-II-Studie bei Patienten mit Multiplem Myelom [107]. Darüber hinaus wurde Tocilizumab zur Behandlung der Castleman-Krankheit (2006), der RA (2009), der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) (2011), der polyartikulären juvenilen idiopathischen Arthritis (pJIA) (2013), der Riesenzellerarthritis (RZA) (2017) und des CAR-T-assoziierten CRS bei Krebspatienten (2018) zugelassen [96]. Sarilumab wurde 2017 als IL-6R α neutralisierender mAb ebenfalls zur Behandlung von RA zugelassen. Dabei hat Sarilumab eine 20-fach höhere Affinität und eine längere Halbwertszeit im Blut als Tocilizumab [108, 109]. Die Nebenwirkungen von Sarilumab sind Infektionen, Neutropenie, Anstieg der Transaminasen, Cholesterin, *high density lipoprotein* (HDL) und Gewichtszunahme [109, 110]. Als Folge der Blockade des klassischen Signalweges durch Tocilizumab sind die Nebenwirkungen durch erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen, Hyperlipidämie oder Veränderung der kardialen Funktion ähnlich wie bei Sarilumab [111, 112]. In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2004 zeigte Tocilizumab eine Wirksamkeit bei CD mit einem *Crohn's Disease Activity Index Score* von ≥ 70 . Die Studie wurde jedoch abgebrochen, da unter anderem gastrointestinale Perforationen beobachtet wurden, die auf die Rolle von IL-6 bei der homöostatischen Epithelproliferation zurückzuführen waren [113-115]. Zudem wurden 2016 Patienten mit RA auf gastrointestinale Perforationen untersucht, die unter IL-6-mAb-Therapie mit einer Inzidenz von 2,8% häufiger auftraten als unter TNF-mAb-Therapie mit einer Inzidenz von 0,9% [116]. Als weitere Nebenwirkung von Sarilumab und Tocilizumab wurde nach der Zulassung eine erhöhte Inzidenz von Pankreatitis beobachtet [117]. Die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus der IL-6 Signalwege kann zu einer verbesserten Therapie führen. Folglich wurden alternative Strategien entwickelt, um den Trans-signaling-Komplex IL-6R α /sIL-6R α

zu inhibieren [118]. So können im Mausmodell durch spezifische IL-6 Trans-signaling-Blockade die klassisch vermittelten homöostatischen Prozesse aufrechterhalten werden [119, 120]. Es wird spekuliert, dass unerwünschte Nebenwirkungen wie gastrointestinale Perforationen, Infektionen, Gewichtszunahme, erhöhte Insulinresistenz, Pankreatitis oder kardiovaskuläre Komplikationen vermieden werden könnten [71, 86, 119-125].

2.2.1. FROM BENCH TO BEDSIDE: OLAMKICEPT BEI CHRONISCH-ENTZÜNDLICHEN DARMERKRANKUNGEN

Das umfassende Verständnis von IL-6 im Rahmen der klassischen, Trans- und Cluster-signaling hat zu der Erkenntnis beigetragen, dass IL-6 ein Schlüsselfaktor der Immunmodulation bei Krankheit und Homöostase ist [60]. Das Wirkungsspektrum von IL-6 Trans-signaling wurde mit der Entdeckung des *sheddings* bzw. alternativen *splicings* auf eine ganze Reihe von Zielzellen erweitert. Damit ist die Spezifität von IL-6 nicht mehr vom membranständigen α -Rezeptor abhängig und führt mit einer deutlich stärkeren Signalantwort zu vielen pathologischen Beobachtungen [81, 126].

Das Hyper IL-6 (HIL-6), ein Fusionsprotein aus sIL-6R α und IL-6 verbunden über einen flexiblen Linker, wurde zum Nachweis der physiologischen Funktion des Trans-signaling entwickelt. Zusätzlich wurde ein antagonistisches Fusionsprotein, namens *soluble glycoprotein 130 Fc* (sgp130Fc), bestehend aus der extrazellulären Domäne des gp130 und einer *fragment crystallizable* (Fc) Region des humanen Immunglobulin G1 Antikörpers (IgG1) erstellt. Dieses Tool wurde zuerst 2001 zur Untersuchung der physiologischen Funktionalität des Trans-signaling von der Gruppe Rose-John beschrieben (**Abbildung 4B**) [67, 118]. Diese Entwicklungen waren die Voraussetzung für eine Differenzierung zwischen klassischem und Trans-signaling von IL-6.

Das sgp130Fc, auch Olamkicept, zeigte in einer Vielzahl vorklinischer Studien sowohl die agonistische Wirkung von sIL-6R α als auch den pathologischen Einfluss des Trans-signaling im Rahmen inflammatorischer Krankheiten, darunter intestinale Inflammation, RA, Asthma, diverse Karzinome, Sepsis, Lungendysfunktion und Lupus erythematosus [71, 114, 123, 124, 127, 128]. Da sgp130Fc keine Affinität zum monomeren IL-6 oder zum membranständigem IL-6R α besitzt, blockiert es spezifisch das Trans-signaling ohne Beeinträchtigung des klassischen Signalweges [118]. In einem *in vivo* Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* konnte demonstriert werden, dass die selektive Blockade des Trans-signaling durch sgp130Fc keinen Einfluss auf die Infektionsabwehr über die klassische IL-6-Signalantwort hat [119]. Dies wurde in einer weiteren Studie an Mäusen mit Mykobakterien untermauert [120]. Bei Wildtyp-Mäusen mit einer *high fat diet* (HFD) verhinderte das

sgp130Fc die proinflammatorische Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe, ohne zu einer erhöhten Insulinresistenz oder einer verringerten Glukosetoleranz zu führen [122, 129]. Dagegen weisen IL-6-defiziente Mäuse bei HFD eine Hepatitis und Insulinresistenz auf [121]. Dies deutet auf die metabolische Funktion des IL-6 klassischen Signalweges hin.

Die Blockade des klassischen IL-6 Signalweges, jedoch nicht die Blockade des Trans-signalings, könnte die Ursache für die metabolischen Nebenwirkungen bei Tocilizumab sein. Des Weiteren wurde die regenerative Kapazität des Darmepitheliums, des Pankreas und der Nieren im Gegensatz zur globalen IL-6 Blockade nicht von sgp130Fc beeinflusst [114, 124, 130]. Die gezielte Inhibition des IL-6 Trans-signalings steht im Vordergrund, da der klassische Signalweg weiterhin als protektive Funktion des Immunsystems zur bakteriellen Abwehr und der Homöostase von Leber und Pankreas besteht, während der pathophysiologische Aspekt anvisiert werden kann [46, 57, 120].

In vivo Darmkrebsmodelle zeigen eine positive Korrelation zwischen der erhöhten Menge an IL-6 und der Hemmung der T-Zellapoptose. Diese wird durch eine Deletion des Gens für IL-6 oder durch eine Blockade des IL-6 Trans-signalings aufgehoben. Dadurch wird eine Beteiligung von IL-6 Trans-signaling am Tumorwachstum gezeigt [71]. In Mausmodellen mit CED konnte die schützende Wirkung einer selektiven Inhibition des IL-6 Trans-signalings durch sgp130Fc für die Mukosa nachgewiesen werden. Eine IL-6-Defizienz oder eine globale IL-6-Hemmung hingegen resultierte in einer stärkeren Entzündung, die durch eine erhöhte Schädigung der intestinalen Epithelzellen gekennzeichnet war [71, 114, 123, 131].

Die *in vivo* gewonnenen Erkenntnisse wurden in zwei klinischen Phase-II-Studien bei Patienten mit CED evaluiert, welche zu vielversprechenden Ergebnissen führten. In einer *open-label* Phase-IIa-Studie mit 16 CED Patienten sprachen 44% der Patienten auf die Therapie mit je 600 mg Olamkicept über einen Zeitraum von 12 Wochen an und 19% erreichten eine klinische Remission ohne schwerwiegende Nebenwirkungen im Zusammenhang mit einer behandlungsbedingten Immunsuppression [132]. Eine Transkriptomanalyse der entzündeten Mukosa von Patienten in klinischer Remission zeigte eine Unterdrückung des STAT3 Signalweges ohne einen negativen Einfluss auf die Proliferation oder Gewebereparatur der Epithelzellen [132]. Die regenerative Kapazität beruhend auf dem klassischen IL-6 Signalweg verringerte somit das Risiko von gastrointestinaler Perforationen, was in einer klinischen Studie mit Tocilizumab in einer globalen IL-6 Blockade bei CD-Patienten nicht beobachtet wurde [115, 133, 134].

Insgesamt 91 Patienten mit UC sprachen zu 58,6% in einer multizentrisch-randomisierten Doppelblindstudie der Phase-II auf die sgp130Fc Therapie nach 12 Wochen im Gegensatz zur Placebogruppe mit 34,5% an (NCT03235752). Eine klinische Remission, erhoben mit dem Mayo-Score, trat bei 20,7% der Patienten mit 600 mg Olamkicept auf. Des Weiteren konnte bei 33,1% der Patienten eine Heilung der Mukosa beobachtet werden, während dies in der Placebo-Gruppe lediglich bei 3,4% der Fall war. Signifikante Nebenwirkungen mit $\geq 5\%$ (bis 7%) waren unter der Therapie von Olamkicept - im Gegensatz zur Placebogruppe - erhöhte Bilirubinwerte, AST-Werte und Hyperurikämie [135]. Zusammenfassend lässt sich ein Zusammenhang zwischen Trans-signaling und einigen Erkrankungen postulieren, da erhöhte Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R α im Serum beschrieben werden [48, 71, 84, 114, 131]. Das IL-6 Trans-signaling hat somit das Potenzial von sgp130Fc bei zahlreichen chronisch-entzündlichen, autoimmunen oder tumorösen Erkrankungen interveniert zu werden.

2.2.2. WEITERENTWICKLUNG DES SGP130Fc ZUM DESIGNERMOLEKÜL CS130Fc

Der Zusammenhang zwischen einer Gewebepenetration und der Größe eines Antikörpers stellt eine korrelative Hürde dar [136]. Demnach könnte die Größe des sgp130Fc mit 240 kDa ein limitierender Faktor sein. Kleinere in Patienten identifizierte Varianten wie das sgp130 Monomer (120 kDa) oder die verkürzte D1-D3 Variante sgp130-RAPS (50 kDa) sind bereits beschrieben. Diese weisen jedoch eine verringerte inhibitorische Charakteristik auf (**Abbildung 4B**) [118, 127, 137]. Die dimere sgp130Fc Variante ist um den Faktor 10-100 biologisch aktiver als das monomere sgp130 [118]. Die Avidität des sgp30Fc kann damit begründet werden, dass die Domänen D2-3 *site II* binden, während die Domäne D1 des anderen sgp130 simultan mit *site III* von IL-6/sIL-6R α interagiert. Dagegen erreicht das monomere sgp130 aufgrund sterischer Hinderung jeweils entweder *site II* oder *site III*. Dies kann in einer höheren Affinität als das körpereigene sgp130 resultieren [118]. Die Basis von sgp130Fc wurde optimiert, um eine höhere Affinität, Spezifität und Bioverfügbarkeit der *next generation* IL-6 Trans-signaling-Inhibitoren zu erreichen [138].

Da sgp130Fc als Teil des β -Rezeptors gp130 mit allen Zytokinen der IL-6 Familie interagieren könnte, ist eine potentielle inhibitorische Aktivität zu anderen Zytokinmitglieder nicht ausgeschlossen. In hohen Konzentrationen wirkt sgp130Fc kompetitiv hemmend und beeinflusst dadurch die Signaltransduktion von LIF und OSM [118, 139]. Des Weiteren wird ein Signalweg des verwandten Zytokins IL-11 ebenfalls von sgp130 inhibiert. Das IL-11 ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, darunter die Geweberegeneration, Hämatopoese, Megakaryopoese, Thrombopoese, Reproduktion, Knochenentwicklung und -

metabolismus, Leberfunktion, Plasmazellproliferation und die T-Zell-abhängige Entwicklung von Antikörper-exprimierenden B-Zellen [140]. Dem IL-11 werden auch schädigende Eigenschaften in Form von gastrointestinalen Magendarm-, Pankreas-, Brustkrebs, Fibrose bei Kardiomyozyten, Lunge, Leber und Inflammation einer asthmatischen Lunge zugeschrieben [50, 140-146]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass ADAM10- oder Serin-Proteasen den löslichen IL-11R α und damit das IL-11 Trans-signaling induzieren [147, 148].

Die lösliche Form von IL-11R α (sIL-11R α) konnte im Serum von Patienten mit Magenkarzinom nachgewiesen werden. Die physiologische Aktivität von sIL-11R α wurde bislang lediglich in Mausmodellen gezeigt [59, 147]. Der Einfluss des IL-11 Trans-signalings im pathologischen Kontext ist bislang ungeklärt, da eine Differenzierung zwischen IL-6 und IL-11 Trans-signaling schwierig ist [50]. sgp130Fc bindet beide Trans-signaling-Komplexe mit ähnlicher Potenz [147, 149]. Aufgrund der lückenhaften Charakterisierung der Funktion *in vivo*, kann aktuell eine wünschenswerte Inhibition von IL-11 Trans-signaling mittels sgp130Fc nicht bestätigt werden. Daher wurde eine exklusive Inhibition von IL-6 Trans-signaling als erste Optimierung angestrebt [138, 149-151].

Das verkleinerte Molekül, bekannt unter *chimeric* sgp130Fc (cs130Fc), enthält die zytokinbindenden Domänen D1-3 von sgp130 (**Abbildung 4**). Anstelle der Domänen D4-6 von gp130 stabilisiert ein Einzeldomänen-Antikörper (VHH oder Nanobody) zunächst den IL-6-sIL-6R α Komplex (VHH6) ohne neutralisierende Funktion. Fusioniert über eine TEV-Site (*tobacco etch virus*) mit einem Fc des humanen IgG1 zu einem dimeren Konstrukt, zeichnet sich das cs130Fc im Vergleich zu sgp130Fc durch eine geringere Molekülgröße von 157 kDa aus [138, 152]. Die kompetitive Wirkung des cs130Fc resultiert aus der Stabilisierung des IL-6/sIL-6R α -Komplexes durch den VHH6 sowie der Maskierung der Bindungsoberfläche durch die zytokinbindenden Domänen D1-3 des sgp130. Damit ist die biologische Aktivität von cs130Fc in Hinblick auf das IL-6 Trans-signaling nicht nur vergleichbar mit sgp130Fc, die verkleinerte Variante weist zudem eine höhere Selektivität aufgrund reduzierter IL-11 Trans-signaling Affinität auf [138].

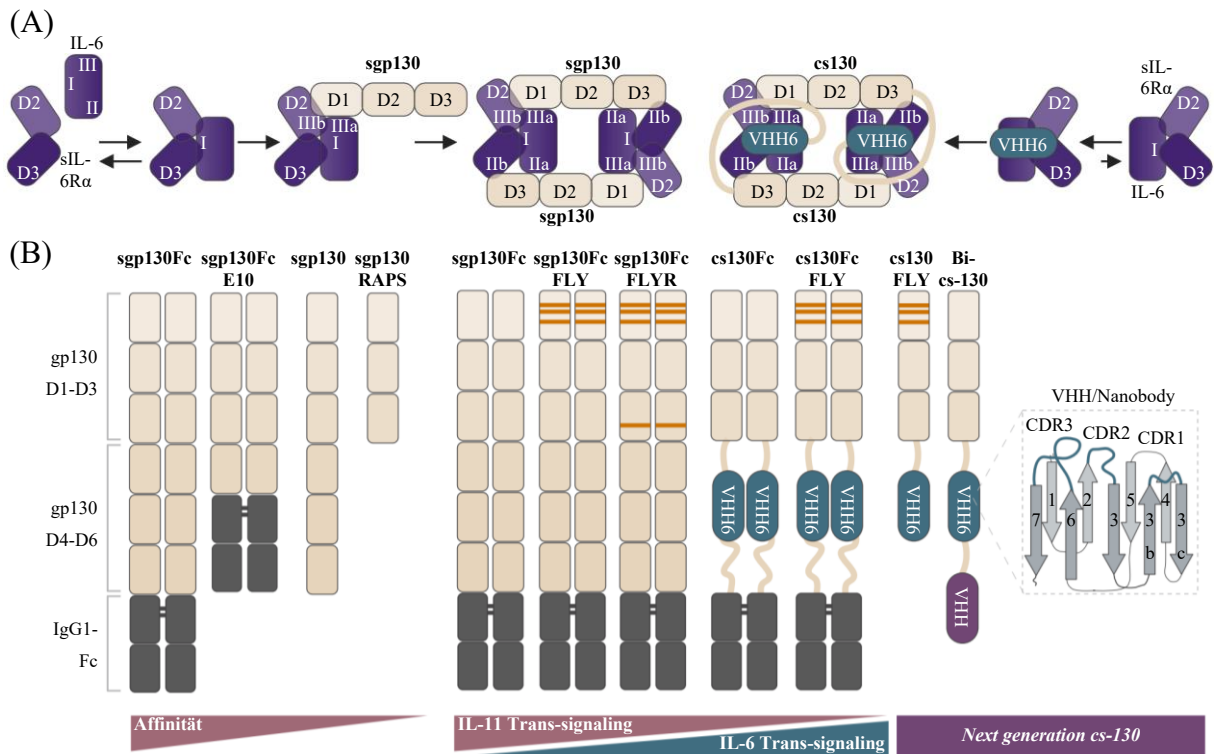


Abbildung 4: Vergleich der Affinität und Spezifität von sgp130 Varianten und *next generation* Inhibitoren. Eine Strukturaufklärung von Boulanger und Kollegen im Jahre 2003 klärte das Bindungsparadigma von IL-6 an IL-6Rα und gp130 auf und begründete die spezifische Inhibition von Trans-signaling mittels sgp130 [153]. **(A)** Das Bindungsparadigma von IL-6 wurde auf drei Bindestellen (*site* I, II und III) zurückgeführt. IL-6 bindet zunächst mit der *site* I die D2-3 Domäne von IL-6Rα, woraufhin dieser präformierte Komplex über die *site* IIa von IL-6 mit geringer Affinität die D2-3 Domäne von gp130 bindet. Gleichzeitig bindet hochaffin die *site* IIIa von IL-6 die D1 Domäne von gp130. Zudem interagiert der IL-6/sIL-6Rα Komplex mit gp130 über *site* IIb an D3 und über *site* IIIb an D1. **Links:** Bindungsparadigma von gp130 oder sgp130. **Rechts:** Stabilisierung des IL-6/sIL-6Rα Komplexes über einen nicht neutralisierenden Einzeldomänenantikörper (VHH6) als Teil des Fusionsproteins cs130Fc, welches mit Hilfe der D1-3 Domäne von gp130 im cs130Fc das IL-6 Trans-signaling neutralisiert. **(B)** **Links:** Die D1-D6 Domänen von gp130 sind über Disulfidbrücken des IgG1-Fc im sgp130Fc und sgp130FCE10 kovalent dimerisiert. Trunkierte oder monomere Varianten wurden durch alternatives *splicing* oder Polyadenylierung im menschlichen Serum oder Urin beschrieben, weisen jedoch laut den Autoren eine reduzierte Effektivität bzw. Antikörper gegen eine Sequenz (NIASF) im RAPS-Molekül auf [127, 154]. **Rechts:** *Next generation* IL-6 Trans-signaling Inhibitoren: Mutationen im sgp130Fc (T102Y-Q113F-N114L: FLY, FLY + R281Q: FLYR) erhöhen die Spezifität für IL-6 Trans-signaling [138, 149-151]. Die D1-D3 Domänen von gp130 sind mit VHH6 fusioniert, eine TEV-Sequenz ermöglicht die Monomerisierung von cs130Fc durch Spaltung von IgG1-Fc. Zudem erhöhen die FLY Mutationen im cs130Fc die IL-6 Trans-signaling Spezifität. Bispezifische cs130Fc Varianten sind in dieser Arbeit beschrieben [155, 156]. Die schematische Darstellung des VHH/Nanobody besteht aus neun β -Faltblättern und drei *complementarity-determining regions* (CDR) Schleifen (türkis), die gegen bestimmte Epitope gerichtet sind (VHH6: IL-6-sIL-6Rα [152], VHH72: RBD vom Spike SARS-CoV-2 (PMID: 32075877) [157], VHH72: TNF [158], VHHp40: p40 β -Untereinheit von IL-12 oder IL-23 [159]. Abbildung mit Biorender erstellt und modifiziert nach [50].

Die ersten beiden Publikationen 1 und 2 knüpfen an die Weiterentwicklung des verkleinerten cs130Fc an, indem die modulare Eigenschaft genutzt wird, um weitere Nanobodies für proinflammatorische Erkrankungen als bispezifische Blockade zu ergänzen. Die chimären Blocker cs130-TNF^{VHH}Fc und cs130-IL-12/23^{VHH}Fc könnten in Krankheiten wie CED oder RA, als Vorteil einer Kombinationstherapie ihre Anwendung finden. Das Molekül c19s130Fc visiert die Blockade des IL-6 Trans-signalings bei Coronainfektionen an. Bisher wurde der Einfluss des Trans-signalings unter chronisch-inflammatorischen Bedingungen vorgestellt. Im nachfolgenden Kapitel wird auf die Komplikation des Zytokinsturms bei COVID-19 Patienten eingegangen.

3. CORONAVIRUS DISEASE 2019

Die Infektionskrankheit COVID-19, ein Akronym für *Coronavirus disease 2019*, wird durch ein Virus der Familie Coronaviridae verursacht [160]. Die Art wurde nach der Symptomatik der Coronaviren benannt: *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* SARS, das bisher zwei Unterarten (SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2) aufweist, die seit 2002 zwei schwere Epidemien, darunter eine Pandemie mit weltweiten Auswirkungen, verursacht haben. Das *positive-sense, single-stranded* (+) ssRNA Virus ist ein proteinumhülltes Virus, dessen RNA direkt an den Ribosomen zu Proteinen translatiert wird [160]. 15 Jahre nach dem ersten SARS Ausbruch identifizierten Wissenschaftler die Chinesische Huftsennase, ein Fledertier, als Ursprung der schweren Viruserkrankung beim Menschen und warnten bereits 2017, dass sich ein tödlicher Ausbruch mit diesem Virus aufgrund der Nähe der Fledertiere zur Bevölkerung wiederholen könnte [161]. Am 5. Mai 2023 erklärte WHO-Generaldirektor Tedros Adhanom Ghebreyesus, der am 30. Januar 2020 COVID-19 zu einer gesundheitlichen Notlage internationaler Tragweite erklärt hatte, das Ende dieser Pandemie. Bis Januar 2024 wurden über 772 Millionen Infektionen mit über 6,9 Millionen Toten, die mit oder an SARS-CoV-2 gestorben waren, registriert. Die WHO schätzt die Zahl der COVID-assoziierten Todesfälle auf weit über 20 Millionen (*World Health Organization*, <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>, Aufruf 15.03.2024).

Leichte Symptome infizierter Patienten sind hauptsächlich Pneumonie assoziiert. Darunter löst die akute Atemwegserkrankung Fieber, Husten, Kurzatmigkeit, Myalgie oder Müdigkeit aus [162]. Weitere Symptome treten im Verdauungstrakt, im Nervensystem und im Herz-Kreislauf-System auf. Dazu gehören Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Verwirrtheit, Kopfschmerzen, Tachykardie oder Myokarditis. Kritische Infektionen manifestieren sich als Pneumonie, disseminierte intravasale Gerinnung, Hypotonie oder akutes Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome* ARDS). Das ARDS führt häufig zu einem Multiorganversagen (19-36%) und hat daher eine sehr hohe Mortalität (13-90%) [95, 163]. Als Auslöser steht im Vordergrund das hyperinflammatorische Syndrom ähnlich der Sepsis, dem ARDS oder dem CAR-T-Zell-induzierten CRS [164]. Dabei führt die Interaktion zwischen Epithelzellen und Immunzellen bei COVID-19 zu einer massiven Produktion proinflammatorischer Zytokine und folglich zum CRS [165].

Zunächst bindet das Spike-Protein der Virushülle von SARS-CoV-2 an das humane *Angiotensin Converting Enzyme 2* (hACE2) auf der Zelloberfläche (**Abbildung Publikation 2**) [166]. Die Serinprotease TMPRSS2 bewirkt die Spaltung des konformationsveränderten

Spike-Proteins und damit die Fusion mit der Zellmembran. hACE2 wird auf Endothelzellen im Herzen und Nieren, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge und in Atemwegsepithelien exprimiert [162]. Als Zink-Metallopeptidase ist hACE2 als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems am Wasserhaushalt und der Aufrechterhaltung des Blutdrucks beteiligt. Im Tiermodell der Lungenentzündung konnte gezeigt werden, dass erniedrigte ACE2-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines ARDS einhergehen, wobei eine rekombinante Gabe von ACE2 die Entwicklung von ARDS verhinderte [167]. Befindet sich bei einer SARS-CoV-2-Infektion weniger hACE2 auf der Zelloberfläche, da hACE2 mit dem Virus endozytiert wird, steigt die Angiotensin II-Konzentration im Serum an **(Abbildung Publikation 2)** [168]. Angiotensin II agiert über den Angiotensin-II-Rezeptor Typ I als proinflammatorisches Zytokin, indem es NF- κ B mit AP-1/c-Foc über den MAPK-Weg zusätzlich ADAM17 aktiviert, was zur Expression von IL-6, EGF, TNF und *shedding* von sIL-6R α führt [169, 170]. Eine Blockade des Angiotensin-II-Rezeptors Typ I verhinderte dagegen im Tiermodell die Entwicklung von SARS-CoV-induzierten ARDS [171]. Über Trans-signaling erfolgt daraufhin die gp130-vermittelte Aktivierung von STAT3 in Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen, die weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine exprimieren [170]. Dazu gehört der *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), der Neutrophile rekrutiert. Bei Patienten mit fatalem COVID-19-ARDS Verlauf wurden erhöhte G-CSF Werte und eine broncho-alveoläre-assozierte Neutrophilie beobachtet [165]. Das angeborene Immunsystem interagiert mit der Infektion, indem die TLR eine MyD88-assoziierte NF- κ B Kaskade aktivieren [172]. Durch die Aktivierung von Neutrophilen im Alveolarraum werden zytotoxische Substanzen freigesetzt, dazu gehören granuläre Enzyme, proinflammatorische Zytokine und extrazelluläre Neutrophilenfallen. Langfristig kommt es durch die hyperinflammatorische Immunzellaktivierung zu einer Schädigung der alveolarkapillären Barriere [165]. Erhöhte Werte von IL-2, IL-2R, IL-6, MCP1, MCP-3, IL-8, IFN- γ und TNF im Serum von COVID-19-Patienten korrelieren negativ mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Mortalität [173].

Patienten, die schwer von der Infektion betroffen sind, haben ein dysreguliertes Immunsystem gemeinsam, bei dem zunächst eine überschießende Immunantwort auftritt und in einer Zellerschöpfung endet [174]. Besonders auffällig ist bei diesen Patienten die stark erniedrigte Gesamtzahl der T-Zell-Lymphozyten. Vor allem eine CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelldepletion ist bei COVID-19-Patienten im schweren Verlauf der Infektion charakteristisch [175]. Schlüsselfaktoren im pathologischen Verlauf von COVID-19 sind

neben der Lymphopenie und Neutrophilie, eine Dysregulation von Monozyten und Makrophagen, eine verzögerte Typ-I-IFN Antwort und CRS [165].

Rodríguez-Hernández und Kollegen zeigten den Zusammenhang zwischen dem sgp130-vermittelten Puffersystem und dem fatalen Verlauf bei COVID-19 Patienten [84]. Bei den Verstorbenen war der IL-6 Serumspiegel am Meisten erhöht. Der COVID-19-assoziierte IL-6 Serumspiegel mit 34 pg/ml war jedoch deutlich geringer als bei anderen CRS-assoziierten Verläufen wie bei Sepsis (983 pg/ml), ARDS (460 pg/ml) oder bei CAR-T CRS (3110 pg/ml) [79]. Darüber hinaus wiesen Verstorbene niedrigere Serumspiegel von sIL-6Rα und sgp130 auf. Das sgp130 Puffersystem konnte das Trans-signaling bei fatalen Verläufen von COVID-19 nicht inhibieren und es kam zu einer systemischen Antwort in Form von Lymphopenie und Neutrophilie mit nachfolgender Mortalität. Im Gegensatz dazu zeigten COVID-19 Patienten mit schwerem Verlauf ein niedrigeres IL-6 Level (27 pg/mL) und signifikant erhöhte sIL-6Rα und sgp130 Mengen auf. Dadurch könnten die Trans-signaling-Komponenten gepuffert werden. So zeigen Rodríguez-Hernández und Kollegen eine positive Korrelation zwischen fatalen Verläufen und reduzierten Mengen an sIL-6Rα und sgp130. Diese Studie zeigt zunächst eine Hyperinflammation mit zunehmendem Trans-signaling, die anschließend in einer Erschöpfung und Lymphopenie endet [95, 170, 174]. Diese Lymphopenie führt aufgrund der verminderten T-Zellzahl zu einem verminderten IL-6Rα *shedding*. Dadurch wird das komplexe Gleichgewicht zwischen IL-6 Aktivierung, Hyperinflammation und sgp130-Puffer bei COVID-19-ARDS gestört, was fatale Folgen haben kann [176].

Bei ARDS wird die Epithelschicht durch proinflammatorische Zytokine so stark geschädigt, dass die Ionenkanäle den alveolären Flüssigkeitstransport nicht mehr aufrechterhalten können [177]. In Folge dessen führt die gestörte Funktion zu einer erhöhten Permeabilität und damit zu einer Flüssigkeitsansammlung in den Lungenalveolen. Der Gasaustausch ist im Rahmen der Hypoxämie derart beeinträchtigt, dass eine invasive Beatmung mit sofortiger Intervention in Form von Immunsuppressiva notwendig wird [163]. Therapien bei schwerem COVID-19 greifen entweder gezielt oder im Rahmen einer allgemeinen Immunsuppression in die Hyperinflammation und die damit verbundenen Signalwege ein, um die Regulation des Immunsystems wieder unter Kontrolle zu bringen [173]. Dabei sind der richtige Zeitpunkt und die Art der Intervention entscheidend [178].

Dexamethason, ein Kortikosteroid, senkte die Mortalität bei Patienten mit invasiver Beatmung von 41,4% auf 29,3% und bei Patienten mit nicht-invasiver Sauerstoffversorgung

von 26,2% auf 23,3% [179]. Bei moderatem Krankheitsverlauf ohne Sauerstoffversorgung war diese Therapie nicht wirksam. Kortikosteroide sind in der Therapie der CRS als Immunsuppressiva wirksam, allerdings wird die antivirale T-Zellfunktion zu Lasten der Viruselimination beeinträchtigt. Da insbesondere eine erhöhte IL-6 Serumkonzentration mit fatalen COVID-19 Verläufen assoziiert ist und eine IL-6R α -mAb-Therapie bei CRS wirksam ist, erhielten Patienten mit Beatmung in den REMAP-CAP- und RECOVERY-Studien Kortikosteroide in Kombination mit Tocilizumab bzw. Sarilumab, was die Mortalität reduzierte [180-182]. Eine frühere Studie (COVACTA) untersuchte neben der Kortikosteroidtherapie zudem die Effektivität von IL-6R α -mAb in der Monotherapie allerdings ohne Erfolg [183]. Retrospektiv war die Behandlung von Patienten mit moderatem Verlauf ohne Kortikosteroide kombiniert mit einer niedrigen IL-6 Serumkonzentration der Grund für die fehlende Wirksamkeit [184]. Bei der Behandlung mit globalen IL-6 Blocker wie Tocilizumab oder Sarilumab, besteht ein erhöhtes Risiko für Atemwegsinfektionen [111]. Da der klassische IL-6-Signalweg für die virale Elimination notwendig ist, könnten IL-6-Inhibitoren auch die Behandlung von COVID-19 beeinträchtigen, indem sie die Viruslast erhöhen. Autopsien von Organen verstorbener COVID-19 Patienten zeigten, dass die Patienten entweder an einer hohen Viruslast im Gewebe oder an einer Hyperinflammation ohne Hinweise auf SARS-CoV-2 verstorben sind [178].

Während bisher der Fokus auf der klassischen und Trans-signaling-Blockade mit Tocilizumab und Sarilumab bei COVID-19 lag, könnte die Effektivität der selektiven Trans-signaling Inhibition bei COVID-19 Gegenstand aktueller Forschung sein. Die Publikation 2 zeigt in einem *proof-of-concept* eine bispezifische Blockade der SARS-CoV-2 Infektion durch die neutralisierende Bindung des Spike-Proteins an einen Nanobody (VHH72) und des IL-6 Trans-signalings durch ein Fusionsprotein namens c19s130Fc [155, 157]. Eine Kombinationstherapie kann vor allem in der Anfangsphase der Infektion von Vorteil sein, da der Bindungspartner hACE2 für den Zelleintritt ein wichtiges Target für die therapeutische Entwicklung darstellt. Zunächst wird der Viruseintritt verhindert, wodurch hACE2 nicht internalisiert wird und somit im weiteren Verlauf die potentielle Fehlregulation des AngII-AT1R-Signalweges stromabwärts von ACE2 zu CRS verhindert wird [168]. Akkumulieren sich dennoch inflammatorische Bedingungen, kann das c19s130Fc präventiv das IL-6 Trans-signaling blockieren und damit die Hyperinflammation reduzieren, ähnlich wie bei schweren Verläufen von COVID-19 Patienten mit kurativer Gabe von Tocilizumab.

4. SYNTHETISCHE ZYTKINREZEPTOREN

Die synthetische Biologie entwickelt genetische Schalter und optimiert bestehende biologische Systeme, indem die Rekonstruktion biologischer Einheiten und deren Integration als transgene Schaltkreise neuartige Proteine und Stoffwechselnetzwerke schafft [185]. Sowohl natürliche als auch synthetische Rezeptoren führen die Informationsverarbeitung aus. Ein Input in Form eines Signals wird weitergeleitet, um als Output eine zelluläre Veränderung zu induzieren [186]. Die Entwicklung neuartiger Funktionen im eukaryotischen System als Teil der biomedizinischen Forschung konzentriert sich vor allem auf die Bereiche zellbasierte Diagnostik und personalisierte Therapie [187]. Insbesondere synthetische Rezeptoren eignen sich zur Erkennung und Eliminierung bestimmter Krankheiten. Von genetischen bis zu mehrstufigen Schaltkreisen ist eine präzise synthetisch-interzelluläre, juxtrakrine Kommunikation mit Hilfe von Rezeptoren erforderlich, um komplexe logische Operationen basierend auf Zell-Zell-Kontakten durchführen zu können [188].

Insbesondere die Entwicklung der CAR-T-Zelltherapie hat das Repertoire synthetischer Rezeptoren erweitert, um eine möglichst sichere und effektive Therapie des Multiplen Myeloms und der B-Zell-Lymphome zu gewährleisten [185]. Dieses Repertoire umfasst die Weiterentwicklung chimärer synthetischer Rezeptoren von CAR-Generation 1 bis 5 mit anderen funktionellen CAR-Technologien (Switch CAR, Dual CAR), *chimeric cytokine* Rezeptoren (*single-chain variable fragment* (scFv)-EpoR, *chemically induced dimerization*), *generalized extracellular molecule sensor* (GEMS), *synthetic Notch* (synNotch) und andere zusammengefasst in [186]. Aktuelle Forschungsarbeiten befassen sich mit Interferenzen synthetischer Schaltkreise mit intrazellulären Komponenten, unspezifischer Aktivierung oder Hintergrundexpression, die die Applikation synthetischer Einheiten *in vivo* erschweren [91, 189].

Ein zielorientiertes, in der Therapie einsetzbares System ist die Entwicklung synthetischer Zytokinrezeptoren. Diese können je nach Bedarf frei kombiniert werden, z.B. durch eine Homo- oder Heterodimerisierung/Trimerisierung [190]. Um synthetische Zytokinrezeptoren möglichst spezifisch zu aktivieren, dürfen endogene Signale keine Hintergrundaktivität hervorrufen. Nanobodies, die hochaffin die Fluoreszenzproteine *green fluorescent protein* (GFP) oder mCherry binden, zeigen keine Affinität zu endogenen Liganden [191, 192]. Damit qualifizieren sich diese Bindungspartner zur Entwicklung synthetischer Rezeptoren. Die Schwere-Kette-Antikörper aus Camelidae besitzen zwei Antigen-bindende Domänen (VHH) und können einzeln isoliert oder als Fusionsproteine

verwendet werden [193]. Daraus setzt sich die erste Generation synthetischer Zytokinrezeptoren (*Synthetic Cytokine Receptor*, SyCyR) zusammen (**Abbildung 5**).

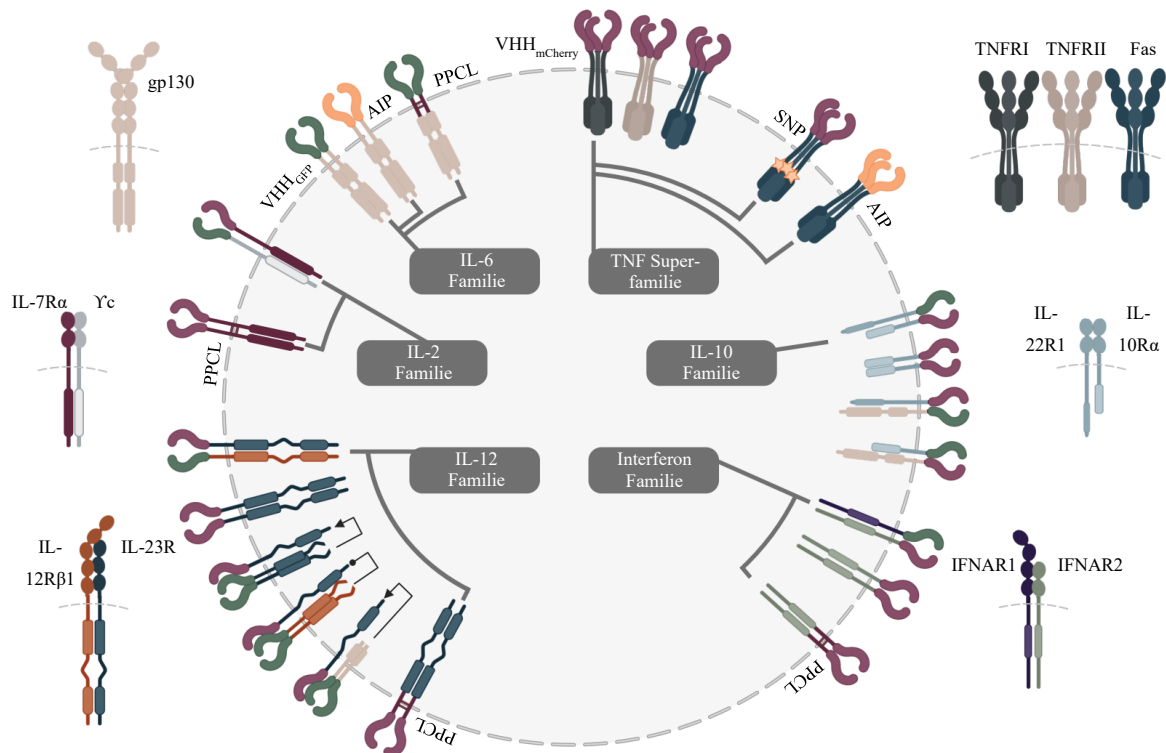


Abbildung 5: Diversität der synthetischen Zytokinrezeptoren (SyCyR) in der Generationsübersicht, eingeteilt nach den Zytokinfamilien IL-6, TNF, IL-10, IFN, IL-12 und IL-2. Außerhalb befinden sich die unmodifizierten endogenen Rezeptorkonstellationen und auf der Oberfläche die entsprechenden synthetisch modifizierten Rezeptoren, deren extrazellulärer Bereich durch ein VHH_{GFP} oder VHH_{mCherry} ersetzt ist. Modifikationen wie AIP (gelb), Austausch zur IL-7Rα Transmembran mit PPCL-Insertion zur konstitutiven Aktivierung (PPCL), SNP (Sterne), Trans-phosphorylierungsdeletionen (aktivierend Pfeil, nicht aktivierend Punkt) sind markiert. Wenn nicht gekennzeichnet, besitzen alle SyCyR die TMD und ICD des endogenen Rezeptors. Abbildung mit Biorender erstellt und modifiziert nach [190, 193-199].

Diese SyCyR weisen extrazellulär einen Nanobody gerichtet gegen GFP (VHH_{GFP}) oder mCherry (VHH_{mCherry}) auf. Darauf folgt eine TMD und für die Signaltransduktion der IL-2-, IL-6-, IL-10-, IL-12-, TNF- oder IFN-Familie die entsprechende intrazelluläre Domäne [193]. Die Aktivierung der SyCyR erfolgt hintergrundfrei, da endogene Signale keine unspezifische Signaltransduktion auslösen und zudem dieses System mit synthetischen Liganden spezifisch aktivieren werden kann. Diese SyCyR Aktivierung entspricht der Signaltransduktion endogener Rezeptoren [193]. Durch die einfache Übertragbarkeit dieser Anwendung können unbekannte Rezeptorkonstellationen mit Fusionsproteinen aus GFP und mCherry als Homo- oder Heteroproteine kombinatorisch forciert und somit untersucht werden, was im Folgenden an einigen Beispielen demonstriert wird [190, 194].

Synthetische Rezeptorkonstellationen mit VHH_{GFP}gp130 und VHH_{mCherry}Fas ermöglichen eine Regulation pro- und anti-apoptotischer Signale über GFP-Homodimere und mCherry-Homotrimere, die Rezeptorkomplexe der TNF-Superfamilie phänotypisch kopieren [195].

Die GFP Homodimerisierung kann murine Pro-B-Zellen über VHH_{GFPgp130} zur Proliferation anregen, während die mCherry Homotrimerisierung über VHH_{mCherryFas} Apoptose induziert [195]. Die Fas SyCyR-vermittelte Apoptose kann als nützliches Werkzeug zur Identifizierung der Rezeptoraktivität verwendet werden [196]. Genomsequenzierungen beherbergen alleine im Fas-Gen 17889 SNPs, von denen nicht alle notwendigerweise mit einer Erkrankung assoziiert sind oder noch nicht mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht wurden [196]. Minafra und Kollegen untersuchten mittels Fas SyCyR 35 nicht-synonyme SNPs in der TMD und ICD von Fas, die eine veränderte Apoptoseregulation induzieren und daher mit Erkrankungen wie dem Autoimmunlymphoproliferativen Syndrom oder Plattenepithelkarzinom in Verbindung gebracht werden könnten [196]. Mit diesem Werkzeug kann die Aktivität der respondierenden synthetischen Zytokinrezeptoren über die spezifische Regulation synthetischer Liganden untersucht werden.

Das SyCyR System ermöglicht *in vivo* eine zelltypspezifische und hintergrundfreie zytokinähnliche Signaltransduktion mit Hilfe synthetischer Liganden, was eine Anwendung in der CAR-T-Zelltechnologie interessant macht. Obwohl Nanobodies zur Behandlung von Krankheiten wie Krebs, Autoimmunerkrankungen, Infektionen oder Leukämie mit über 30 klinischen Studien eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer Therapieansätze spielen, könnten diese Xenograften bei längerer Exposition zu Immunogenität führen [200]. Seit 2018 wurden bisher drei Nanobodies für solide Tumoren, RA und Blutgerinnungsstörungen von der FDA zugelassen, während die Langzeitnebenwirkungen aktuell erhoben werden [200]. Nanobodies und scFv, die als Teil der 11 als sicher und wirksam eingestuften CAR-T-Zelltherapien seit 2017 von der FDA für die Behandlung des multiplen Myeloms und bestimmter Arten von B-Zell-Lymphomen zugelassen sind, zeigen das wachsende Potenzial in der Humanmedizin [201]. Von anderer Natur sind die synthetischen Liganden GFP und mCherry, die bei wiederholter Anwendung beim Menschen potentiell eine Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern auslösen und damit ihre Wirksamkeit verlieren können [202].

Die nächste Generation der SyCyR-Technologie soll ein synthetisches Ligand-Rezeptor-Paar ohne endogene Hintergrundaktivität oder potentieller Immunogenität des synthetischen Liganden enthalten [198]. Hierfür eignen sich von der FDA zugelassene therapeutische Antikörper, die nicht gegen humane Ziele gerichtet sind. Damit kommen mAbs wie Infliximab, Tocilizumab oder Ustekinumab mit endogenen Zielmolekülen nicht in Frage, während mAbs gegen Bakterien oder SARS-CoV-2 wenig Nebenwirkungen bei einer potentiellen Behandlung der zweiten SyCyR Generation erzeugen könnten. Palivizumab ist

ein humanisierter monoklonaler IgG1 κ Antikörper, der gegen ein Epitop des Fusionsproteins von *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) gerichtet ist [203]. Es wurde 1999 von der Europäischen Arzneimittelagentur zur Prävention von RSV-Infektionen und schweren Erkrankungen bei Säuglingen mit hohem Risiko zugelassen, da es eine neutralisierende und fusionshemmende Aktivität gegenüber den beiden RSV-Subtypen A und B besitzt [204]. Dieses Therapeutikum wurde als synthetischer Ligand für eine potentielle Applikation beim Menschen auf der Grundlage von Langzeitstudien mit geringen Nebenwirkungen ausgewählt [203]. Dieser Antikörper induzierte zusammen mit einem Freund-Adjuvans eine Immunisierung eines Lamas, woraus anti-idiotypische Nanobodies isoliert wurden, die als Teil der synthetischen Rezeptoren (gp130 SyCyR und Fas SyCyR) zur Signaltransduktion nach Ligandenbindung dienten. Die Spezifität der anti-idiotypischen Nanobodies beruht auf der Bindung der variablen Region des Antikörpers, in diesem Fall die hypervariablen Regionen von Palivizumab [198]. Die Signalweiterleitung der neuen SyCyR durch die anti-idiotypische Palivizumab (AIP) Bindung ist in Publikation 3 dargestellt.

ZIELSETZUNG

Die erste Zielsetzung dieser Dissertation ist die Erweiterung des cs130Fc Inhibitors zu einem bispezifischen chimären Inhibitor, der das IL-6 Trans-signaling sowie die TNF- oder IL-12/23 Signaltransduktion durch eine kovalente VHH-Fusion inhibiert. In zellbasierter *in vitro* Proliferation mit IL-6/sIL-6R α und IL-12 oder IL-23 soll die Inhibitionskapazität des bispezifischen cs130Fc getestet werden. Zudem soll die TNF-induzierte Apoptose durch die Erweiterung mit einem VHH gegen TNF verhindert werden. Diese Moleküle sollen sowohl die Hemmkapazität der Einzelkomponenten beibehalten als auch beide Zytokin-vermittelte Signalwege gleichzeitig inhibieren.

Das zweite Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines bispezifischen cs130Fc Inhibitors, der sowohl die SARS-CoV-2-Infektion als auch das IL-6 Trans-signaling blockiert. Hierfür wird cs130Fc mit einem VHH gegen das Spike-Protein von SARS-CoV-2 fusioniert. In zellbasierten Modellen soll dieser Inhibitor das IL-6 Trans-signaling blockieren und die SARS-CoV-2-Infektion verhindern. Diese duale Blockade soll das pathologische Zusammenspiel zwischen Endotheliopathie und Virusinfektion therapeutisch vorteilhaft beeinflussen.

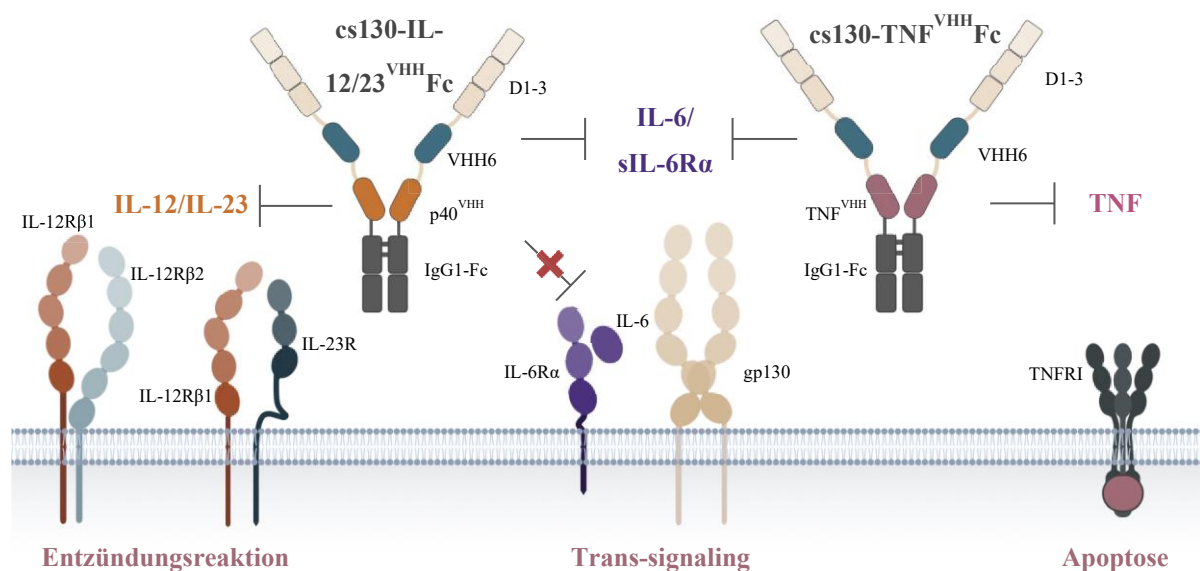
Die dritte Fragestellung zielt auf die Weiterentwicklung des *synthetic cytokine receptor* (SyCyR) Systems mit anti-idiotypischen Rezeptor-Liganden-Paare für therapeutische Anwendungen ohne zelluläre Immunantwort. Hierfür soll Palivizumab eingesetzt werden, da es weder mit humanen Proteinen kreuzreagiert noch immunogen ist. Für dieses SyCyR-Paar sollen anti-idiotypische VHH (AIP^{VHH}) aus einer Lama-Immunisierung mit Palivizumab isoliert und charakterisiert werden. Die AIP^{VHH} sollen als Teil der synthetischen Rezeptoren aktivierbar sein, wenn Palivizumab als synthetischer Ligand die SyCyR bindet und damit die Signaltransduktion von gp130 und Fas induziert. Die variablen Regionen von Palivizumab sollen als synthetische Fusionsproteine die AIP^{VHH}-Rezeptoren spezifisch aktivieren.

Die vierte Fragestellung untersucht die Übertragbarkeit der IL-7R α Transmembrandomäne mit PPCL-Insertion auf synthetische und natürliche Klasse I und II Zytokinrezeptoren (SyCyR_{PPCL}). Hierfür sollen natürliche und synthetische Varianten von gp130 aus der IL-6 Familie, IL-23R aus der IL-12 Familie und IL-7R α als Klasse I Zytokinrezeptorfamilie mit der PPCL-Insertion ergänzt werden. Weiterhin soll der Interferon α/β Rezeptor 2 (IFNAR2) als Vertreter der Klasse II der Zytokinrezeptoren mit der PPCL-Insertion erweitert werden. In *in vitro* Zellkulturen soll die Aktivität der SyCyR_{PPCL} hinsichtlich einer ligandenunabhängigen Disulfidbrücken-forcierten Homodimerisierung untersucht werden.

PUBLIKATION 1

BISPECIFIC SOLUBLE CYTOKINE RECEPTOR-NANOBODY FUSIONS INHIBIT INTERLEUKIN (IL-)6 TRANS-SIGNALING AND IL-12/23 OR TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) SIGNALING

Annika Gesiorowski, Julia Ettich, Julia Werner, Christoph Wittich, Stephan Pieper, Giacomo Padrini, Kristina Behnke, Doreen M. Floss, Philipp A. Lang, Jens M. Moll, und Jürgen Scheller



Journal: Journal of Biological Chemistry, 299(11): 105343.

Veröffentlichung: 13. Oktober 2023

Impact-Faktor: 5.486 (2021)

Anteil an dieser Arbeit: 30%

Proteinexpression und Quantifizierung, Zellviabilitätstests, Inhibitionstests, Stimulationstests, Western Blots, Ko-Immunpräzipitation, Oberflächenplasmonen-resonanzspektroskopie, Durchflusszytometrie, Datenanalyse, Schreiben des Manuskripts



Bispecific soluble cytokine receptor-nanobody fusions inhibit Interleukin (IL)-6 trans-signaling and IL-12/23 or tumor necrosis factor (TNF) signaling

Received for publication, March 30, 2023, and in revised form, September 18, 2023. Published, Papers in Press, October 13, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105343>

Annika Gesiorowski^{1,†}, Julia Ettich^{1,†}, Julia Werner², Christoph Wittich¹, Stephan Pieper¹, Giacomo Padriani¹, Kristina Behnke¹, Doreen M. Floss¹, Philipp A. Lang², Jens M. Moll^{1,3}, and Jürgen Scheller^{1,*}

From the ¹Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, and ²Institute of Molecular Medicine II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany; ³PROvendis GmbH, Muelheim an der Ruhr, Germany

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Clare E. Bryant

At least 0.5% of people in the Western world develop inflammatory bowel disease (IBD). While antibodies that block tumor necrosis factor (TNF) α and Interleukin (IL)-23 have been approved for the treatment of IBD, IL-6 antibodies failed in the phase II clinical trial due to non-tolerable side effects. However, two clinical phase II studies suggest that inhibiting IL-6/soluble IL-6R (sIL-6R)-induced trans-signaling *via* the cytokine receptor gp130 benefit IBD patients with fewer adverse events. Here we develop inhibitors targeting a combination of IL-6/sIL-6R and TNF or IL-12/IL-23 signaling, named cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc. Surface plasmon resonance experiments showed that recombinant cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc bind with high affinity to IL-6/sIL-6R complexes and human TNF α (hTNF α) or IL-12/IL-23, respectively. Immunoprecipitation experiments have verified the higher ordered complex formation of the inhibitors with IL-6/sIL-6R and IL-12. We demonstrated that cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc block IL-6/sIL-6R trans-signaling-induced proliferation and STAT3 phosphorylation of Ba/F3-gp130 cells, as well as hTNF α - or IL-23-induced signaling, respectively. In conclusion, cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc represent a class of dimeric and bispecific chimeric cytokine inhibitors that consist of a soluble cytokine receptor fused to anti-cytokine nanobodies.

Tumor necrosis factor (TNF) α , Interleukin (IL)-6, IL-12, and IL-23 are central immunomodulatory cytokines controlling health and disease (1–3). Over the years, the general principle of cytokine signaling and receptor complex assemblies have been broadly understood. For IL-6, three receptor assemblies were named classic, trans-, and cluster-signaling. In classic signaling, IL-6 binds to the membrane-bound IL-6R and induces a signal-transducing homodimer of the gp130 receptor chain (4). In trans-signaling, the soluble form of IL-6R (sIL-6R) complexed with IL-6 activates gp130 homodimers on cells lacking IL-6R expression (5, 6). For cluster-signaling, cell–cell contacts by IL-6:IL-6R complexes formed on

transmitter cells activate gp130 homodimers on neighboring receiver cells (7, 8).

The sIL-6R-driven IL-6 trans-signaling has been mainly assigned as the pathological mode of IL-6 signaling that contributes to inflammatory, autoimmune diseases and cancer. In many disease models, soluble variants of gp130 (9) were shown to inhibit IL-6 trans-signaling specifically. Treatment with sgp130Fc, the dimeric IgG1-Fc fusion protein consisting of all six extracellular domains of gp130, was shown to be more beneficial compared to global blockade of classic and trans-signaling by neutralizing antibodies including sepsis (10), cerulein-induced acute pancreatitis (11), bone fracture healing (12, 13), and myocardial infarction (14). sgp130Fc was named Olamkicept for clinical development by the WHO in 2016.

At least 0.5% of people in the Western world develop inflammatory bowel disease (IBD) with symptoms like intestinal fibrosis, abscesses, and eventually colitis-related tumors (15). Antibodies blocking TNF α and IL-23 were approved for IBD (16). In contrast, IL-6 antibodies failed in phase II clinical trials for IBD due to non-tolerable side effects (17, 18), including intestinal perforations which were also observed for anti-IL-6R therapy for rheumatoid arthritis (19). Of note, Olamkicept has recently passed two phase II clinical studies for IBD with promising results (20–22).

We have generated cs130, a size-reduced, highly active, and selective trans-signaling inhibitor (23). cs130 consists only of the first three extracellular cytokine binding domains D1–D3 of sgp130 fused to the a non-neutralizing nanobody VHH6 that binds to IL-6:sIL-6R complexes (23–25). Based on cs130, c19s130 was the first example of a bispecific trans-signaling inhibitor, which consists of cs130 plus the neutralizing nanobody VHH72 (26) directed against the S-RBD of SARS-CoV2 enabling the inhibition of IL-6 trans-signaling and cellular entry of SARS-CoV2 (27).

Here we refined cs130, resulting in a class of dimeric and bispecific chimeric cytokine inhibitors, which simultaneously block IL-6 trans-signaling and TNF α - or IL-12/23-signaling *via* fusion to nanobodies directed against TNF α (28, 29), and the p40 subunit of IL-12 and IL-23 (30). Such bispecific inhibitors of centrally involved cytokines in IBD might be of

[†] These authors contributed equally to this work.

* For correspondence: Jürgen Scheller, jscheller@uni-duesseldorf.de.



Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

therapeutic value for future therapeutic applications, especially once sgpl30Fc has been approved for IBD.

Results

Development of the bispecific inhibitors cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc

We designed the two bispecific and dimeric inhibitors cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc to simultaneously target IL-6/sIL-6R complexes and human TNFα (hTNFα) (28, 29) or human IL-12/23 (hIL-12/23) via the shared cytokine subunit p40 (30). The nanobodies directed against hTNFα and hIL-12/23_{p40} (22E11) were described

previously (29, 30). We fused the nanobodies for hTNFα or hIL-12/23 to cs130 connected via a flexible linker sequence (GGGGG)₂GGGGTG followed by a C-terminally located IgG1-Fc (Fig. 1A). cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc were expressed and purified via Protein A affinity chromatography from supernatants of transiently transfected Expi293F cells. Following affinity purification, cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc proteins were pure, as demonstrated by SDS-PAGE analysis followed by Coomassie brilliant blue (CBB) staining and Western blotting (Fig. 1, B and C). The disulfide-mediated dimerization of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc was assessed by non-reducing SDS-PAGE stained by CBB and Western blotting (Fig. 1, B and C). All inhibitory

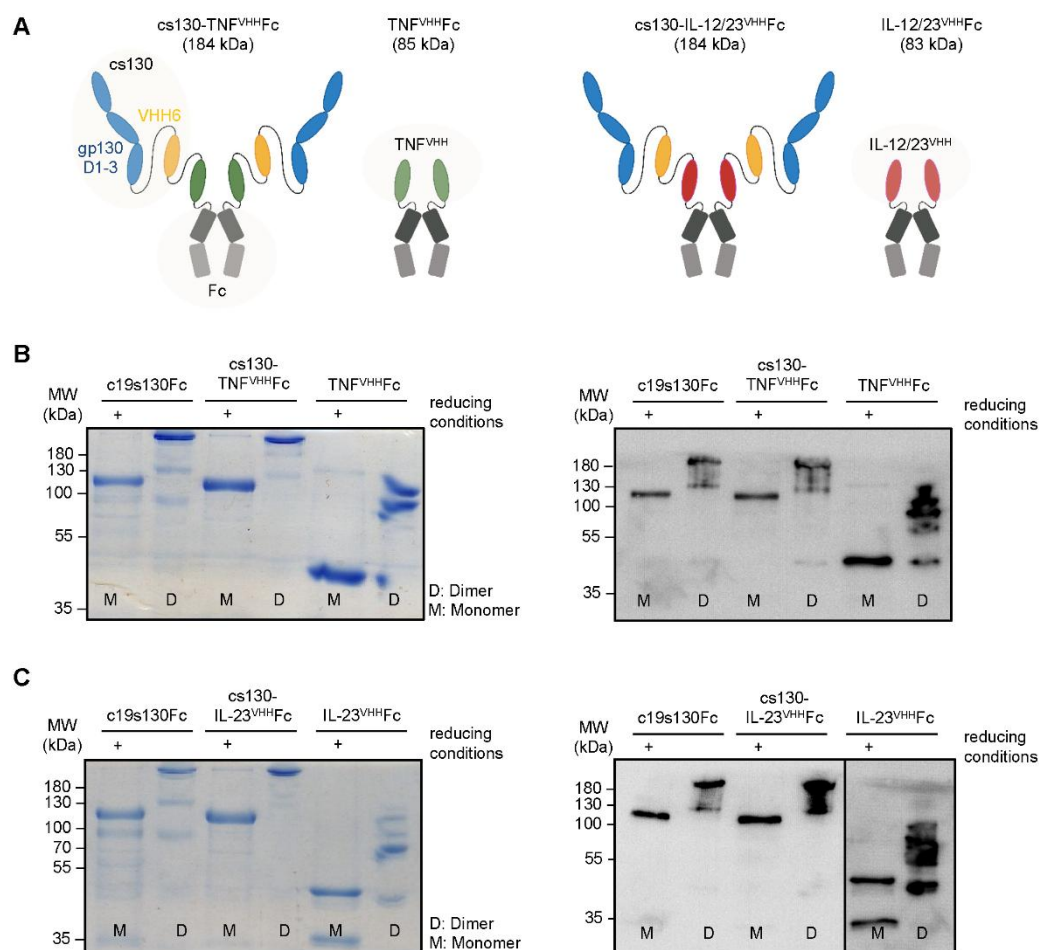


Figure 1. Generation of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc. A, schematic overview of cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc utilized in this study. B, SDS-PAGE analysis of purified c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc followed by Western blotting (anti-Fc) and Coomassie staining in presence (+) or absence of β-mercaptoethanol. C, SDS-PAGE analysis of purified c19s130Fc, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, IL-12/23^{VHH}Fc followed by Western blotting (anti-Fc) and Coomassie staining in the presence (+) or absence of β-mercaptoethanol.

proteins demonstrated a shift to higher molecular weight without a reducing agent, confirming disulfide-mediated dimerization *via* the Fc part. As controls, we also expressed and purified the nanobodies directed against hTNF α and hIL-12/23 with Fc-tag and named the dimeric fusion proteins TNF^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc, respectively (Fig. 1, B and C).

cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc efficiently inhibit IL-6 trans-signaling

The affinities of c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc to human Hyper-IL-6 (HIL-6) were determined by surface plasmon resonance (SPR). The designer cytokine HIL-6 is a fusion protein composed of IL-6 and sIL-6R connected *via* a flexible peptide linker and is used as a surrogate to induce trans-signaling (31). For all SPR experiments, HIL-6 was used because it forms a stable complex compared to the individual components IL-6 and sIL-6R. c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc displayed comparably high affinities of 34.2, 48.8, and 28.9 PM for hHIL-6, respectively (Fig. 2, A–D and Table 1). The kinetic analysis of the interaction revealed the formation of a very stable complex between c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc with hHIL-6, which was mainly characterized by the low k_{off} rates of 7.5×10^{-5} 1/s, 8.6×10^{-5} 1/s, and 7×10^{-5} 1/s, respectively. Next, we analyzed the inhibitory potential of c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc towards IL-6 trans-signaling in a cell-based assay. Ba/F3 cells stably transduced with gp130 (Ba/F3-gp130) were stimulated with 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R, which induced STAT3 phosphorylation-dependent cellular proliferation, a well-established model for IL-6 trans-signaling (25). We observed the concentration-dependent inhibition of IL-6 trans-signaling by c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, while no effects were observed for TNF^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc (Fig. 3A). As a control, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc did not inhibit classical IL-6 signaling induced proliferation of Ba/F3-gp130-IL-6R cells (Fig. 3B). Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 0.57 nM, 0.51 nM, and 0.56 nM were determined for c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, respectively, which were in good agreement with previously published data (23, 27). Ba/F3-gp130 and L939 cells were stimulated with 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R for 20 min in the presence and absence of the inhibitors c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc and TNF^{VHH}Fc (Fig. 3C) and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc but not by IL-12/23^{VHH} (Fig. 3D) to examine inhibition of signal transduction following IL-6 trans-signaling. As expected, c19s130Fc and cs130-TNF^{VHH}Fc but not TNF^{VHH}Fc inhibited STAT3 phosphorylation at concentrations above 1 nM (Fig. 3C). Furthermore, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 and L939 cells was also inhibited by cs130-IL-12/23^{VHH}Fc but not by IL-12/23^{VHH} at concentrations above 1 nM (Fig. 3D). Taken together, the fusion of a second nanobody in cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc has no negative impact regarding affinity towards IL-

6 trans-signaling as shown by biophysical and cell-based assays.

cs130-TNF^{VHH}Fc efficiently inhibits hTNF α -induced apoptosis

Next, we determined and compared the affinity of cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and recombinant human soluble TNFRIFc fusion protein (hsTNFRIFc) (32) to hTNF α by SPR (Fig. 4, A–D and Table 1). cs130-TNF^{VHH}Fc, and TNF^{VHH}Fc displayed comparable affinities of 149.9, and 159.8 PM for hTNF α , respectively, demonstrating that fusion to cs130 did not disturb the interaction of the second nanobody with hTNF α . Next, we performed competition experiments with hTNF α bound to hsTNFRIFc with increasing concentrations of the inhibitors by SPR (Fig. 4E). hTNF α bound to hsTNFRIFc with 92.49 PM (Fig. 4D and Table 1), which agrees with the previously described affinity of 49 PM (33). 12.5 nM of cs130-TNF^{VHH}Fc, and TNF^{VHH}Fc, whereas 6.25 nM of Etanercept (soluble TNFRIFc, Enbrel) abrogated the binding of hTNF α to immobilized hsTNFRIFc (Fig. 4, E–H).

Due to the lack of TNF receptors, Ba/F3 cells did not respond to hTNF α . hTNF α can induce cellular apoptosis of L929 *via* activation of TNF receptor I (TNFRI) (34). To demonstrate the inhibition of hTNF α , we chose the L929 cell line which is commonly used for cell death assays. We treated L929 cells with 1 ng/ml hTNF α to determine the inhibitory capacity of cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and Etanercept. As depicted in Figure 5A, cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and Etanercept inhibited hTNF α -induced cell death of L929 in a dose-dependent manner. Notably, the inhibitory profile was comparable with IC_{50} s of 0.28 nM, and 0.56 nM for cs130-TNF^{VHH}Fc and TNF^{VHH}Fc, respectively, whereas Etanercept was significantly better with an IC_{50} of 3.13 pM. Of note, c19s130Fc did not prevent hTNF α -induced cell death of L929 (Fig. 5A). Apoptosis of L929 cells was quantified using flow cytometry after 24 h stimulation with 1 ng/ml hTNF α and 1, 10, and 100 nM cs130-TNF^{VHH}Fc (Fig. 5B). Ethanol treatment served as a positive control for apoptosis, whereas TNF α -non-treated cells served as proliferation control. L929 cells were apoptotic after hTNF α stimulation (81%), whereas inhibition with cs130-TNF^{VHH}Fc efficiently prevented apoptosis. About 82 to 84% of cells were still alive when treated with 10 or 100 nM cs130-TNF^{VHH}Fc, respectively, but also the lowest concentration of 1 nM cs130-TNF^{VHH}Fc showed 64% cell viability (Fig. 5B). L929 cells were stimulated with 0.1 ng/ml hTNF α and c19s-130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and TNF^{VHH}Fc for 12 h and cleavage of Caspase 3 (cCas3) from total non-cleaved Caspase 3 (tCas3, pro-Caspase 3) was assessed by Western blotting. Stimulation with hTNF α induced cleavage of pro-Caspase 3, whereas adding cs130-TNF^{VHH}Fc or TNF^{VHH}Fc largely prevented the occurrence of cleaved Caspase. Cleaved Caspase 3 was almost absent in untreated cells (Fig. 5C). Taken together, the fusion and the TNF nanobody in cs130-TNF^{VHH}Fc did not interfere with the biological activity towards hTNF α as shown by biophysical and cell-based assays.

Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

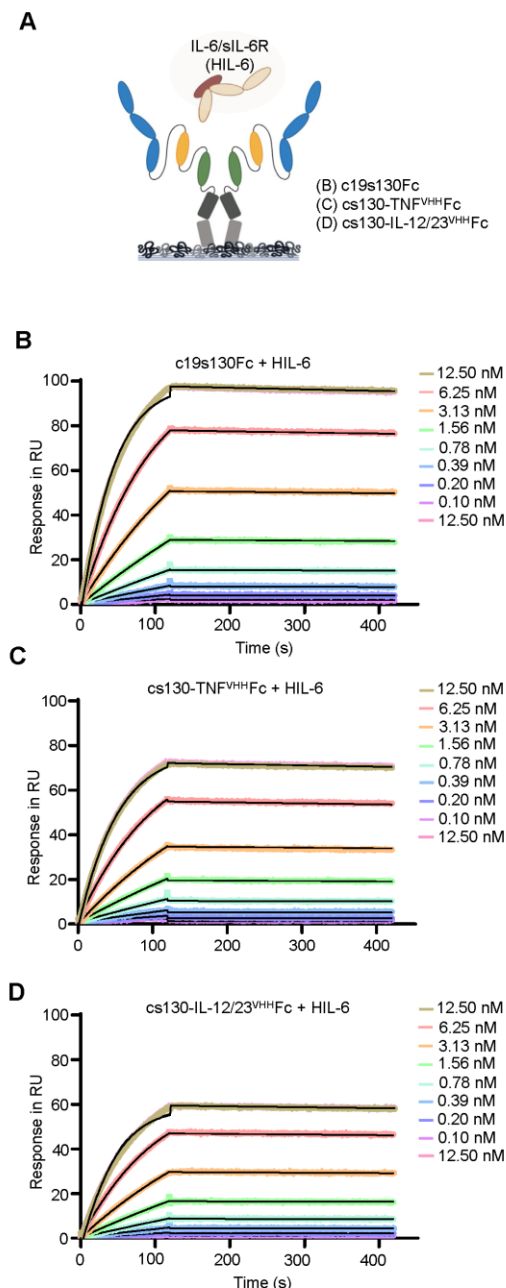


Figure 2. Binding of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc to HIL-6. A, schematic illustration of surface plasmon resonance experiments. B, SPR analysis of c19s130Fc binding to HIL-6. C, SPR analysis of cs130-TNF^{VHH}Fc binding to HIL-6. D, SPR analysis of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc binding to HIL-6.

cs130-IL-12/23^{VHH}Fc efficiently inhibits IL-12 and IL-23 signaling

Next, we compared the affinities of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc to human IL-12/IL-23. Soluble fusion proteins of p40 with p35 (Hyper IL-12, HIL-12), and p40 with p19 (Hyper IL-23, HIL-23) connected *via* a flexible linker served as analytes in SPR. cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc displayed for p40-related binding in HIL-12 comparable affinities of 229.5 and 97.9 pM, respectively (Fig. 6, A and B and Table 1). Subsequently, we compared the inhibitory activity of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc towards HIL-12, and HIL-23 signaling in cell-based assays. Ba/F3 cells stably transduced with IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 or IL-23R were stimulated with 10 ng/ml HIL-12 or 0.5 ng/ml HIL-23 inducing STAT3 phosphorylation and cellular proliferation. Dose-dependent inhibition of HIL-12-induced cellular proliferation by cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc gave IC₅₀ values of 7.81 nM, and 6.42 nM, respectively (Fig. 6C). Dose-dependent inhibition of HIL-23 cellular proliferation by cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc gave the IC₅₀ values 1.19 nM, and 2.06 nM, respectively (Fig. 6D). Ba/F3-IL-12Rβ1-IL-12Rβ2 cells were incubated with 10 ng/ml HIL-12, and Ba/F3-IL-12Rβ1-IL-23R cells with 2 ng/ml HIL-23 for 20 min in the presence and absence of the inhibitors to determine STAT3 phosphorylation. Both inhibitors, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc inhibited STAT3 phosphorylation within the same range at concentrations above 1 nM (Fig. 6E). The human natural killer cell line NK-92 was stimulated with HIL-12 and IL-6/sIL-6R. HIL-12-induced STAT4 phosphorylation was inhibited by IL-12/23^{VHH}Fc, Ustekinumab and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, whereas IL-6/sIL-6R-induced STAT3 phosphorylation was selectively inhibited by cs130-IL-12/23^{VHH}Fc but not by IL-12/23^{VHH}Fc. Signal transduction after combined stimulation with HIL-12 and IL-6/sIL-6R was, however, only inhibited by cs130-IL-12/23^{VHH}Fc (Fig. 6F). Taken together, the fusion of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc did not interfere with the biological inhibitory capacity towards HIL-12, and HIL-23 as shown in biophysical and cell-based assays.

cs130-IL-12/23^{VHH}Fc simultaneously binds to and inhibits IL-6/sIL-6R and IL-23

Ba/F3gp130-IL-12Rβ1/IL-23R cells were cultivated with constant amounts of HIL-6 and HIL-23 plus with increasing concentrations of c19s130Fc, IL-12/23^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc. As shown in Figure 7A, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc but not c19s130Fc or IL-12/23^{VHH}Fc inhibited the proliferation of Ba/F3gp130-IL-12Rβ1/IL-23R with an IC₅₀ of 1.36 nM. Furthermore, co-immunoprecipitation (co-IP) verified the formation of a ternary complex with cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, HIL-6 and HIL-12 (schematic illustration of the co-IP in Fig. 7B). In detail, recombinant FLAG-tagged HIL-12 was incubated with

(B-D) c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc were immobilized on a Protein A chip and increasing concentrations of HIL-6 were injected. Sensorgrams in response units (RU) over time are depicted as colored lines, and global fit data are displayed as black lines.

Table 1

Surface plasmon resonance analysis of the mono- and bi-specific inhibitors against hIL-6, TNF, and hIL-12

	hIL-6			hTNF α			hIL-12	
	c19s130Fc	cs130-TNF ^{VHH} Fc	cs130-IL-12/23 ^{VHH} Fc	cs130-TNF ^{VHH} Fc	TNF ^{VHH} Fc	hsTNFRII-Fc	cs130-IL-12/23 ^{VHH} Fc	IL-12/23 ^{VHH} Fc
KD (pM)	34.18	48.80	28.90	149.9	159.8	92.49	229.5	97.9
k _a (1/Ms)	2.190×10^6	1.753×10^6	2.429×10^6	1.115×10^6	1.325×10^6	8.548×10^5	7.098×10^5	1.239×10^6
k _d (1/s)	7.483×10^{-5}	8.554×10^{-5}	7.019×10^{-5}	1.671×10^{-4}	2.117×10^{-4}	7.906×10^{-5}	1.629×10^{-4}	1.214×10^{-4}

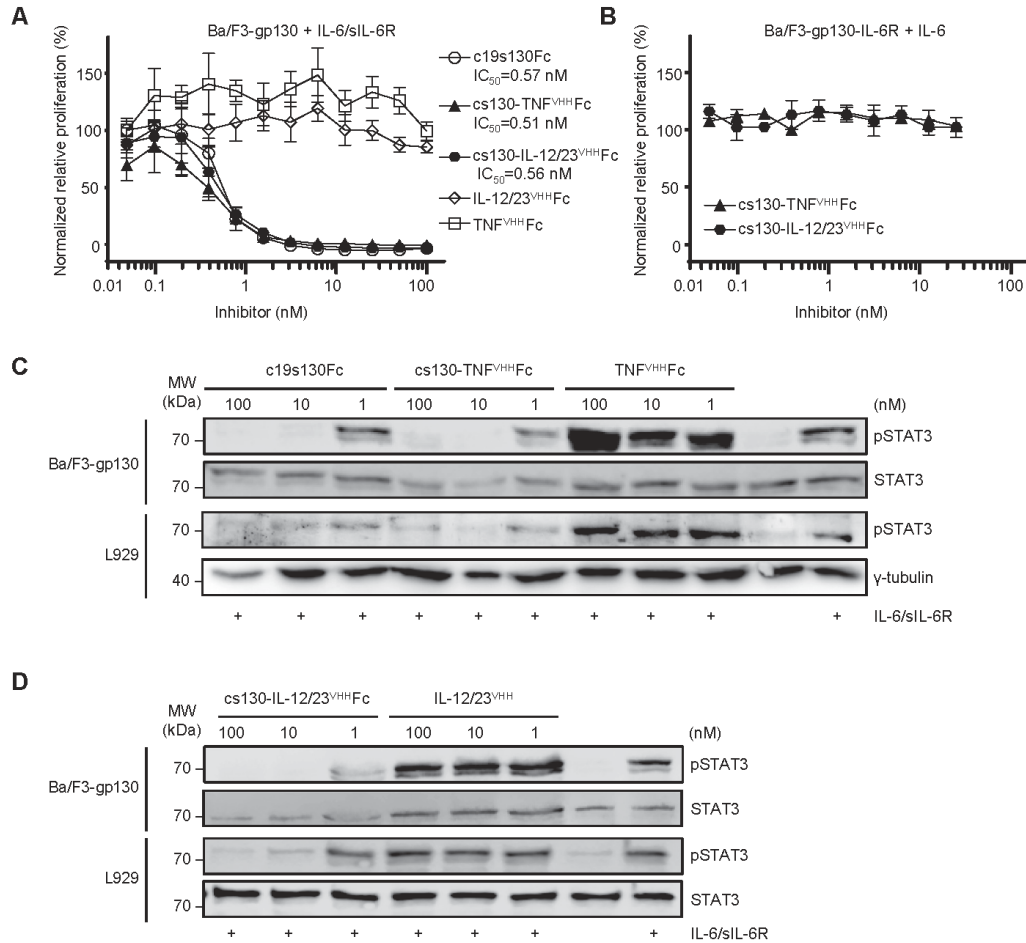


Figure 3. cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc block IL-6 trans-signaling. A, Ba/F3-gp130 cells were stimulated with 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R in the presence of increasing concentrations of c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, IL-12/23^{VHH}Fc and TNF^{VHH}Fc. 72 h post-stimulation, cellular proliferation was detected using CellTiter-Blue. Data were normalized to HIL-6 control. Assays are representative of three independent experiments. B, Ba/F3-gp130-IL-6R cells were stimulated with 10 ng/ml IL-6 in the presence of increasing concentrations of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc. 72 h post stimulation, cellular proliferation was detected using CellTiter-Blue. Data were normalized to HIL-6 control. Assays are representative of three independent experiments. C, Western blot analysis of Ba/F3-gp130 and L929 cells stimulated for 20 min with 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R in the presence of the indicated concentrations of c19s130Fc, cs130-TNF^{VHH}Fc, and TNF^{VHH}Fc. Western blots were stained for phosphorylated pSTAT3 and STAT3. Western blots are representative of three independent experiments. D, Western blot analysis of Ba/F3-gp130 and L929 stimulated for 20 min with 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R in the presence of the indicated concentrations of c19s130Fc, cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, and IL-12/23^{VHH}Fc. Western blots were stained for phosphorylated pSTAT3 and STAT3. Western blots are representative of three independent experiments.

Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

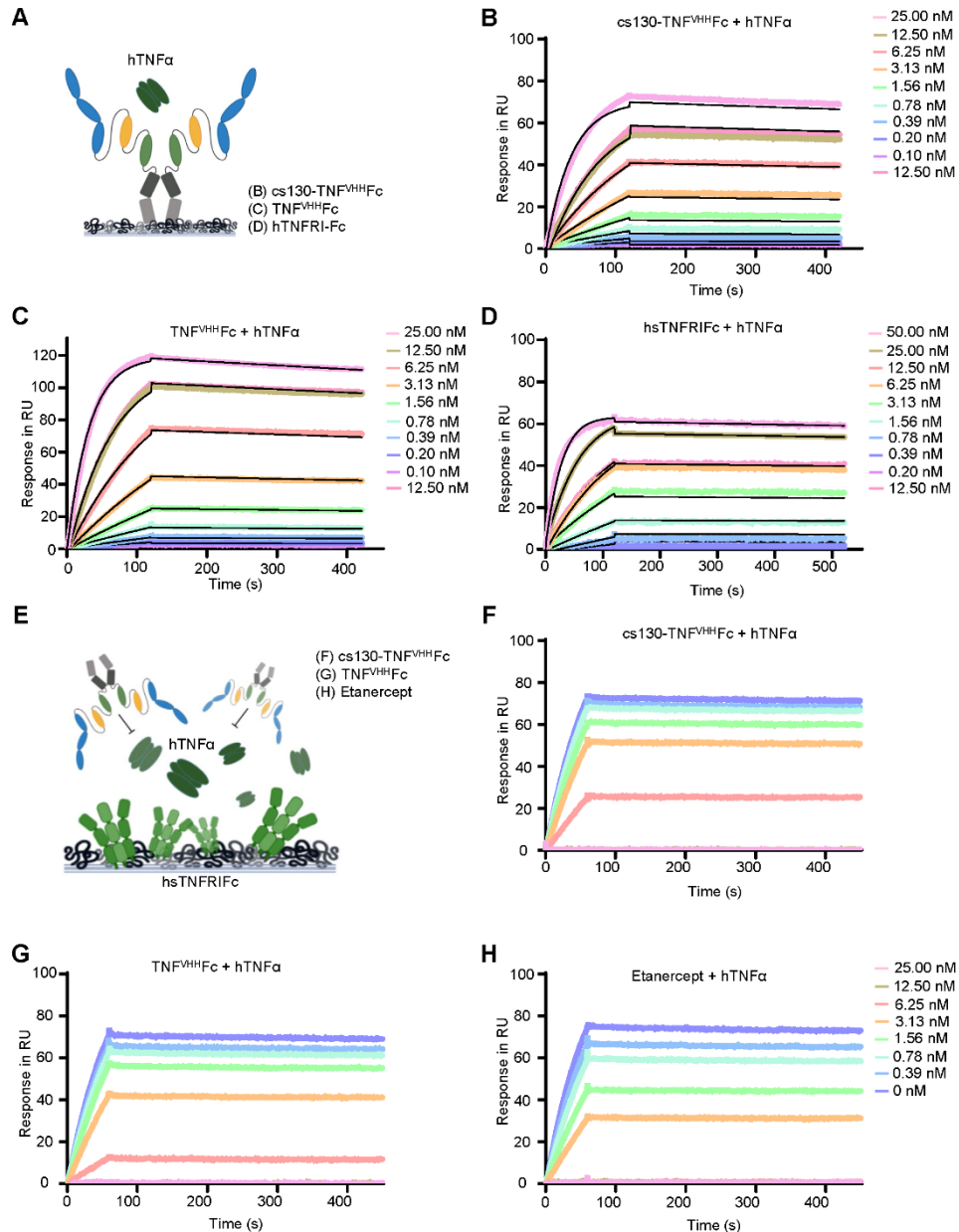


Figure 4. cs130-TNF^{VHH}Fc blocks binding of TNFα to hsTNFRIFc. **A**, schematic illustration of surface plasmon resonance experiments shown in (B–D). **(B)** SPR analysis of cs130-TNF^{VHH}Fc binding to hTNFα. **(C)**, SPR analysis of TNF^{VHH}Fc binding to hTNFα. **(D)**, SPR analysis of hsTNFRIFc binding to hTNFα. **B–D**, cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and hsTNFRIFc were immobilized on a Protein A chip and increasing concentrations of hTNFα were injected. Sensorgrams in response units (RU) over time are depicted as colored lines, global fit data are displayed as black lines. **E**, schematic illustration of surface plasmon resonance experiments shown in (F–H). SPR analysis of competitive cs130-TNF^{VHH}Fc binding against immobilized hsTNFRIFc to hTNFα. hsTNFRIFc was immobilized on a CM-5 chip and hTNFα was injected with increasing concentrations of (F) cs130-TNF^{VHH}Fc, (G) TNF^{VHH}Fc, and (H) Etanercept. Sensorgrams in response units (RU) over time are depicted as colored lines.

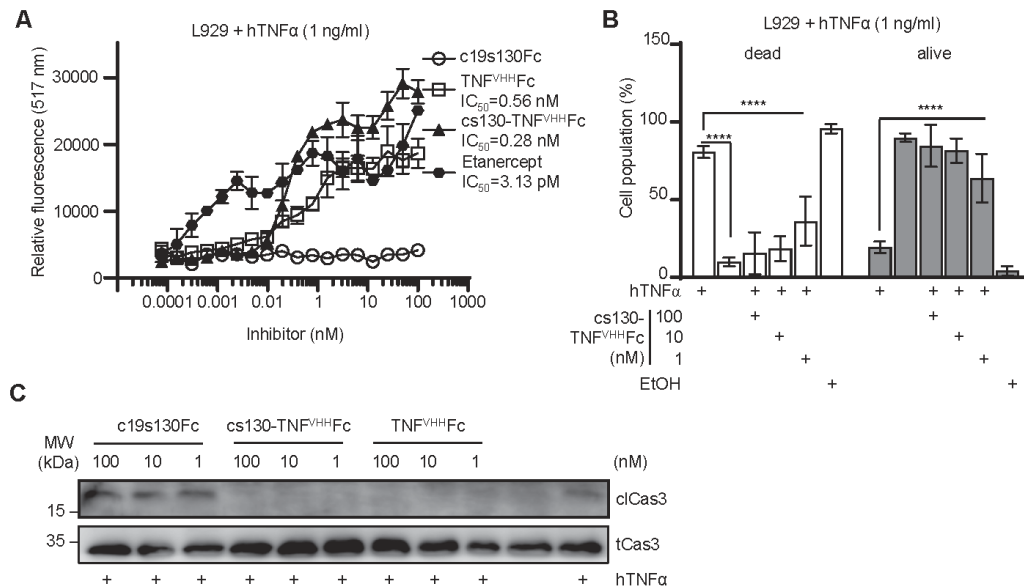


Figure 5. c1310-TNF^{HHH}FC blocks tHNF α -induced apoptosis of L929 cells. *A*, L929 cells were stimulated 1 ng/ml tHNF α . Actinomycin D in the presence of increasing concentrations of c19s130FC, c1310-TNF^{HHH}FC, and Etanercept. 24 h post-stimulation, cellular proliferation was detected using the Calcein-assay. Assays are representative of three independent experiments. *B*, L929 cells were incubated for 24 h with 1 ng/ml tHNF α with indicated concentrations of c1310-TNF^{HHH}FC. Controls cells were either untreated or washed with 70% EtOH before the measurement for the EtOH condition. Analysis of cells stained with AnnexinV and 7-AAD by flow cytometry. The mean $\pm$ SD of three independent experiments was plotted in the graphs (* p 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001). *C*, cleaved Caspase3 in L929 cells treated with 0.1 ng/ml tHNF α in the presence of indicated concentrations of c19s130FC, c1310-TNF^{HHH}FC, and TNFHHHFC. tHNF α (+) or left untreated (-) for 12 h. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibody detecting cleaved Caspase3 and total (uncleaved) Caspase3. Western blotting data show one representative experiment out of three.

recombinant cs130-IL-12/23^{VHII}Fc, and recombinant HIL-6 with FLAG-beads. The precipitated bound fraction and the non-precipitated unbound fraction were analyzed by Western blotting (Fig. 7C, last two lanes). Western blotting revealed that FLAG-tagged HIL-12 was precipitated with FLAG-beads, which resulted in co-immunoprecipitation of cs130-IL-12/23^{VHII}Fc and HIL-6 (Fig. 7C, last two lanes). cs130-IL-12/23^{VHII}Fc, HIL-6 and HIL-12 were also incubated separately with FLAG-beads as control. Here, only FLAG-tagged HIL-12 was detected in the bound fraction by Western blotting, whereas cs130-IL-12/23^{VHII}Fc and HIL-6 remained in the unbound fraction (Fig. 7C, lanes 4–9). Lanes 1 to 3 of Figure 7C served as loading control using recombinant proteins. Our data demonstrated that cs130-IL-12/23^{VHII}Fc simultaneously inhibited IL-6 trans-signaling and IL-23 signaling which is mediated by the formation of a ternary 2cytokine:cytokine inhibitor complex.

Discussion

Here, we describe the development of two dimeric and bispecific biomolecules consisting of a basic IL-6 trans-signaling inhibitory module fused to inhibitory nanobodies targeting either hTNF α or IL-12/IL-23 signaling. The basic IL-6 trans-signaling module cs130 is made of the first three

extracellular domains D1 to D3 of gp130, which binds IL-6:sIL-6R complexes. Of note, these domains alone facilitate only low-affinity binding (35). High-affinity binding in cs130Fc is achieved by fusion with VHH6, a non-neutralizing IL-6:sIL-6R selective nanobody (23). In contrast to spg130, cs130 did not inhibit IL-11 trans-signaling (23). Bispecificity toward hTNF α , and IL-12/IL-23 was achieved by the fusion of an additional antagonistic nanobody directed against hTNF α or the shared p40 subunit of IL-12/IL-23 (29, 30), which are located between the IL-6 trans-signaling inhibitor and the Fc part of an IgG1 antibody. The Fc part served as a dimerizer and eased the purification of the cs130Fc variants, cs130-IL-12/23^{VHHFc} and cs130-TNF^{VHHFc}.

Initially, bispecific antibodies (bsAbs), which bind two independent epitopes on the same or different antigens, were developed for therapeutic applications (36). Prominent examples are bsAbs as selective T cell engagers and activators with a binding site for a tumor-associated antigen and CD3 T cell co-receptor. Currently, more than 100 anti-cancer bsAbs are in clinical development, that prevent bacterial and viral infections, interfere with ligand/receptor interaction, mediate intracellular drug delivery, or result in serum half-life extension (37). The bispecific cs130 fusion proteins were highly effective in target binding due to neutralizing IL-6 trans-signaling, TNF-induced apoptosis, and IL-12/IL-23 signaling.

Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

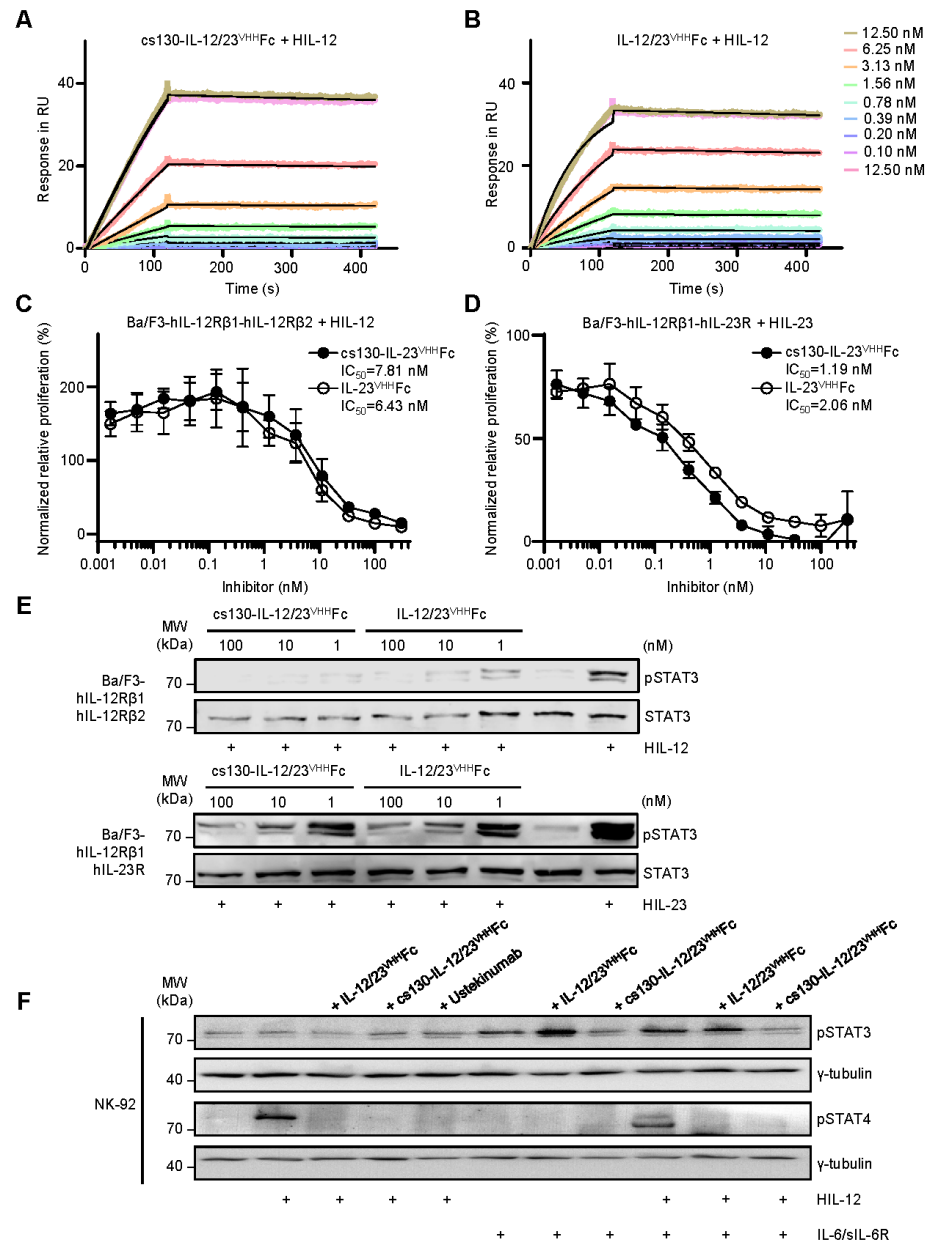


Figure 6. cs130-IL-12/23^{VHH}Fc inhibits HIL-12 and HIL-23. A, SPR analysis of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc binding to HIL-12. B, SPR analysis of IL-12/23^{VHH}Fc binding to HIL-12. C, Ba/F3-hIL-12Rβ1-hIL-12Rβ2 cells were stimulated with 10 ng/ml HIL-12 in the presence of increasing concentrations of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc. D, Ba/F3-hIL-12Rβ1-hIL-23R cells were stimulated with 0.5 ng/ml HIL-23 in the presence of increasing concentrations of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc. E, Western blot analysis of Ba/F3-hIL-12Rβ1-hIL-12Rβ2, and Ba/F3-hIL-12Rβ1-hIL-23R cells stimulated for 30 min

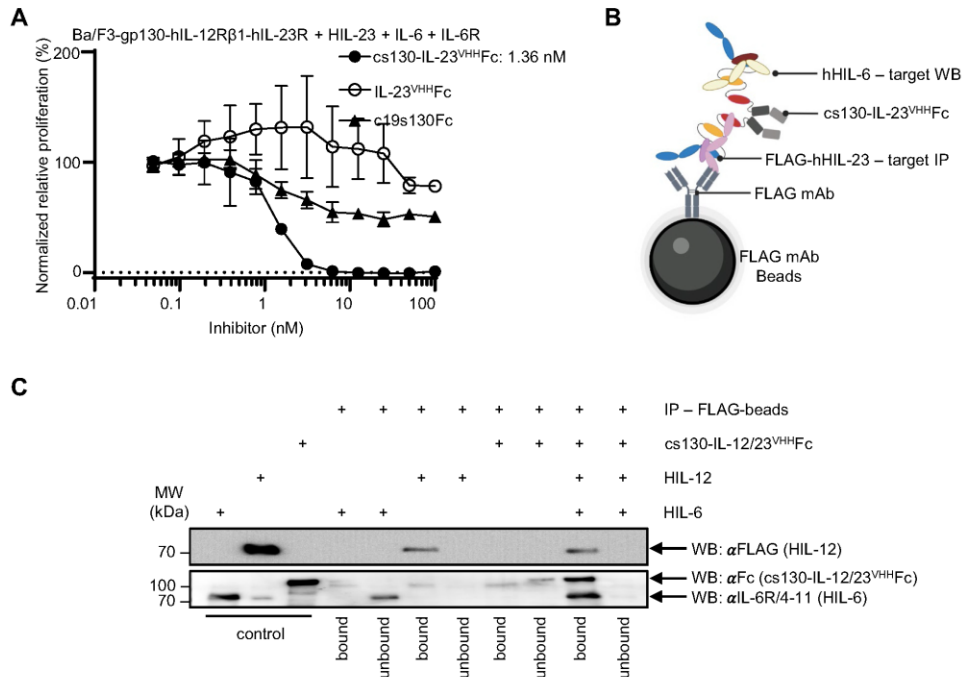


Figure 7. cs130-IL-12/23^{VHH}Fc inhibits IL-23 and IL-6 trans-signaling simultaneously. A, Ba/F3-gp130-hIL-12R β 1/hIL-23R cells were stimulated with 0.4 ng/ml IL-23 and 60 ng/ml IL-6 and 100 ng/ml sIL-6R in the presence of increasing concentrations of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, c19s130Fc and IL-12/23^{VHH}Fc. At 72 h post-stimulation, cellular proliferation was detected using CellTiter-Blue. Data were normalized to HIL-23/HIL-6 control. Assays are representative of three independent experiments. B, schematic illustration of the ternary complex formation and the pull-down and detection principle. C, pull-down assay of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc binding to HIL-12 and HIL-6. Recombinant FLAG-tagged HIL-12 was mixed in 1 M ratio with recombinant cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and recombinant HIL-6. 300 ng of purified protein was loaded for Western blotting and stained with FLAG-, Fc- and sIL-6R-antibodies. Shown is one representative experiment out of two independent experiments.

We also showed that the cs130-TNF^{VHH}-Fc blocks the target cytokines simultaneously without influencing the individual domains, which would reduce the binding affinity.

As mentioned above, sgp130 and variants are potent IL-6 trans-signaling inhibitors largely without affecting classic signaling (9). It seems that sgp130 also blocks inflammatory trans-presentation (cluster signaling), albeit results are still heterogeneous, and blocking might be context-dependent (8, 38). Therapeutic targeting of IL-6 in chronic inflammatory diseases mainly relies on the two IL-6R antibodies tocilizumab and sarilumab, while the siltuximab directed against IL-6 has been approved for Castleman's disease (39). However, Tocilizumab has failed in phase II clinical trials for IBD due to non-tolerable side effects (17, 18), including intestinal perforations that were also occasionally observed in patients during anti-IL-6R therapy of rheumatoid arthritis (19). A recent publication

described the development of bispecific nanobodies targeting IL-6 and TNF with additive efficacy in translational models of rheumatoid arthritis by inhibition of classic and trans-signaling of IL-6 and TNF signaling (40), a strategy that most likely will not work in IBD. The first small open-label phase IIa clinical trial with sgp130Fc (Olamkicept) included 16 patients with IBD (EudraCT No 2016-000205-36). Olamkicept was well tolerated and induced a clinical response in 44% and clinical remission in 19% of the patients (41). The second double-blind placebo-controlled phase IIb clinical study with 91 patients focused on moderate to severe ulcerative colitis (21). Clinical remission was not seen in the placebo group but in 6.7% of the patients receiving the lower dose of Olamkicept (300 mg/injection) and 20.7% receiving the higher dose of Olamkicept (600 mg/injection). Of note, mucosal healing was seen in 3.4% (placebo), 10% (Olamkicept 300 mg/injection), and 34.5%

with 10 ng/ml HIL-12 or 2 ng/ml HIL-23 in the presence of the indicated concentrations of cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc. Prior to stimulation, HIL-12, HIL-23 and inhibitors were incubated separately for 30 min. Western blots were stained for phosphorylated pSTAT3, STAT3. Western blots are representative of three independent experiments. F, Western blot analysis of NK-92 cells stimulated for 30 min with 10 ng/ml HIL-12 or 150 ng/ml IL-6 and 300 ng/ml sIL-6R in the presence of 250 nM cs130-IL-12/23^{VHH}Fc and IL-12/23^{VHH}Fc. Prior to stimulation, HIL-12, HIL-23 and inhibitors were incubated separately for 60 min. Western blots were stained for phosphorylated pSTAT3, pSTAT4, and γ -Tubulin. Western blots are representative of two independent experiments.

Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

(Olamkicept 600 mg/injection) of the patients (20). Phase III trials are currently in preparation (22). One motivation to generate bispecific cs130Fc variants was based on these recent data suggesting that selective inhibition of trans-signaling might be superior over simultaneous blocking of classic and trans-signaling by IL-6R antibodies in IBD.

We selected nanobodies blocking the activity of hTNF α and IL-12/IL-23 because conventional IgG1 antibodies blocking TNF α and Interleukin (IL)-23 have been approved for the treatment of IBD (16), and therefore these targets are promising candidates to generate small-sized cs130 fusion proteins. Anti-TNF α agents, including Adalimumab, Infliximab, Certolizumab, and Golimumab are now used as biological gold-standard therapy for both colitis ulcerosa and Crohn's disease management (42, 43). The TNF nanobody used in this study is part of Ozoralizumab, a trivalent humanized antibody consisting of two different TNF α nanobodies and a human serum albumin nanobody to increase serum half-life (44). Ozoralizumab was well tolerated and showed efficacy in two recent phase III clinical studies for rheumatoid arthritis (OHZORA and NATSURA trial) (45, 46). The IgG1 antibody Ustekinumab, which targets IL-12/IL-23 p40 subunit, was recently approved for Crohn's disease (47). Like Ustekinumab, the IL-12/IL-23 nanobody used in this study also binds to p40 and prevents interaction of IL-12 and IL-23 with the common IL-12R β 1 (30).

Taken together, the cs130Fc variants cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc are the first bispecific cytokine inhibitor fusion protein designs consisting of a soluble cytokine receptor and cytokine-targeting nanobodies.

Experimental procedures

Cloning of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-23^{VHH}Fc

The cDNAs encoding the single domain antibody TNF-VHH (28, 29) were amplified by PCR using the following forward (5'-ACCGGTGGCGGCGGAGGAAGCAGAGTTCA GCTTCAAGAAATCTGGTGGAGG-3') and reverse (5'-GCGG CCGCAGAAAGAAACAGTCACTTG-3') primer, and 22E11-VHH (30) was amplified using the following forward (5'- ACC GGTGGCGGCGGAGGAAGC GAAGTTCAGCTGGTT- GAAAGCGG-3') and reverse (5'- GCGGCCGCTGAGC- TAAC-3') primer. The cDNAs were subcloned *via* AgeI and NotI in the plasmid pcDNA3.1-Fc (Invitrogen) coding for an N-terminal signal peptide and a myc tag (EQKLISEEDL) and a C-terminal human IgG1-Fc tag. TNF-VHH, and 22E11-VHH were subcloned into pcDNA3.1-c19s130Fc (27) *via* AgeI and NotI to generate cs130-TNF^{VHH}Fc, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc, respectively.

Cells and reagents

The generation of Ba/F3-gp130 and of Ba/F3-gp130-IL-6R cells was described (48). Proliferation of Ba/F3-gp130 cells was maintained in the presence of HIL-6 or IL-6/sIL-6R and of Ba/F3-gp130-IL-6R cells by IL-6 (31). Fibrosarcoma cell line L929 was derived from normal subcutaneous areolar and adipose tissue of a 100-day-old male C3H/An mouse. For seeding and

subcultivation of L929 cells, cells were first washed with PBS and incubated with trypsin/EDTA solution (Genaxxon bioscience cat. #4261.0110) until cells detached. Cell lines were grown in DMEM high glucose culture medium (GIBCO, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO, Life Technologies), 60 mg/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Germany) at 37 °C with 5% CO₂. Recombinant HIL-6, human IL-6, human sIL-6R and c19s130Fc were produced and purified as described (27). Expi-293F cells (ThermoFisher Scientific) were cultured in 30 ml Expi293F expression medium without antibiotics in shaker flask until they reached a density of 3 to 5 × 10⁶ c/ml in a 37 °C incubator with 8% CO₂ on an orbital shaker at 125 rpm. NK-92 cells were cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum, 60 mg/l penicillin and 100 mg/l streptomycin at 37 °C 5% CO₂. Antibodies directed against STAT3 phosphorylated at Tyr705 (clone D3A7), STAT3 (clone 124H6), Caspase-3 (# 9662), and DYKDDDDK Tag (clone D6W5B) were obtained from Cell Signaling Technology. 4 to 11 mAb was produced as described previously (48). Mouse anti- γ -Tubulin (T5326) was obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt), rabbit anti-human IgG Fc (#31423) and peroxidase-conjugated secondary Abs (#31432, #31462) were obtained from Pierce (ThermoFisher Scientific).

Proliferation assays

Ba/F3-gp130 cells were washed three times and 5000 cells were cultured for 3 days in a final volume of 100 μ l in the presence of cytokines and inhibitors. The CellTiter-Blue Reagent was used to determine cellular viability by recording the fluorescence (excitation 560 nm, emission 590 nm) using an Infinite M200 PRO plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) immediately after adding 20 μ l of reagent per well (time point 0) and up to 120 min thereafter.

Cytokine stimulation of cells and lysate preparation

10⁶ Ba/F3-gp130 or NK-92 cells/ml were washed and starved in serum-free medium for 5 h. L929 cells were seeded at a density of 5 × 10⁵ cells per 60 mm dish 24 h prior stimulation and also washed five times with PBS before starving in serum-free DMEM for at least 5 h. Prior to stimulation, cytokines and inhibitors were pre-incubated at room temperature for 30 min. Subsequently, cells were stimulated with the indicated cytokines and inhibitor combinations for 20 min, harvested by centrifugation at 4 °C for 1 min at 1500g, frozen and lysed. Protein concentration of cell lysates was determined by the BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific). Analysis of STAT3 activation was performed by Western blotting of 50 μ g of total protein from total cell lysates and subsequent detection steps using the anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:1000), anti-STAT3 (1:1000), γ -Tubulin (1:1000), and Caspase 3 (1:1000) antibodies described above.

Western blotting

Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and

transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were blocked and probed with the indicated primary antibodies. After washing, membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:2500) or fluorescence-labeled secondary antibodies (1:10,000). The Immobilon Western Reagents (Millipore Corporation) and the ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) or the Odyssey Fc Imaging System (LI-CORE Biosciences) were used for signal detection.

Expression and purification of cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL12/IL-23^{VHH}Fc

Mammalian expression plasmids encoding cs130-TNF^{VHH}Fc and cs130-IL-23^{VHH}Fc were transfected into Expi-293F cells using ExpiFectamine. Reaching 4.5 to 5.5×10^6 c/ml, the cells were diluted to a final density of 3×10^6 c/ml in 30 ml Expi293F expression medium for transfection. 30 µg of the plasmid expression vectors were used for transfection. Henceforth, the culture was harvested by centrifugation at 450g at 4 °C for 5 min, followed by centrifugation of the resulting supernatant at 4000g at 4 °C for 20 min. The supernatant of the second centrifugation step was filtered (0.45 µm, Carl Roth cat. #P667.1) and purified by affinity chromatography. Supernatant was loaded on a ProteinA column (1 ml HiTrap MabSelect PrismA; GE Healthcare) at a flow rate of 1 ml/min. The column was then washed with 30 column volumes of PBS. Proteins were eluted at pH 3.2 to 3.5 using a 50 mM citric acid buffer. Fractions containing the protein peak were pooled, and the pH was adjusted to pH 7 with 1 M Tris. Proteins were buffer exchanged to PBS using illustra NAP25 (GE Healthcare Life Sciences) columns. Protein concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm, and samples were flash-frozen in liquid nitrogen. 2.5 µg of protein were loaded per lane and separated by SDS-PAGE under reducing (106 mM β-Mercaptoethanol, 95 °C for 10 min) and non-reducing (without β-Mercaptoethanol and cooking) conditions. The gel was stained with Coomassie staining solution (80% ethanol, 20% acetic acid, 4% Coomassie brilliant blue R250) for 1 h and was destained overnight in destaining solution (20% ethanol, 10% acetic acid).

Surface plasmon resonance

For surface plasmon resonance experiments, the Biacore X100 instrument (GE Healthcare Life Sciences) was used. cs130-TNF^{VHH}Fc, cs130-IL12/23^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and IL12/IL-23^{VHH}Fc were captured to a single flow cell of a ProteinA sensorchip to reach 100 response units (RUs) of the analyte at maximal concentration. Three samples containing only running buffer were injected over both ligand and reference flow cell, followed by HIL-6, HIL-12 serially diluted from 50 to 0.1 nM, with a replicate of the 12.5 nM concentration. The analyte was injected at a flow rate of 30 µl/min for 120 s, and the dissociation was measured for 300 s. hsTNFRIFc (R&D Systems, #372-RI-050/CF) was immobilized in 10 mM acetate buffer (pH 5.5) by amine coupling on a CM5 chip (490 RU). After immobilization, hTNFα was injected at a flow rate of

30 µl/min at increasing concentrations (0.2–200 nM). Association was monitored in periods of 120 s, and the dissociation was measured for 400 s. Immobilized hsTNFRIFc was regenerated with 2 M MgCl₂ to remove bound hTNFα for multiple cycle measurement. 25 nM hTNFα was injected in the presence of increasing concentrations of cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and Etanercept (0.2–25 nM). Experiments were carried out at 25 °C in PBS pH 7.4, composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO₄²⁻ and H₂PO₄⁻, and 0.05% (v/v) surfactant P20 (GE Healthcare). The resulting data were reference subtracted and fit to a 1:1 binding model using the Biacore X100 Evaluation software V 2.0.1.

L929-cytotoxicity assays with hTNFα

L929 cells were seeded on a 96-well plate with a density of 30,000 cells/well and cultured for 24 h. Next, the cells were incubated for 30 min at 37 °C with 2.5 µg/ml Actinomycin D (Thermo Fisher Scientific, cat. #15452969). Afterwards, 1 ng/ml hTNFα (Thermo Fisher Scientific, cat. # PHC3011) was added with or without indicated concentrations of cs130-TNF^{VHH}Fc, TNF^{VHH}Fc, and Etanercept and cultured for 24 h at 37 °C. The cell viability was assessed with Calcein AM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions on an Infinite M200 PRO plate reader.

AnnexinV/7-AAD staining

1.25×10^5 L929 cells were used per 6 well and incubated with 1 ng/ml hTNFα with or without indicated concentrations of cs130-TNF^{VHH}Fc for 24 h. Cells were washed twice with ice-cold PBS, if indicated with 70% ethanol, and resuspended in 300 µl Annexin V binding buffer (BD Bioscience) with 0.5 µl Annexin V-PE (ImmunoTools) for 15 min in the dark at RT. 1 µl 7-AAD (R&D Systems) was added before analysis *via* flow cytometry recording 20,000 events.

Immunoprecipitation pulldown assay

Anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma Aldrich, FLAG-beads) was washed twice with TBS-Tween (0.05%) at 2700g for 2 min. HIL-6, HIL-12, and cs130-IL-12/23^{VHH}Fc were adjusted to a concentration of 10 µg/ml, and 15 µg/ml, respectively, in TBS-Tween (0.05%). Proteins were added separately as negative control to 30 µl ANTI-FLAG M2 affinity gel or mixed together in 1 M ratio for pulldown and incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. After centrifugation, an unbound fraction was collected, samples were washed twice with TBS-Tween (0.05%), and proteins were eluted with 100 µl 2.5× Laemmli buffer at 95 °C for 10 min 20 µl of supernatant with 300 ng protein was subjected to Western blot analysis.

Statistical analyses

A representative experiment of $n \geq 3$ proliferation assays with comparable results is displayed. IC₅₀ values were calculated using a non-linear regression analysis as four parameters variable slope in GraphPad Prism (version 8.0.2 for Windows,

Bispecific IL-6 trans-signaling inhibitor

GraphPad Software, La Jolla California, United States). The data are presented as means $\pm$ SD. For multiple comparisons, two-way ANOVA followed by Bonferroni correction was used (Fig. 5) (GraphPad Prism 8.0.2). Statistical significance was set at the level of graphs $p \leq 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.001$).

Data availability

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author JS.

Acknowledgments—This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant to JS (SCHE 907/5–1 and SCHE 907/6–1).

Author contributions—A. G., J. E., J. W., J. M. M., J. S. and C. W. methodology; A. G., J. E., J. W., and C. W. investigation; A. G., J. E., J. W., C. W., D. M. F., K. B. P. A. L., G. P., and S. P. formal analysis; A. G., J. E., J. W., C. W., and J. S. writing—original draft; D. M. F., K. B. P. A. L., G. P., S. P. resources.

Funding and additional information—This work was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Conflict of interest—The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations—The abbreviations used are: bsAbs, bispecific antibodies; CBB, Coomassie brilliant blue; hTNF α , human TNF α ; IBD, inflammatory bowel disease; IL, Interleukin; IC50, Half maximal inhibitory concentration; TNF, tumor necrosis factor.

References

- Jones, S., and Jenkins, B. (2018) Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 773–789
- Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T. (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 362–374
- Croxford, A., Kulig, P., and Becher, B. (2014) IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 415–421
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., et al. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**, 573–581
- Rose-John, S., and Heinrich, P. C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300**, 281–290
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011) The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 484–494
- Lamertz, L., Rummel, F., Baran, P., Hansen, S., Polz, R., Waetzig, G., et al. (2018) Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 trans-presentation but not intracellular autocrine responses. *Sci. Signal.* **11**, eaar7388
- Heink, S., Yorge, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., et al. (2017) Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **18**, 74–85
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., et al. (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.* **268**, 160–167
- Barkhausen, T., Tschernig, T., Rosenstiel, P., van Griensven, M., Von berg, R., Dorsch, M., et al. (2011) Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit. Care Med.* **39**, 1407–1413

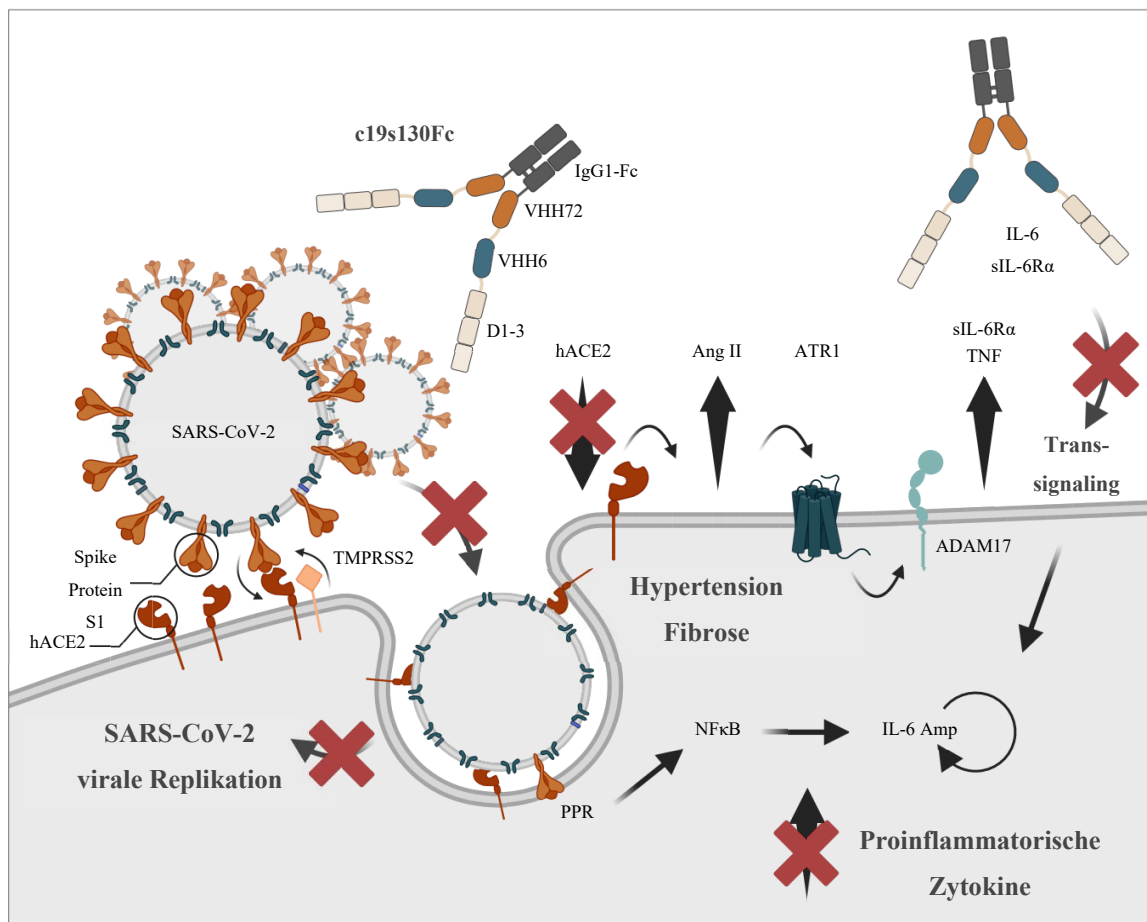
- Zhang, H., Neuhofer, P., Song, L., Rabe, B., Lesina, M., Kurkowski, M. U., et al. (2013) IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J. Clin. Invest.* **123**, 1019–1031
- Kaiser, K., Prystaz, K., Vikman, A., Haffner-Luntzer, M., Bergdolt, S., Strauss, G., et al. (2018) Pharmacological inhibition of IL-6 trans-signaling improves compromised fracture healing after severe trauma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **391**, 523–536
- Prystaz, K., Kaiser, K., Kovtun, A., Haffner-Luntzer, M., Fischer, V., Rapp, A. E., et al. (2018) Distinct effects of IL-6 classic and trans-signaling in bone fracture healing. *Am. J. Pathol.* **188**, 474–490
- George, M. J., Jasmin, N. H., Cummings, V. T., Richard-Loendt, A., Launchbury, F., Woollard, K., et al. (2021) Selective interleukin-6 trans-signaling blockade is more effective than panantagonism in reperfused myocardial infarction. *JACC Basic Transl. Sci.* **6**, 431–443
- Kaplan, G. (2015) The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 720–727
- Elhag DA, K. M., Saadaoui, M., Akobeng, A. K., Al-Mudahka, F., Elawad, M., and Al Khodor, S. (2022) Inflammatory bowel disease treatments and predictive biomarkers of therapeutic response. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6966
- Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., et al. (2004) A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**, 989–996
- Danese, S., Vermeire, S., Hellstern, P., Panaccione, R., Rogler, G., Fraser, G., et al. (2019) Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). *Gut* **68**, 40–48
- Gout, T., Ostör, A., and Nisar, M. (2011) Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review. *Clin. Rheumatol.* **30**, 1471–1474
- Chen, B., Zhang, S., Wang, B., Chen, H., Li, Y., Cao, Q., et al. (2021) Efficacy and safety of the IL-6 trans-signaling inhibitor olamkicept: a phase 2 randomized, placebo-controlled trial in moderately to severely active Ulcerative Colitis. *J. Crohn's Colitis* **15**, S041–S042
- Chen, B. L., Zhang, S., Wang, B., Chen, H., Li, Y., Cao, Q., et al. (2021) Olamkicept, an IL-6 trans-signaling inhibitor, is effective for induction of response and remission in a randomized, Placebo-controlled trial moderate severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **161**, E28–E29
- Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J. P., Conrad, C., Tran, F., Hoper, H., et al. (2021) Therapeutic interleukin 6 trans-signaling inhibition by olamkicept (spp130Fc) in patients with active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.062>
- Heise, D., Soria, A., Hansen, C., Dambietz, C., Akbarzadeh, M., Berg, A., et al. (2021) Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion. *Sci. Signal.* <https://doi.org/10.1126/scisignal.abd3480>
- Adams, R., Burnley, R. J., Valenzano, C. R., Qureshi, O., Doyle, C., Lumb, S., et al. (2017) Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling. *Sci. Rep.* **7**, 37716
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., et al. (2018) The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6/sIL-6R/spp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J. Biol. Chem.* **293**, 6762–6775
- Wrapp, D., De Vlieger, D., Corbett, K. S., Torres, G. M., Wang, N., Van Breedam, W., et al. (2020) Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell* **181**, 1004–1015.e1015
- Ettich, J., Werner, J., Weitz, H., Mueller, E., Schwarzer, R., Lang, P., et al. (2022) A hybrid soluble gp130/spike-nanobody fusion protein simultaneously blocks interleukin-6 trans-signaling and cellular infection with SARS-CoV-2. *J. Virol.* **96**, e0162221
- Conrad, U., Plagmann, L., Malchow, S., Sack, M., Floss, D., Kruglov, A., et al. (2011) ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 22–31
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., et al. (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha

- VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 1856–1866
30. Desmyter, A., Spinelli, S., Boutton, C., Saunders, M., Blachetot, C., de Haard, H., *et al.* (2022) Neutralization of human interleukin 23 by multivalent nanobodies explained by the structure of cytokine-nanobody complex. *Front. Immunol.* **8**, 884
 31. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., *et al.* (1997) A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* **15**, 142–145
 32. Yung, R. (2001) Etanercept Immunex. *Curr. Opin. Investig. Drug* **2**, 216–221
 33. Rahman, M., Barrett, J., Brouckaert, P., and andMcFadden, G. (2006) Rahman MM, barrett JW, brouckaert P, McFadden G. *J. Biol. Chem.* **281**, 22517–22526
 34. Schmid, D. S., Tite, J. P., and Ruddle, N. H. (1986) DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1881–1886
 35. Sommer, J., Garbers, C., Wolf, J., Trad, A., Moll, J. M., Sack, M., *et al.* (2014) Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor sgp130-E10. *J. Biol. Chem.* **289**, 22140–22150
 36. Brinkmann, U., and Kontermann, R. (2021) Bispecific antibodies. *Science* **372**, 916–917
 37. Labrijn, A., Janmaat, M., Reichert, J., and Parren, P. (2019) Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 585–608
 38. Lamertz, L., Rummel, E., Polz, R., Baran, P., Signal, H. S., Waetzig, G. H., *et al.* (2018) Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Sci. Signal.* <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar7388>
 39. Choy, E., De Benedetti, E., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M., and Kishimoto, T. (2020) Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16**, 335–345
 40. Biesemann, N., Margerie, D., Asbrand, C., Rehberg, M., Savova, V., Ageusop, L., *et al.* (2023) Additive efficacy of a bispecific anti-TNF/IL-6 nanobody compound in translational models of rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **15**, eabq4419
 41. Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J. P., Conrad, C., Tran, F., Höper, H., *et al.* (2021) Therapeutic interleukin-6 trans-signaling inhibition by olamkicept (sgp130Fc) in patients with active. *Inflamm. Bowel Dis. Gastroenterol.* **160**, 2354–2366.e2311
 42. Sandborn, W., Feagan, B., Marano, C., Zhang, H., Strauss, R., Johanss, J., *et al.* (2014) Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* **146**, 96–109
 43. Reinisch, W., Gecse, K., Halfvarson, J., Irving, P., Jahnsen, J., Peyrin-Biroulet, L., *et al.* (2021) Clinical practice of Adalimumab and Infliximab biosimilar treatment in adult patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **27**, 106–122
 44. Ishiwatari-Ogata, C., Kyuuma, M., Ogata, H., Yamakawa, M., Iwata, K., Ochi, M., *et al.* (2022) Ozoralizumab, a humanized anti-TNFα NANO-BODY® compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNFα IgG. *Front. Immunol.* **13**, 853008
 45. Tanaka, Y., Kawanishi, M., Nakanishi, M., Yamasaki, H., and andTakeuchi, T. (2022) Efficacy and safety of anti-TNF multivalent NANO-BODY® compound 'ozoralizumab' without methotrexate co-administration in patients with active rheumatoid arthritis: a 52-week result of phase III, randomised, open-label trial (NATSUZORA trial). *Mod. Rheumatol.* **33**, 875–882
 46. Tanaka, Y., Kawanishi, M., Nakanishi, M., Yamasaki, H., and Takeuchi, T. (2022) Efficacy and safety of the anti-TNF multivalent NANO-BODY® compound ozoralizumab in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: a 52-week result of a phase II/III study (OHZORA trial). *Mod. Rheumatol.* **33**, 883–890
 47. Harris, K., Horst, S., Gadani, A., Nohl, A., Annis, K., Duley, C., *et al.* (2016) Patients with refractory Crohn's disease successfully treated with Ustekinumab. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 397–401
 48. Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., *et al.* (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110**, 1748–1755

PUBLIKATION 2

A HYBRID SOLUBLE GP130/SPIKE-NANOBODY FUSION PROTEIN SIMULTANEOUSLY BLOCKS INTERLEUKIN-6 TRANS-SIGNALING AND CELLULAR INFECTION WITH SARS-CoV-2

Julia Ettich, Julia Werner, Hendrik T. Weitz, Eva Mueller, Roland Schwarzer, Philipp A. Lang, Jürgen Scheller, Jens M. Moll



Journal: ASM Journals, Journal of Virology, Vol. 96, No. 4

Veröffentlichung: 23. Februar 2022

Impact-Faktor: 6.549 (2022-2023)

Anteil an dieser Arbeit: 50%

Proteinexpression und Quantifizierung, Zellviabilitätstests, Stimulationstests, Western Blots, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Klonierung synthetischer Rezeptoren, Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen, Durchflusszytometrie, Datenanalyse, Schreiben des Manuskripts.



A Hybrid Soluble gp130/Spike-Nanobody Fusion Protein Simultaneously Blocks Interleukin-6 *trans*-Signaling and Cellular Infection with SARS-CoV-2

Julia Ettich,^a Julia Werner,^b Hendrik T. Weitz,^a Eva Mueller,^c Roland Schwarzer,^c Philipp A. Lang,^b Jürgen Scheller,^a  Jens M. Moll^a

^aInstitute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

^bDepartment of Molecular Medicine II, Medical Faculty, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

^cInstitute for Translational HIV Research, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

ABSTRACT Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection can induce mild to life-threatening symptoms. Especially individuals over 60 years of age or with underlying comorbidities, including heart or lung disease and diabetes, or immunocompromised patients are at a higher risk. Fatal multiorgan damage in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients can be attributed to an interleukin-6 (IL-6)-dominated cytokine storm. Consequently, IL-6 receptor (IL-6R) monoclonal antibody treatment for severe COVID-19 cases has been approved for therapy. High concentrations of soluble IL-6R (sIL-6R) were found in COVID-19 intensive care unit patients, suggesting the involvement of IL-6 *trans*-signaling in disease pathology. Here, in analogy to bispecific antibodies (bsAbs), we developed the first bispecific IL-6 *trans*-signaling inhibitor, c19s130Fc, which blocks viral infection and IL-6 *trans*-signaling. c19s130Fc is a designer protein of the IL-6 *trans*-signaling inhibitor cs130 fused to a single-domain nanobody directed against the receptor binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein. c19s130Fc binds with high affinity to IL-6:sIL-6R complexes as well as the spike protein of SARS-CoV-2, as shown by surface plasmon resonance. Using cell-based assays, we demonstrate that c19s130Fc blocks IL-6 *trans*-signaling-induced proliferation and STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells as well as SARS-CoV-2 infection and STAT3 phosphorylation in Vero cells. Taken together, c19s130Fc represents a new class of bispecific inhibitors consisting of a soluble cytokine receptor fused to antiviral nanobodies and principally demonstrates the multifunctionalization of *trans*-signaling inhibitors.

IMPORTANCE The availability of effective SARS-CoV-2 vaccines is a large step forward in managing the pandemic situation. In addition, therapeutic options, e.g., monoclonal antibodies to prevent viral cell entry and anti-inflammatory therapies, including glucocorticoid treatment, are currently developed or in clinical use to treat already infected patients. Here, we report a novel dual-specificity inhibitor to simultaneously target SARS-CoV-2 infection and virus-induced hyperinflammation. This was achieved by fusing an inhibitor of viral cell entry with a molecule blocking IL-6, a key mediator of SARS-CoV-2-induced hyperinflammation. Through this dual action, this molecule may have the potential to efficiently ameliorate symptoms of COVID-19 in infected individuals.

KEYWORDS IL-6, SARS-CoV-2, sgp130, *trans*-signaling

Since its emergence in 2019, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spread globally, and as of 5 May 2021, about 200 million infections were recorded (<https://coronavirus.jhu.edu/>), threatening to overwhelm health care systems in many countries. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) resulting from SARS-CoV-2 infection leads to a broad variety of outcomes ranging from very mild cases to life-threatening respiratory failure, shock, or multiorgan failure (1). Even

Editor Tom Gallagher, Loyola University Chicago

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jürgen Scheller, jscheller@uni-duesseldorf.de, or Jens M. Moll, jens.moll@uni-duesseldorf.de.

The authors declare conflicts of interest. J.E., J.W., P.A.L., J.S., and J.M.M. have applied for a patent covering c19s130Fc (EP21189174.2). J.M.M. acts as a consultant for Ferring Pharmaceuticals.

Received 21 September 2021

Accepted 13 December 2021

Accepted manuscript posted online

22 December 2021

Published 23 February 2022

though SARS-CoV-2 infection in many cases leads to no or only mild symptoms, millions of hospitalizations and mortalities are associated with COVID-19 worldwide (<https://coronavirus.jhu.edu/>). Mortality rates vary considerably among studies (2); however, a clear age dependence was observed with regard to the development of severe COVID-19 (3). Severe COVID-19 causes hyperinflammatory syndrome culminating in respiratory dysfunction and multiorgan damage (4). SARS-CoV-2-induced hyperinflammatory syndrome is often compared to cytokine-induced conditions known from other diseases, including sepsis (1), acute respiratory distress syndrome (1), and chimeric antigen receptor (CAR) T cell-induced cytokine release syndrome (CRS) (5). Interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) were identified among the key players in COVID-19-induced cytokine release syndrome (6–12). In classic signaling, IL-6 initially binds to the membrane-bound IL-6R followed by full receptor complex formation with the signal-transducing receptor chain gp130. In *trans*-signaling, complexes of IL-6 and sIL-6R bind to cell membrane-bound gp130 (13). During inflammation, membrane-bound IL-6R can be proteolytically cleaved into sIL-6R by a disintegrin and metalloprotease (ADAM) proteases, mainly ADAM10 and -17 (14–16). Consequently, serum levels of IL-6 and sIL-6R concomitantly rise under inflammatory conditions (17–22). Of note, whereas IL-6 classic signaling is considered beneficial, IL-6 *trans*-signaling has been shown to be the mostly detrimental driving force of ongoing inflammatory reactions (13, 23), including autoimmune disease, sepsis (24), cytokine release syndrome (24), and COVID-19 (25). Hence, antibody (Ab) IL-6R inhibitors are of great interest for the treatment of the COVID-19-induced hyperinflammatory syndrome (12, 26). In 2017, the IL-6R antibody tocilizumab was approved for the treatment of the CAR T cell-induced cytokine storm (5). Tocilizumab and sarilumab bind to soluble and membrane-bound IL-6R (27, 28), whereas siltuximab binds to IL-6 (29). However, all antibodies prevent the binding of IL-6 to IL-6R and inhibit classic and *trans*-signaling equally well (30). Consistently, the IL-6R antibodies tocilizumab and sarilumab demonstrated beneficial effects on survival rates in severe COVID-19 cases in preclinical and clinical studies (9–11, 31). However, IL-6 is required to control viral infection (32); hence, global blockade of IL-6 signaling, e.g., through tocilizumab, is associated with an increased risk of airway infections (33, 34). This might be detrimental for the treatment of COVID-19 with IL-6 inhibitors due to the potential increase in viral replication following IL-6 blockade. Whereas antibodies did not differentiate between classic and *trans*-signaling, soluble forms of gp130 (sgp130) are selective binders of IL-6:sIL-6R complexes, thereby interfering with only IL-6 *trans*-signaling (35). Therefore, inhibition of IL-6 *trans*-signaling by sgp130 molecules might offer an attractive alternative inhibitory pathway for cytokine release syndrome during severe SARS-CoV-2 infections. In mice, sgp130 prevents death caused by cecal ligation puncture-induced septic shock syndrome (36), and bacterial infections are better controllable after selective inhibition of IL-6 *trans*-signaling than after inhibition of both IL-6 classic and *trans*-signaling by monoclonal IL-6 antibodies (37, 38). However, the combination of IL-6 blockade with agents reducing uncontrolled viral infection might be more beneficial in the treatment of severe COVID-19 cases. The spike protein of SARS-CoV-2 binds to human ACE2 (hACE2) on the cell surface to facilitate viral cell entry (39, 40). Hence, preventive strategies as well as most efforts on the development of therapeutic antibodies focus on the inhibition of the interaction of the receptor binding domain (RBD) of the spike protein (S-RBD) with ACE2 (41, 42). There are more than 50 monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 in various developmental stages (43), many of which are directed against the spike protein (43–45). Among them, the dimeric single-domain nanobody VHH72 was shown to efficiently block viral cell entry, whereas monomeric VHH72 was less effective (44). Here, we functionally combined our recently developed chimeric miniaturized sgp130 variant cs130 that selectively targets IL-6 *trans*-signaling (46) with the single-domain antibody VHH72. We demonstrate that this dimeric hybrid soluble

gp130/VHH72-nanobody fusion protein, c19s130Fc, simultaneously blocks IL-6 *trans*-signaling and SARS-CoV-2 infection.

RESULTS

Modular architecture of the bispecific inhibitor c19s130Fc. Several variants of soluble gp130 were described to selectively inhibit IL-6 *trans*-signaling. sgp130Fc consists of all six extracellular domains (ECDs) of gp130 fused to the Fc part of an IgG antibody. The dimerization of sgp130 increased the affinity for IL-6:sIL-6R complexes by a factor of 10 compared to monomeric sgp130 (35). Interestingly, only the first three extracellular domains of gp130 are needed for cytokine binding; however, sgp130 variants consisting of only these three domains (sgp130RAPS, sgp130-ELP, and sgp130E10) showed markedly reduced binding affinities for IL-6:sIL-6R complexes compared to sgp130 (47). The reason for this observation is not clear. Recently, we generated the miniaturized high-affinity sgp130 variant cs130, which consists of the first three extracellular cytokine binding domains, D1 to D3, of sgp130 (sgp130D1–D3) fused to the nanobody VHH6, which showed sgp130Fc-like binding affinities and inhibitory capacity (46). VHH6 specifically binds to IL-6:sIL-6R complexes, without inhibitory capacity (22, 46, 48). In particular, the monomeric fusion of VHH6 to sgp130D1–D3 resulted in an equally potent but an approximately three-times-smaller IL-6 *trans*-signaling inhibitor than sgp130Fc. Like IL-6, IL-11 signals via soluble and membrane-bound IL-11R and homodimeric gp130, and sgp130Fc inhibits IL-6 and IL-11 *trans*-signaling with comparable efficacy. Due to the incorporation of VHH6, the miniaturized sgp130 variant cs130Fc demonstrated increased specificity for IL-6 *trans*-signaling with diminished effects on IL-11 *trans*-signaling. As a consequence of the smaller size and modular architecture of cs130, we wondered if this design enables further upgrading into bispecificity with the binding of IL-6:sIL-6R complexes and a second IL-6-connected process/protein. Due to the involvement of IL-6 pathology in severe COVID-19 cases, we chose the binding of S-RBD to inhibit SARS-CoV-2 infection. To minimize the size of the resulting bispecific inhibitor, c19s130Fc, we chose to fuse the SARS-CoV-2 S-RBD nanobody VHH72 (44) to cs130 connected via a flexible linker sequence, T (GGGGG)₂GGGGTG (Fig. 1A). Molecular modeling illustrated the possible complex formation of IL-6:sIL-6R/c19s130Fc/S-RBD protein complexes (Fig. 1B). Domains 1 to 3 of sgp130 and VHH72 trap and inactivate the IL-6:sIL-6R complex, while fusion to VHH72 via a long flexible linker allows the simultaneous blockade of S-RBD. c19s130Fc plus the control proteins VHH72 fused to IgG Fc (VHH72Fc) and cs130Fc were readily expressed and secreted in HEK293T cells (Fig. 1C) and were subsequently produced and purified from the supernatants of Expi293 cells. Following affinity purification, the proteins were >90% pure, as demonstrated by SDS-PAGE analysis and subsequent Coomassie staining (Fig. 1D). The disulfide-mediated dimerization of all proteins was assessed by nonreducing SDS-PAGE. In this analysis, all Fc-fused proteins demonstrated a shift to a higher molecular weight in the absence of a reducing agent (Fig. 1E), confirming disulfide-mediated dimerization. We did not produce monomeric c19s130 because it was shown previously that VHH72 inhibited cellular virus entry only in the dimeric form (44).

c19s130Fc efficiently inhibits IL-6 *trans*-signaling. First, we determined and compared the affinities of c19s130Fc, cs130Fc, and VHH72Fc for hyper-IL-6 (HIL-6) in surface plasmon resonance (SPR) experiments. The *trans*-signaling designer cytokine HIL-6 is a fusion protein composed of IL-6 and the sIL-6R connected via a flexible peptide linker (49). Both c19s130Fc and cs130Fc displayed very high and almost identical affinities of 55 and 59 pM, respectively, for hyper-IL-6 (Fig. 2A). The kinetic analysis of the interaction revealed the formation of a very stable complex characterized by a very low k_{off} rate of 7.1×10^{-5} 1/s. Next, we analyzed the inhibitory potential of c19s130Fc toward IL-6 *trans*-signaling. To this end, Ba/F3 cells stably transduced with gp130 (Ba/F3-gp130) were stimulated with 100 ng/mL IL-6 and 200 ng/mL sIL-6R, which induced STAT3/extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation-dependent cellular proliferation. This cell-based assay served as a surrogate model for the induction of IL-6 *trans*-signaling. We observed concentration-dependent inhibition of IL-6 *trans*-signaling through c19s130Fc and cs130Fc, while no effect was found for VHH72Fc (Fig. 2B).

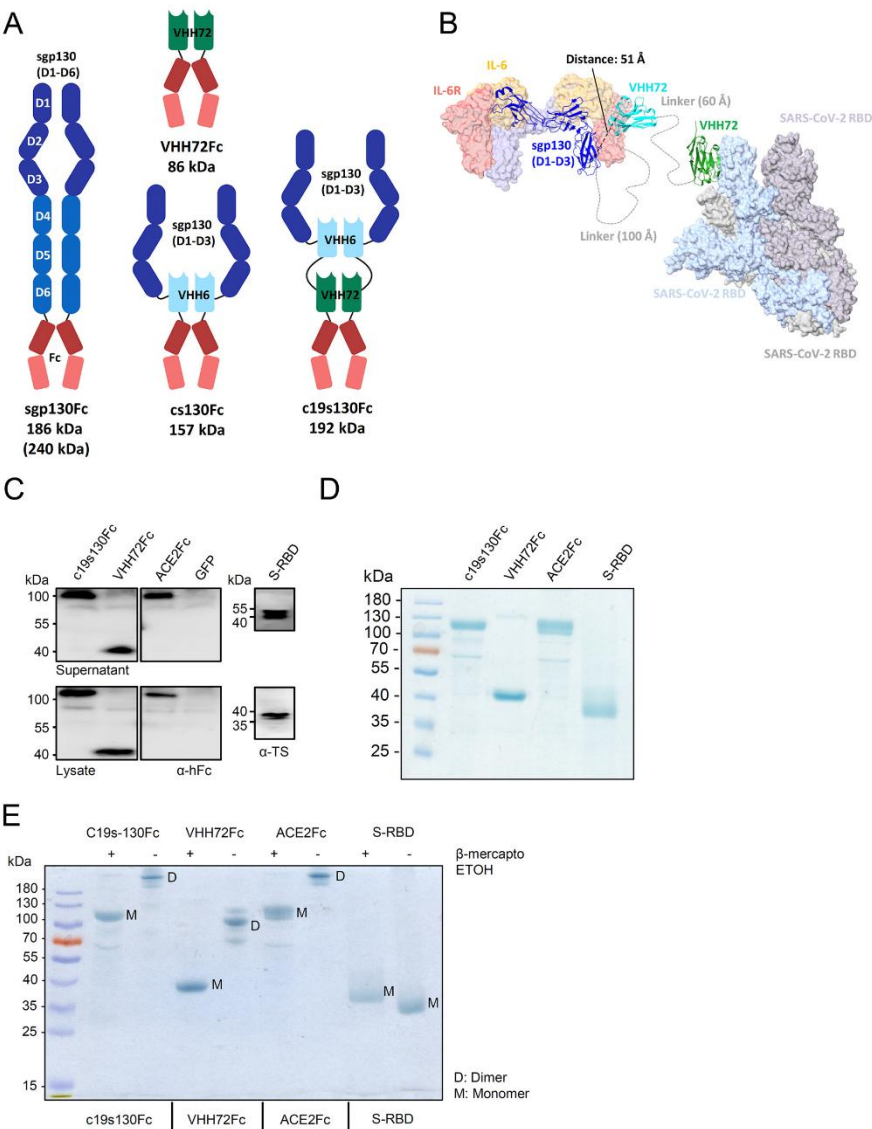


FIG 1 Expression and purification of c19s130Fc, VHH72Fc, ACE2Fc, and S-RBD. (A) Schematic overview of recombinant proteins utilized in this study. (B) Molecular modeling illustrating complex formation of IL-6:sgp130Fc/spike protein complexes. The structure of the IL-6 signaling complex (PDB accession number 1P9M) was superpositioned with the structure of VHH6 bound to a complex of IL-6:sgp130Fc (PDB accession number 5FUC). In addition, the structure of VHH72 bound to S-RBD (PDB accession number 7CAC) was superpositioned onto the structure of trimeric S-RBD in an open conformation (PDB accession number 7CAC). Components of the c19s130Fc protein are depicted in a ribbon representation, and the IL-6 signal complex and S-RBD are depicted in a surface representation using ChimeraX. (C) Western blotting of supernatants and lysates of HEK293T cells expressing c19s130Fc, VHH72Fc, ACE2Fc, and S-RBD. GFP, green fluorescent protein. (D) SDS-PAGE analysis of purified c19s130Fc, VHH72Fc, ACE2Fc, and S-RBD followed by Coomassie staining. (E) SDS-PAGE analysis of c19s130Fc, VHH72Fc, ACE2Fc, and S-RBD in the presence (+) or absence (-) of β-mercaptoethanol. ETOH, ethanol.

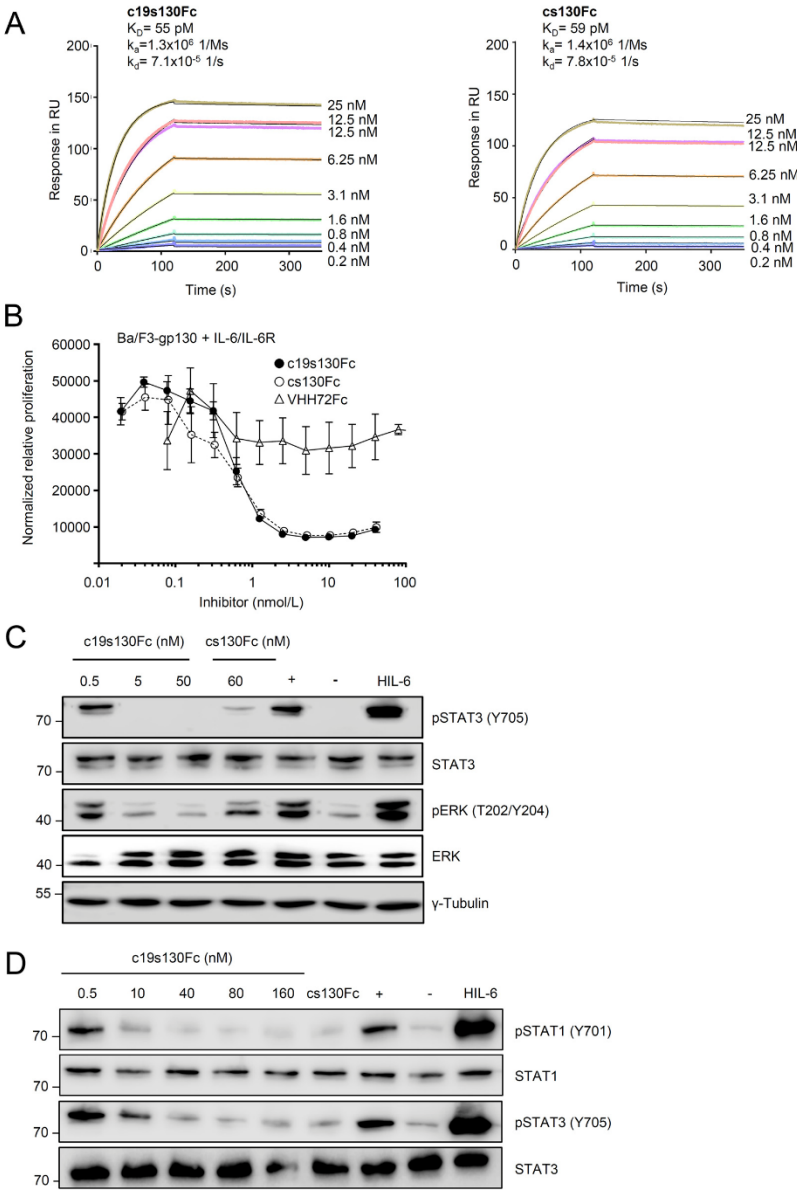


FIG 2 c19s130Fc blocks IL-6 *trans*-signaling. (A) SPR analysis of HIL-6 binding to c19s130Fc. c19s130Fc was immobilized on a protein A chip, and increasing concentrations of HIL-6 were injected. Sensorgrams in response units (RU) over time are depicted as colored lines, and global fit data are displayed as black lines. K_D , equilibrium dissociation constant; k_a , association constant; k_d , dissociation constant. (B) Ba/F3-gp130 cells were stimulated with 100 ng/mL IL-6 and 200 ng/mL sIL-6R in the presence of increasing c19s130Fc, cs130Fc, or VHH72Fc concentrations. At 72 h poststimulation, cellular proliferation was detected using CellTiter-Blue. Assay results are representative of data from three independent experiments. (Continued on next page.)

IC_{50} (50% inhibitory concentration) values of 1 ± 0.3 nM and 0.6 ± 0.2 nM were determined for c19s130Fc and cs130Fc, respectively. In an orthogonal experimental setup, IL-6/sIL-6R-stimulated Ba/F3-gp130 cells and Vero cells were utilized to examine the effect of c19s130Fc on STAT3 phosphorylation. In line with the proliferation data, c19s130Fc and cs130Fc inhibited STAT3 and ERK phosphorylation at concentrations above 5 nM in Ba/F3-gp130 cells (Fig. 2C). In Vero cells, STAT1 and STAT3 phosphorylations were blocked at concentrations above 10 nM (Fig. 2D). Taken together, c19s130Fc and cs130Fc but not VHH72 are highly potent inhibitors of IL-6 *trans*-signaling, as shown in biophysical and cell-based assays.

c19s130Fc binds to SARS-CoV-2 S-RBD and prevents viral entry. To determine the activity of the SARS-CoV-2-neutralizing entity in c19s130Fc, we first determined the binding kinetics with S-RBD. We determined the VHH72Fc binding affinity for S-RBD to be 680 nM using SPR (Fig. 3A), which deviates from the previously described affinity of 39 nM (44). Both setups contained monomeric S-RBD as an analyte, but the weaker binding in this study can primarily be attributed to a lower association rate constant (1.6×10^5 1/Ms [1 per molar times second]) and a higher dissociation rate constant (0.1 1/s). This can be explained by differences in the S-RBD protein compositions used. The previously described affinity of 39 nM was measured toward S-RBD and S-RBD sub-domain 1 (S-RBD-SD1), in contrast to S-RBD, which was utilized in our study. This may lead to an altered dissociation rate constant. For c19s130Fc, highly comparable S-RBD binding kinetics with an affinity of 880 nM were found. Hence, VHH72 fully retains its activity in c19s130Fc. We further analyzed the affinity of purified S-RBD for immobilized ACE2-Fc via SPR (Fig. 3B). An affinity of 52 nM was detected, which is in good agreement with the previously described affinity of 44 nM (40). In competition assays with immobilized ACE2-Fc, S-RBD, and increasing concentrations of c19s130Fc, an inhibitor-dependent reduction of the binding of S-RBD to ACE2-Fc was found (Fig. 3C and D). A concentration of 78 nM c19s130Fc resulted in a reduction of ACE2:S-RBD by approximately 40%, as apparent by a reduction of the maximal binding response from 98.96 response units (RU) to 60.28 RU. This suggested that c19s130Fc binding to SARS-CoV-2 S-RBD prevents spike protein binding to ACE2 and, hence, neutralizes this key interaction required for viral cell entry. Next, we analyzed the effect of c19s130Fc on SARS-CoV-2-mediated cytopathic effects (CPE) on Vero cells. Vero cells can be efficiently infected with SARS-CoV-2 (50, 51) and serve as a model system for viral infection. Following incubation with SARS-CoV-2, a reduction of virus-induced CPE was found in the presence of c19s130Fc and VHH72Fc but not cs130Fc (Fig. 4A to E). IC_{50} values of 8.1 ± 0.8 nM and 32.3 ± 18.6 nM were determined for c19s130Fc and VHH72Fc, respectively (Fig. 4B and C). As for SPR-based affinity assays, IC_{50} values for VHH72Fc reported previously by Wrapp et al. (2.5 nM) differed slightly in pseudovirus neutralization assays (44). In addition to CPE assays, we investigated the ability of c19s130Fc to prevent infection of Vero cells by SARS-CoV-2. Virally infected Vero cells were visualized via immunofluorescence (IF) using anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies (51). Vero cells treated with c19s130Fc and VHH72Fc showed reduced SARS-CoV-2 cell entry with comparable IC_{50} values of 15.1 ± 3.7 nM and 20.7 ± 1.6 nM, respectively (Fig. 5A to C). No effect was observed for cs130Fc. Next, we investigated the time-dependent effect of the inhibitors on viral entry during early phases of infection. Vero cells were incubated with SARS-CoV-2 for 5, 15, 45, or 135 min, and virus infection

FIG 2 Legend (Continued)

experiments. (C) Western blot analysis of Ba/F3-gp130 cells stimulated for 30 min with 8 nM IL-6 and 1 nM sIL-6R in the presence of the indicated concentrations of c19s130Fc and cs130Fc. Prior to stimulation, IL-6, sIL-6R, and inhibitors were incubated separately for 30 min. Western blots were stained for pSTAT3, STAT3, pERK, and ERK. Western blots are representative of results from three independent experiments. Controls for unstimulated cells (—), cells in the absence of c19s130Fc (+), and stimulation with HIL-6 are included. (D) Western blot analysis of Vero cells stimulated for 30 min with 400 ng/mL IL-6 and 200 ng/mL sIL-6R in the presence of the indicated concentrations of c19s130Fc and cs130Fc. Prior to stimulation, IL-6, sIL-6R, and inhibitors were incubated separately for 30 min. Western blots were stained for pSTAT3, STAT3, pSTAT1, and STAT1. Western blots are representative of results from three independent experiments. Controls for unstimulated cells (—), cells in the absence of c19s130Fc (+), and stimulation with HIL-6 are included.

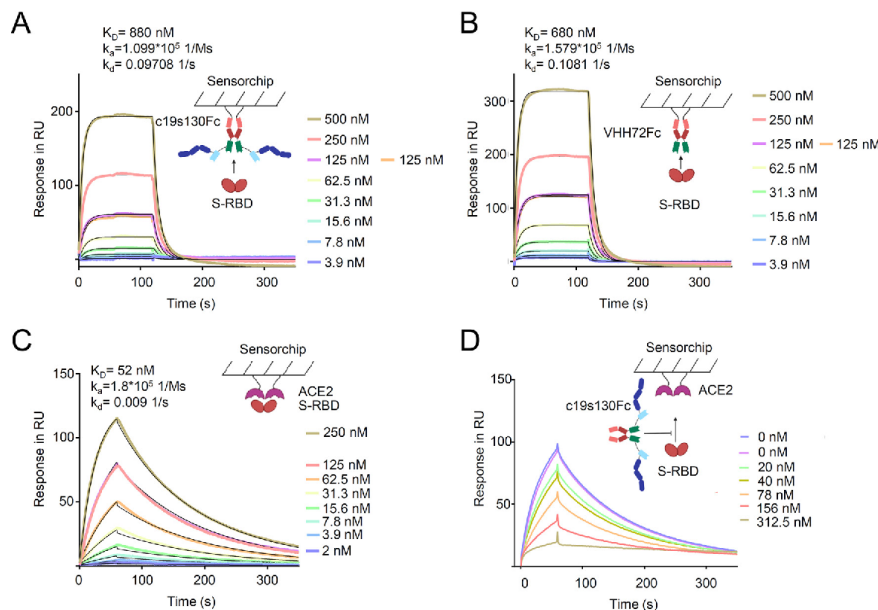


FIG 3 c19s130Fc binds to S-RBD and blocks its binding to ACE2. (A) SPR analysis of c19s130Fc binding to S-RBD. c19s130Fc was captured on a protein A chip, and increasing concentrations of S-RBD were injected. Sensorgrams in response units (RU) over time are depicted as colored lines, and global fit data are displayed as black lines. (B) SPR analysis of VHH72Fc binding to S-RBD. VHH72Fc was captured on a protein A chip, and increasing concentrations of S-RBD were injected. Sensorgrams in response units over time are depicted as colored lines, and global fit data are displayed as black lines. (C) SPR analysis of ACE2 binding to S-RBD. ACE2 was immobilized on a CM5 chip, and increasing concentrations of S-RBD were injected. Sensorgrams in response units over time are depicted as colored lines, and global fit data are displayed as black lines. (D) SPR analysis of ACE2 binding to S-RBD in the presence of c19s130Fc. ACE2 was immobilized on a CM5 chip, and 125 nM S-RBD was injected in the presence of increasing concentrations of c19s130Fc (colored lines).

and uptake were then stopped by the addition of monensin. Total viral entry increased from 5 min to 135 min of incubation (Fig. 5D). Both c19s130Fc and VHH72Fc reduced SARS-CoV-2 uptake with very comparable IC_{50} values of 14.2 ± 5.4 nM, 11.8 ± 3.6 nM, 9.1 ± 1.4 nM, and 8.2 ± 1.4 nM for c19s130Fc and 16.2 ± 4.3 nM, 9.8 ± 1.2 nM, 11.9 ± 0.8 nM, and 10.7 ± 3.5 nM for VHH72Fc (Fig. 5E to H). These IC_{50} values are very comparable to the IC_{50} values determined for viral uptake after 48 h. Hence, the inhibitory proteins seem to be stable and maintain activity for at least 48 h in a cell culture setting.

To further confirm the effect of c19s130Fc on SARS-CoV-2 cell entry, we stably expressed ACE2(1–615) on Ba/F3 cells (Ba/F3-ACE2). ACE2 was detected on the cell surface by flow cytometry (Fig. 6A). Following incubation of Ba/F3-ACE2 cells with S-RBD, surface binding of S-RBD was detected by flow cytometry (Fig. 6B). In the presence of c19s130Fc and VHH72Fc but not cs130Fc, a concentration-dependent reduction of surface-attached S-RBD was observed (Fig. 6C to E), indicating that c19s130Fc and VHH72Fc prevent the binding of the SARS-CoV-2 spike protein to ACE2.

In summary, our data showed that c19s130Fc efficiently neutralized SARS-CoV-2 binding to ACE2 and blocked viral cell entry and infection.

DISCUSSION

Here, we define a new class of bispecific biomolecules based on a soluble cytokine receptor fused to two nanobodies, which together inhibit IL-6 *trans*-signaling and SARS-CoV-2 infection. Therapeutic bispecificity was initially described for bispecific

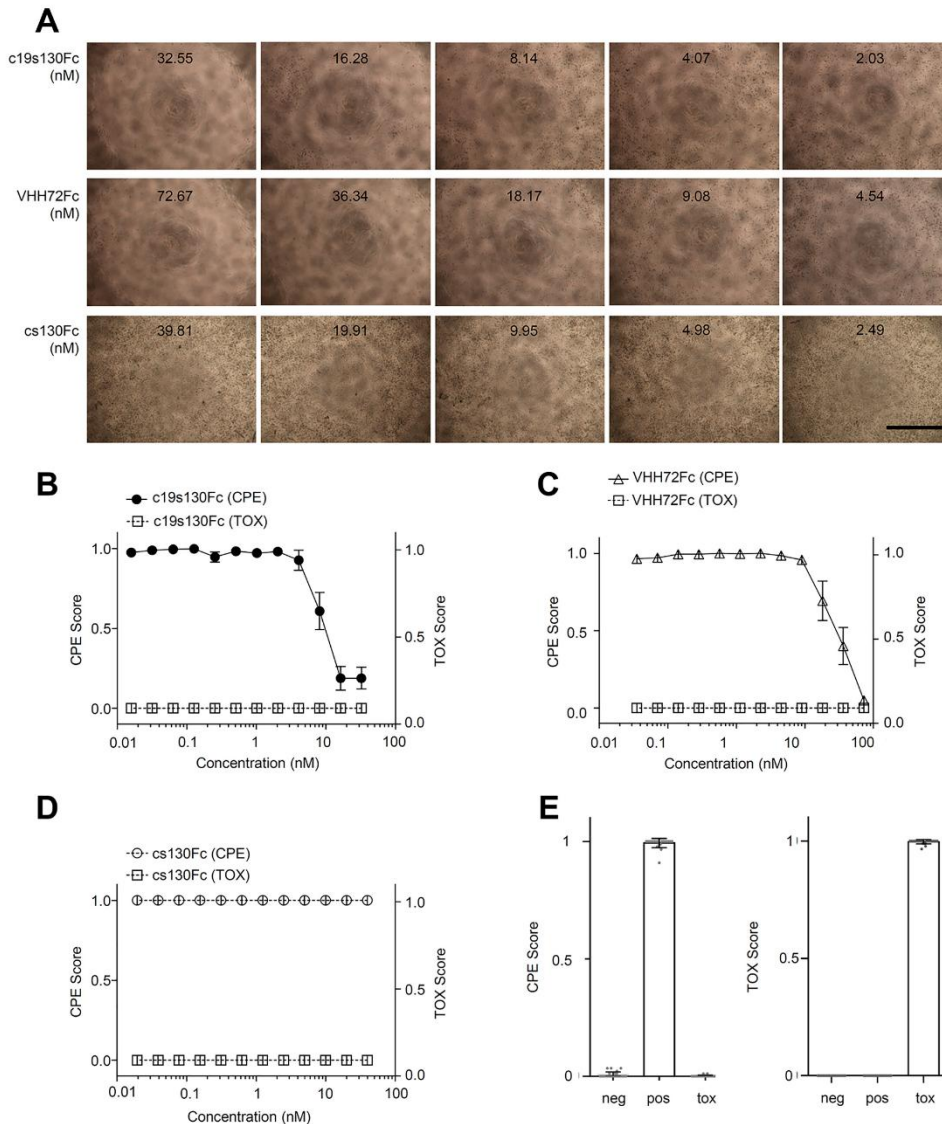


FIG 4 c19s130Fc limits SARS-CoV-2-mediated CPE on Vero cells. Vero cells were treated with the indicated concentrations of c19s130Fc, VHH72Fc, and cs130Fc and infected afterward with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.03. (A) Bright-field images were taken on day 3 postinfection (one representative out of 4 is shown) (bar = 1 mm). (B to D) CPE scores and TOX scores of c19s130Fc (B), VHH72Fc (C), and cs130Fc (D) were determined from bright-field images from panel A by CPETOXnet and are shown in a concentration-dependent manner ($n = 4$). (E) CPE scores (left) and TOX scores (right) of the negative, positive, and toxic controls calculated by CPETOXnet on images 3 days after infection at an MOI of 0.03 or with staurosporine ($5 \mu\text{M}$)-treated cells.

antibodies (bsAbs), which bind two independent epitopes on the same or different antigens (52). Early bsAbs were selective T cell engagers with a binding site for a tumor-associated antigen and CD3 from T cells. Currently, more than 100 anticancer bsAbs are in clinical development (53). Apart from targeting tumor cells, bsAbs can

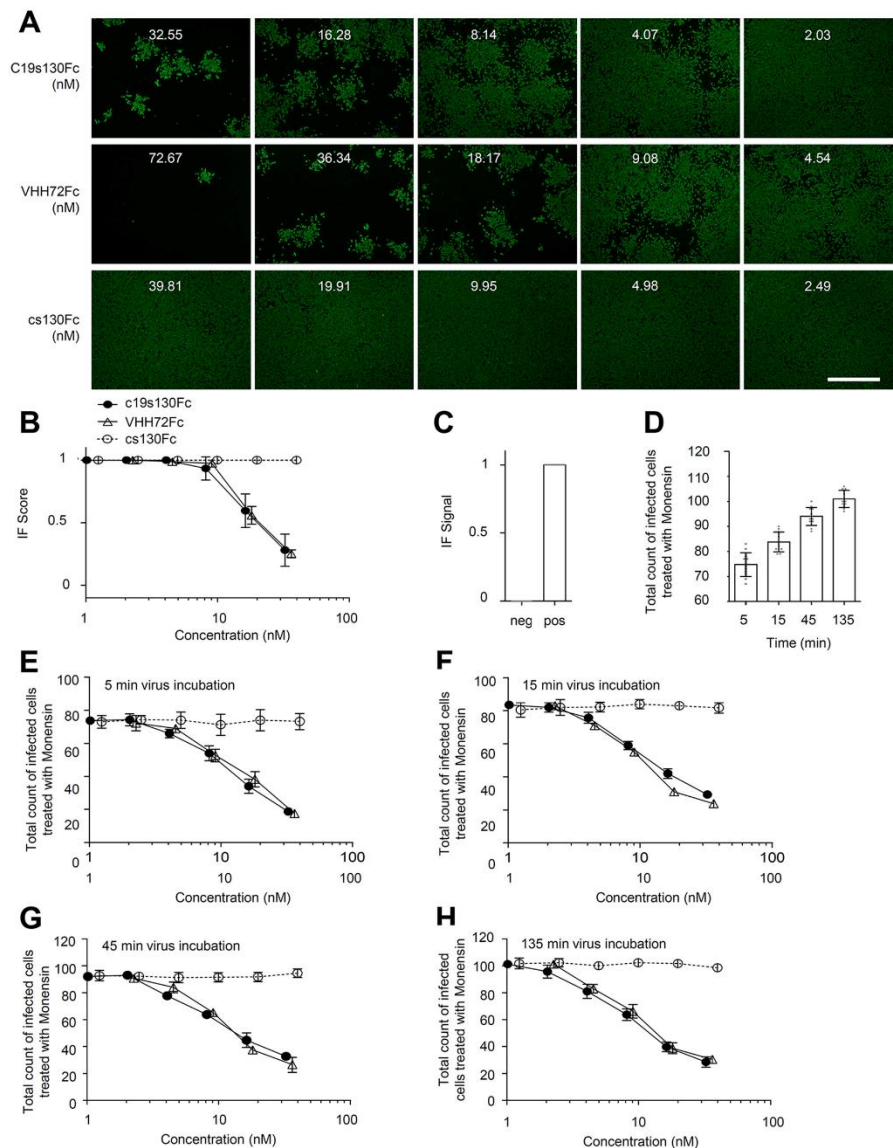


FIG 5 c19s130Fc inhibits SARS-CoV-2 infection of Vero cells. Vero cells were treated with the indicated concentrations of c19s130Fc, VHH72Fc, and cs130Fc; infected afterward with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.03; and stained with SARS-CoV-2 nucleocapsid antibodies 2 days after infection. (A) Representative fluorescence images ($n = 4$; bar = 1 mm). (B) IF scores were determined from fluorescence images from panel A using IFnet and are shown in a concentration-dependent manner ($n = 4$). (C) IF signals of the negative- and positive-control images calculated by IFnet ($n = 24$). (D to H) An entry assay was performed by adding monensin to the cells at different time points after infection. (D) Positive control ($n = 12$). (E to H) Results of stopping infection after 5 min (E), 15 min (F), 45 min (G), and 135 min (H), in a concentration-dependent manner ($n = 4$).

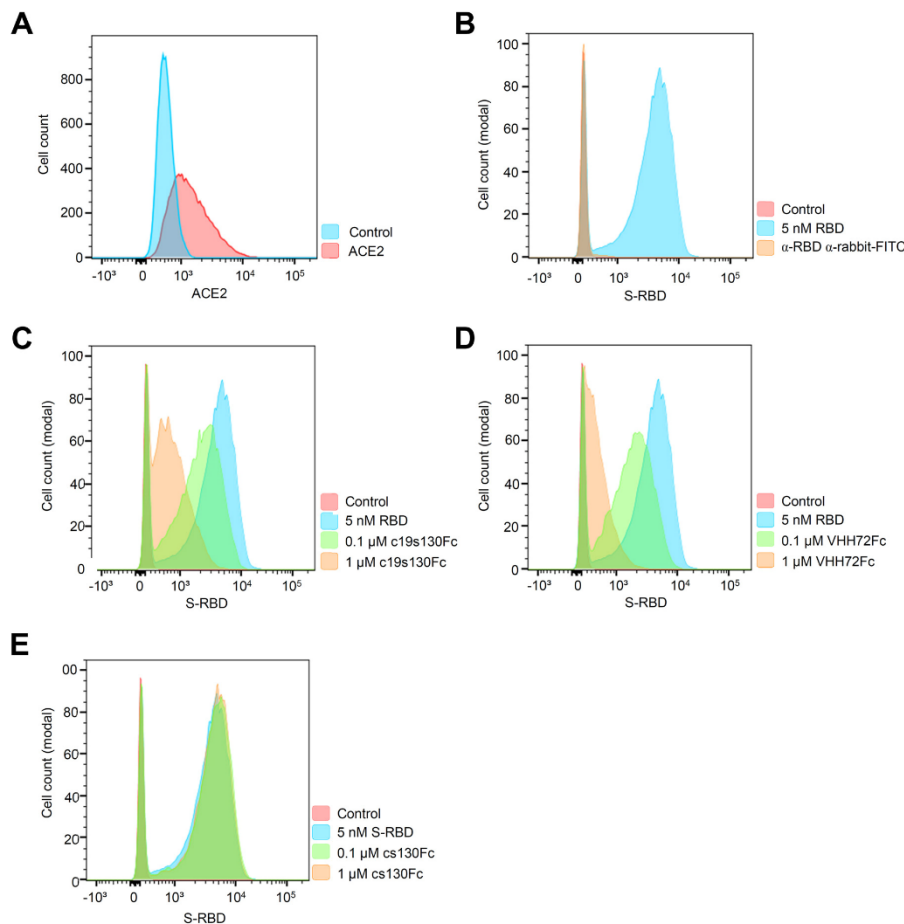


FIG 6 c19s130Fc prevents S-RBD binding to overexpressed ACE2 in Ba/F3 cells. (A) Flow cytometric analysis of cell surface expression of hACE2-gp130 (red population) in Ba/F3-gp130 cells detected by hACE2 antibody. The blue population indicates Ba/F3-gp130 cells incubated without hACE antibody (control). (B) Flow cytometric analysis of S-RBD binding to Ba/F3-ACE2 cells. Following incubation with S-RBD, S-RBD binding was detected (blue area) using an anti-spike S1 antibody (Sino Biological). Ba/F3-gp130-hACE2-gp130 cells without treatment served as controls (red area). (C to E) S-RBD binding in the presence of increasing concentrations of c19s130Fc, VHH72Fc, or cs130Fc. A total of 20,000 events were recorded, and the cell count was normalized. Histograms are representative of results from 3 independent experiments.

interfere with pathogen infection and ligand/receptor activity and mediate intracellular drug delivery, *cis*- and *trans*-activation, or serum half-life extension. With our development of c19s130Fc, we expand the class of bispecific binders by the first example of a bispecific soluble cytokine receptor. c19s130Fc has a complex architecture and consists of the first three extracellular domains, D1 to D3, of gp130, which facilitates binding to IL-6:sIL-6R complexes. Since we and others have previously shown that for unknown reasons, these domains alone facilitate only low-affinity binding (47), we have fused sgp130D1–D3 to the nonneutralizing but IL-6:sIL-6R-selective nanobody VHH6 and converted sgp130D1–D3 into the high-affinity IL-6 *trans*-signaling inhibitor cs130 (46). Of note and in contrast to sgp130, fusion to VHH6 also prevents the inhibition of IL-11

trans-signaling (46). Bispecificity toward SARS-CoV-2 was achieved by fusion to VHH72, an antagonistic nanobody directed against the RBD of the spike protein (44). However, the antagonistic activity of VHH72 unfolded only after dimerization; therefore, VHH72 was directly placed between the IL-6 *trans*-signaling inhibitor and the Fc part of an IgG antibody, which served as a dimerizer and aided in the purification of c19s130Fc. In the future, bifunctional inhibition might also be achieved using nanobodies against SARS-CoV-2 that do not depend on dimerization (54), thereby further reducing the size of the bifunctional *trans*-signaling/SARS-CoV-2 inhibitor.

IL-6 initiates signal transduction via three different modes, termed classic, *trans*-, and cluster signaling (13, 22, 55, 56). Remarkably, these different signaling modes are associated with different physiological responses. While classic signaling is attributed mainly to regenerative functions and the induction of acute-phase responses, IL-6 *trans*-signaling is associated with chronic inflammatory processes (25), and IL-6 cluster signaling is required for the generation of pathogenic TH17 cells and thereby is also involved in detrimental inflammatory processes (55). IL-6 is a predictor of severity in COVID-19 patients (57–59), and the IL-6R antibodies sarilumab and tocilizumab, which block all types of IL-6 signaling, increase the survival rates of severe COVID-19 patients and have been approved for therapy (9–11, 31). On the other hand, sgp130 and variants thereof are potent IL-6 *trans*-signaling inhibitors without affecting classic signaling (35). They also inhibit *trans*-presentation (cluster signaling), albeit results are heterogeneous, and blocking might be context dependent (22, 55). Still, therapeutic targeting of IL-6 largely relies on the two IL-6R antibodies, while siltuximab directed against IL-6 has been approved for Castleman's disease (60) and is currently being tested for COVID-19 patients (ClinicalTrials.gov identifier NCT04329650). The IL-6 *trans*-signaling inhibitor sgp130Fc (olamkicept) has recently shown remarkable results in phase II clinical studies for Crohn's disease and ulcerative colitis (UC) (EudraCT identifier 2016-000205-36; ClinicalTrials.gov identifier NCT03235752), and phase III trials are in preparation (61).

Several lines of evidence point to a crucial role of IL-6 *trans*-signaling and not classic signaling in the development of hyperinflammatory states in severe COVID-19 (6–12), including multiorgan damage and respiratory failure (4). High levels of soluble IL-6R were found in COVID-19 intensive care unit patients, which was released by the increased activity of ADAM17 (26). IL-6 *trans*-signaling is also required for liver regeneration (62), and recent evidence indicates a key role of excessive IL-6 *trans*-signaling during SARS-CoV-2-induced liver damage (63–65). Mechanistically, SARS-CoV-2-induced IL-6 *trans*-signaling increased procoagulants like factor VIII and Von Willebrand factor (vWF), proinflammatory factors, platelet attachment to liver sinusoidal endothelial cells, and hepatocyte fibrinogen expression and induces endotheliopathy and subsequent liver damage (64). This view is further supported by the finding that sgp130Fc blocks SARS-CoV-2-induced increases of blood clotting and liver injury factors (64). Thereby, one motivation to generate the bispecific c19s130Fc was based on the notion that selective inhibition of *trans*-signaling would be superior to the simultaneous blocking of classic and *trans*-signaling by IL-6R antibodies in severe COVID-19 cases.

Mechanistically, the application of tocilizumab and sarilumab results in the binding of the antibody to sIL-6R but also to cells expressing membrane-bound IL-6R, including hepatocytes and immune cells. The life cycle of SARS-CoV-2 starts with the binding of the viral spike protein to host ACE2, cleavage of the spike protein, membrane fusion, and RNA injection. Virus-cell fusion is dependent on the cleavage of the spike protein by TMPRSS2 at the plasma membrane or by cathepsin L in endosomes (66). An imaginable bifunctional antibody for IL-6R and SARS-CoV-2 could be risky because it might bypass natural virus infection via a redirection of antibody-SARS-CoV-2 complexes to IL-6R-expressing cells. In this scenario, the spike protein in large IL-6R (target cell)-antibody-spike protein (SARS-CoV-2) complexes might still be processed by TMPRSS2 or cathepsin L to enable unintended drug-induced virus infection. Here, the virus-targeting antibody part would prevent the binding of the spike protein to ACE2 but not

the binding and infection of IL-6R-expressing cells. To bypass this possibility, we opt for the *trans*-signaling inhibitor c19s130Fc. After binding to c19s130Fc, IL-6:sIL-6R complexes are still soluble, and unintended viral entries via membrane-bound IL-6R targeting are impossible and were not seen in our experiments using c19s130Fc during SARS-CoV-2 infection of Vero cells.

Taken together, c19s130Fc demonstrates the first example of the multifunctionalization of a *trans*-signaling inhibitor and thereby represents the first member of a new class of bispecific inhibitor molecules consisting of a soluble cytokine receptor fused to antiviral nanobodies.

Antiviral antibodies are effective only very early in COVID-19 disease progression (67). In later stages of severe COVID-19, patients develop a hyperinflammatory state, which is associated with multiorgan damage and respiratory failure (4). In this stage of the disease, antiviral antibodies seem to no longer be effective. Immunomodulatory treatments, including IL-6 blockade, were described to increase survival rates and decrease the need for mechanical oxygenation in later stages of the disease (9, 31, 58, 68, 69). Combined treatment using glucocorticoids and IL-6 blockade increased the observed positive effects (31). However, evidence suggests that immunomodulatory treatment, including glucocorticoid and anti-IL-6 treatments, while reducing hyperinflammation, may delay viral clearance (32, 70–72). Hence, immunomodulatory treatments may be a double-edged sword in the treatment of COVID-19 and may benefit from simultaneous antiviral treatment (73–75). In fact, there is evidence for the beneficial effects of combined antiviral and immunomodulatory treatments for SARS-CoV-2, hepatitis B, and influenza infections (76–80).

Here, we describe a bispecific molecule that incorporates antiviral and immunomodulatory entities. Such a bifunctional molecule may reduce viral infection in early-stage infections as well as reduce hyperinflammation observed in late-stage infections. In addition, bispecific inhibitors like c19s130Fc may also be useful during the transition state from early to late stages of COVID-19.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of c19s130Fc variants. The cDNAs encoding the single-domain antibody VHH72 (44), residues 1 to 615 of ACE2 (GenBank accession number [Q9BYF1](#)), and residues 319 to 591 of the SARS-CoV-2 RBD (GenBank accession number [P0DTC2](#)) were synthesized by Biotac (Heidelberg, Germany). VHH72 was subcloned via AgeI and NotI into the plasmid pcDNA3.1-Fc (Invitrogen) coding for an N-terminal signal peptide, a Myc tag (EQKLISEEDL), and a C-terminal human IgG1 Fc tag, thereby generating expression plasmid pcDNA3.1-VHH72Fc. c19s130Fc was cloned from pcDNA3.1-cs130Fc (46) by the insertion of a cDNA coding for VHH6-(GGGS)₃-VHH72 via XhoI and NotI. ACE2 was amplified by PCR using forward primer 5'-AGTCCTTAAGCCACCATGTCAAGCTCTCCTGGC-3' and reverse primer 5'-TGCGTATGCGGCCGCGTCTGCATATGGACTCCAG-3' and subcloned into pcDNA3.1-Fc via AflIII and NotI to generate pcDNA3.1-ACE2-Fc. The pcDNA3.1-RBD-TwinStrep expression vector was cloned via HindIII and NotI out of the cDNA encoding residues 319 to 591 of the SARS-CoV-2 RBD to extend the sequence with a TwinStrep tag (WSPQFEK) connected with a (GGGS)₃ linker. HIL-6 was subcloned via HindIII and NotI into the pcDNA3.1 vector containing an N-terminal signal peptide and a C-terminal TwinStrep tag, thereby generating pcDNA3.1-HIL-6-TS (twin Strep-tag) for expression. An analogous cloning strategy was used to generate the expression vector for IL-6-TS.

Cells and reagents. The generation of Ba/F3-gp130 cells was described previously (81). For seeding and cultivation of Vero cells, cells were first washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated in the presence of a trypsin-EDTA solution (catalog number 4261.0110; Genaxxon Bioscience) until cells were detached. Cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high-glucose culture medium (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies), 60 mg/L penicillin, and 100 mg/L streptomycin (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Germany) at 37°C with 5% CO₂. The proliferation of Ba/F3-gp130 cells was maintained in the presence of HIL-6 (49). Ba/F3-gp130 cells were retrovirally transduced with a pMOWS expression plasmid coding for hACE2-gp130 composed of coding sequences for the ACE2 signal peptide (amino acids [aa] 1 to 17) followed by ACE2 (aa 18 to 615) and human gp130 (GenBank accession number [P40189](#)) comprising amino acids T607 to Q908, representing 13 aa of the extracellular domain (ECD), the complete transmembrane domain (TMD), and the intracellular domain (ICD) of the receptor. Selection of transduced Ba/F3-gp130 cells was performed with puromycin (1.5 µg/mL) (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for at least 2 weeks. Afterward, the generated Ba/F3-gp130 cell line was analyzed for receptor cell surface expression via flow cytometry. sIL-6R was obtained from Conaris Research Institute AG (Kiel, Germany). cs130Fc was produced and purified as described previously (46, 62). Expi-293F cells (Thermo Fisher Scientific) were cultured in 30 mL Expi293 expression medium without antibiotics until they reached a density of

3×10^6 to 5×10^6 cells/mL in a 37°C incubator with 8% CO₂ on an orbital shaker at 125 rpm. The Expi293-F cells were cultured in a shaker flask until they reached a density of 3×10^6 to 5×10^6 cells/mL. Antibodies directed against STAT3 phosphorylated at Tyr705 (clone D3A7) and STAT3 (clone 124H6) were obtained from Cell Signaling Technology (Frankfurt, Germany). StrepMAP-Classical-HRP (horseradish peroxidase) (1:20,000) (catalog number 2-1509-001) was obtained from IBA GmbH (Göttingen, Germany). Peroxidase-conjugated secondary Abs (catalog numbers 31432, 31462, and 31423) were obtained from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Antibodies directed against phosphorylated ERK (pERK) (catalog number 4370) and ERK (catalog number 4695) were obtained from Cell Signaling Technology.

Proliferation assays. Ba/F3-gp130 cells were washed, and 5,000 cells were cultured for 3 days in a final volume of 100 μ L in the presence of cytokines and inhibitors. The CellTiter-Blue reagent was used to determine cellular viability by recording the fluorescence (excitation 560 nm and emission 590 nm) using an Infinite M200 Pro plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) immediately after the addition of 20 μ L of the reagent per well (time point zero) and up to 120 min thereafter.

Cytokine stimulation of cells and lysate preparation. A total of 10^6 Ba/F3-gp130 cells/mL were washed and starved in serum-free medium for 5 h. Vero cells were seeded at a density of 8×10^5 cells per 60-mm dish 24 h prior to stimulation and also washed five times with PBS before starvation in serum-free DMEM for at least 5 h. Prior to stimulation, cytokines and inhibitors were preincubated at room temperature for 30 min. Subsequently, cells were stimulated with the indicated cytokines and inhibitor combinations for 30 min, harvested by centrifugation at 4°C for 5 min at $500 \times g$, frozen, and lysed. The protein concentration of the cell lysates was determined by the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Thermo Scientific). Analysis of STAT3 activation was performed by Western blotting of 25 to 75 μ g of total protein from total cell lysates and subsequent detection steps using the anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:1,000) and anti-STAT3 (1:1,000) antibodies described above.

Western blotting. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes for 60 min (20 V, 1.0 Å). Membranes were blocked and probed with the indicated primary antibodies. After washing, the membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies or fluorescence-labeled secondary antibodies (1:2,500 dilution). Immobilon Western reagents (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and the ChemoCam imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany) or the Odyssey Fc imaging system (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, Germany) were used for signal detection. Control STAT3 blots were produced on separate membranes.

Expression and purification of VHH72Fc, c19s130Fc, the RBD, and ACE2Fc. Mammalian expression plasmids encoding VHH72Fc, c19s130Fc, the SARS-CoV-2 RBD, and ACE2Fc were transfected into Expi-293F cells using ExpiFectamine. After reaching 4.5×10^6 to 5.5×10^6 cells/mL, the cells were diluted to a final density of 3×10^6 cells/mL in 30 mL Expi293 expression medium for transfection. Thirty micrograms of the plasmid expression vectors was used for transfection. Thereafter, the culture was harvested by centrifugation at $450 \times g$ at 4°C for 10 min, followed by centrifugation of the resulting supernatant at $4,000 \times g$ at 4°C for 20 min. The supernatant from the second centrifugation step was filtered (0.45- μ m filter, catalog number P667.1; Carl Roth) and purified by affinity chromatography. Constructs containing an Fc tag (c19s130Fc, VHH72Fc, and ACE2Fc) were purified using protein A resin (1 mL) (HiTrap MabSelect PrismA) at a flow rate of 1 mL/min. The column was then washed with 30 column volumes of PBS. Proteins were eluted at pH 3.2 to 3.5 using 50 mM citric acid buffer. Fractions containing the protein peak were pooled, and the pH was adjusted to pH 7 with 1 M Tris. Constructs containing a C-terminal TwinStrep tag (SARS-CoV-2 RBD) were purified using Strep-Tactin resin (catalog number 2-5025-001; IBA) according to the manufacturer's instructions. Proteins were buffer exchanged to PBS using illustra NAP25 columns (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany). The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm, and samples were flash-frozen in liquid nitrogen. A total of 2.5 μ g of protein was loaded per lane and separated by SDS-PAGE under reducing (106 mM β -mercaptoethanol at 95°C for 10 min) and nonreducing (without β -mercaptoethanol and heating) conditions. The gel was stained with Coomassie staining solution (80% ethanol, 20% acetic acid, 4% Coomassie brilliant blue R250) for 1 h and destained overnight in a destaining solution (20% ethanol, 10% acetic acid).

Surface plasmon resonance. For surface plasmon resonance experiments, the Biacore X100 instrument (GE Healthcare Life Sciences) was used. VHH72Fc or c19s130Fc was captured on a single flow cell of a protein A sensorchip at a level of ~300 or 650 response units (RU), respectively, per cycle. Three samples containing only running buffer were injected over both the ligand and reference flow cells, followed by S-RBD serially diluted from 500 to 3.9 nM, with a replicate of the 125 nM concentration. The analyte S-RBD was injected at a flow rate of 30 μ L/min for 120 s, and dissociation was measured for 300 s. ACE2 was immobilized in 10 mM acetate buffer (pH 4.5) by amine coupling on a CM5 chip (2,500 RU). After immobilization, S-RBD was injected at a flow rate of 30 μ L/min at increasing concentrations (2 to 250 nM). Association was monitored in periods of 60 s, and dissociation was measured for 600 s. Immobilized ACE2 was regenerated with 2 M NaCl to remove bound S-RBD in multiple cycle measurements. ACE2 was immobilized on a CM5 chip, and 125 nM S-RBD was injected in the presence of increasing concentrations of c19s130Fc. Experiments were carried out at 25°C in PBS (pH 7.4), composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO₄²⁻ and H₂PO₄, and 0.05% (vol/vol) surfactant P20 (GE Healthcare). The resulting data were reference subtracted and fit to a 1:1 binding model using Biacore X100 Evaluation software V2.0.1.

Viruses. SARS-CoV-2 was used as described previously (51) (sequence accession number EPI_ISL_425126; <https://www.gisaid.org/>). A SARS-CoV-2 stock was obtained in Vero cells by infection at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001. After 72 h, the supernatant was collected and stored at -80°C until use.

SARS-CoV-2 infection of Vero cells. Vero cells were cultured as previously described (51). Vero cells were cultured in DMEM with the addition of 10% fetal calf serum (FCS), minimal essential amino acids, and penicillin/streptomycin at 37°C with 5% CO₂. A total of 3×10^4 cells were seeded per well in a 96-well plate 1 day before infection. On the next day, the medium was changed to cell culture medium containing different dilutions of c19s130Fc, VHH72Fc, and c130Fc dissolved in PBS and staurosporine (5 μ M) as a toxic control. Moreover, 6 or 12 serial 2-fold dilutions were used. The cells were infected with SARS-CoV-2 20 min later at an MOI of 0.03. For the entry assay, monensin was added to the wells 5, 15, 45, and 135 min after infection to stop the further entry of SARS-CoV-2 into the cells. An overlay composed of DMEM with 1% methylcellulose was added at 2 h postinfection. The IC₅₀ was measured using GraphPad Prism.

Immunofluorescence. Two days after infection, the supernatant was discarded, and 4% formalin was added for 30 min. Hanks' buffer containing Triton X-100 was applied to the cells for 20 min followed by 10% FCS in PBS for 1 h to block unspecific binding sites. The cells were stained with a SARS-CoV-2 nucleocapsid antibody (2019 novel coronavirus [nCoV]) (Sino Biology Inc., Eschborn, Germany) for 1 h. Following washing, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG(H+L) (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) was added for 1 h. The cells were washed again and analyzed with a Nikon Eclipse TS100 fluorescence microscope. Pictures were taken with NIS-Elements F4.30.01 software. The images were quantified using deep transfer learning as previously described (51). ResNet18 was pretrained to classify SARS-CoV-2-infected cell cultures. For recognizing CPE and toxic effects (TOX), we used CPETOXnet with three different classifications (CPE, TOX, and no CPE). For the quantification of SARS-CoV-2 immunofluorescence pictures, we used IFnet with two different classifications (IF signal and no signal) (51).

Cell surface detection via flow cytometry. hACE2-gp130 cell surface expression of stably transfected Ba/F3-gp130 cells was detected by specific antibodies. A total of 5×10^5 cells were washed in fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer (PBS, 1% bovine serum albumin [BSA]) and then incubated in 50 μ L containing the indicated primary antibody (anti-hACE2, catalog number AF933; Bio-Techne) (1:80) for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 50 μ L containing the secondary antibody (Northern Light 495-conjugated Fab anti-goat IgG, catalog number NL003; Bio-Techne) (1:100) and incubated for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 500 μ L of FACS buffer. A total of 20,000 cells were recorded and analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software; BD Biosciences). Data analysis was conducted using FlowJo version 10 (Tree Star Inc., USA).

Flow cytometry inhibition experiments were conducted with 5×10^5 Ba/F3-gp130-hACE2-gp130 cells in the presence of 5 nM S-RBD, inhibitory proteins, and the primary antibody (antispice, catalog number 40150-R007; Sino Biological) (1:50) for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 50 μ L containing a secondary antibody directed against antispice-IgG (anti-rabbit-Alexa Fluor 488; Cell Signaling Technology) (1:250) for 1 h at room temperature. Afterward, cells were treated as described above.

Molecular modeling. For molecular modeling, the structure of the IL-6 signaling complex (PDB accession number 1P9M) was superpositioned with the structure of VHH6 bound to a complex of IL-6: sIL-6R (PDB accession number 5FUC). In addition, the structure of VHH72 bound to S-RBD (PDB accession number 6WAQ) was superpositioned onto the structure of trimeric S-RBD in an open conformation (PDB accession number 7CAC). Components of the c19s130Fc protein are depicted in a ribbon representation, and the IL-6 signal complex and S-RBD are depicted in a surface representation using ChimeraX (82).

Statistical analyses. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis in GraphPad Prism 6.1 (version 6.1 for Windows; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) from 3 individual experiments. The data are presented as means $\pm$ standard deviations (SD).

Data availability. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the DFG (SFB974 and RTG1949), the Jürgen Manchot Graduate School (MOI), and the Stiftung für Altersforschung, Düsseldorf.

J.E. and J.W. conducted most of the experiments. J.E. and J.M.M. performed the SPR experiments. H.T.W. supported protein purification and SPR experiments. J.W. and P.A.L. planned and performed virus infection experiments, E.M. and R.S. supported viral entry assays. All authors helped write the paper. J.S., J.M.M., and P.A.L. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

J.E., J.W., P.A.L., J.S., and J.M.M. have applied for a patent covering c19s130Fc (EP 21189174.2). J.M.M. acts as a consultant for Ferring Pharmaceuticals.

REFERENCES

- Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, Su X, Cao B. 2020. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet* 395:1517–1520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X).
- Wunsch H. 2020. Mechanical ventilation in COVID-19: interpreting the current epidemiology. *Am J Respir Crit Care Med* 202:1–4. <https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1385ED>.
- Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, Cochran KB, Walsh SP, Meyerowitz-Katz G. 2020. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur J Epidemiol* 35:1123–1138. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00698-1>.
- Bryce C, Grimes Z, Pujadas E, Ahuja S, Beasley MB, Albrecht R, Hernandez T, Stock A, Zhao Z, AlRasheed MR, Chen J, Li L, Wang D, Corben A, Haines

- GK, III, Westra WH, Umphlett M, Gordon RE, Reidy J, Petersen B, Salem F, Fiel MJ, El Jamal SM, Tsankova NM, Houldsworth J, Mussa Z, Veremis B, Sordillo E, Gitman MR, Nowak M, Brody R, Harpaz N, Merad M, Gnjatic S, Liu W-C, Schotsaert M, Miorin L, Aydllo Gomez TA, Ramos-Lopez J, Garcia-Sastre A, Donnelly R, Seigler P, Keys C, Cameron J, Moultrie J, Washington K-L, Treatman J, Sebra R, Jiang J, Firpo A, et al. 2021. Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. *Mod Pathol* 34:1456–1467. <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00793-y>.
5. England JT, Abdulla A, Biggs CM, Lee AYY, Hay KA, Hoiland RL, Wellington CL, Sekhon M, Jamal S, Shojania K, Chen LYC. 2021. Weathering the COVID-19 storm: lessons from hematologic cytokine syndromes. *Blood Rev* 45:100707. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100707>.
 6. Xu Z-S, Shu T, Kang L, Wu D, Zhou X, Liao B-W, Sun X-L, Zhou X, Wang Y-Y. 2020. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther* 5:100. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0211-1>.
 7. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwedebel T-A, Merklings SH, Treluyer J-M, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux P-L, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. 2020. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369:718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>.
 8. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
 9. Guaraldi G, Meschiari M, Cozzi-Lepri A, Milic J, Tonelli R, Menozzi M, Franceschini E, Cuomo G, Orlando G, Borghi V, Santoro A, Di Gaetano M, Puziolante C, Carli F, Bedini A, Corradi L, Fantini R, Castaniere I, Tabbi L, Girardis M, Tedeschi S, Giannella M, Bartoletti M, Pascale R, Dolci G, Brugnoli M, Pietrangeli A, Cossarizza A, Pea F, Cini E, Salvarani C, Massari M, Viale PL, Mussini C. 2020. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol* 2:e474–e484. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30173-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30173-9).
 10. Jordan SC, Zakowski P, Tran HP, Smith EA, Gaultier C, Marks G, Zabner R, Lowenstein H, Off J, Bluen B, Le C, Shane R, Ammerman N, Vo A, Chen P, Kumar S, Toyoda M, Ge S, Huang E. 2020. Compassionate use of tocilizumab for treatment of SARS-CoV-2 pneumonia. *Clin Infect Dis* 71:3168–3173. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa812>.
 11. Melevedou KS, Miskovsky J, Meharg J, Abdelrahman A, Tandon R, Moody AE, Dasilva P, Masse G, LaPorte J, Saied Calvino A, Allen G, El-Bizri R, Roberts T, Armenio V, Katz SC. 2020. Tocilizumab for severe COVID-19 related illness—a community academic medical center experience. *Cytokine X* 2:100035. <https://doi.org/10.1016/j.cytocx.2020.100035>.
 12. Chen LYC, Biggs CM, Jamal S, Stukas S, Wellington CL, Sekhon MS. 2021. Soluble interleukin-6 receptor in the COVID-19 cytokine storm syndrome. *Cell Rep Med* 2:100269. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100269>.
 13. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. 2014. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol* 26:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.11.002>.
 14. Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen K-J, Rose-John S. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829–38839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210584200>.
 15. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Mühlberg J. 2000. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* 267:2624–2631. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01278.x>.
 16. Mühlberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 23:473–480. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230226>.
 17. Jones SA. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463–3468. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3463>.
 18. Gaillard J, Pugnieri M, Tresca J, Mani J, Klein B, Brochier J. 1999. Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum. *Eur Cytokine Netw* 10:337–344.
 19. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K, Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K. 1995. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 36:45–49. <https://doi.org/10.1136/gut.36.1.45>.
 20. Montero-Julian FA. 2001. The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:583–597.
 21. Akira S, Taga T, Kishimoto T. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1–78. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60532-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60532-5).
 22. Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Akbarzadeh M, Lamertz L, Huber HJ, Ahmadian MR, Moll JM, Scheller J. 2018. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6/sIL-6Rsgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem* 293:6762–6775. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001163>.
 23. Schumacher N, Rose-John S. 2019. ADAM17 activity and IL-6 trans-signaling in inflammation and cancer. *Cancers (Basel)* 11:1736. <https://doi.org/10.3390/cancers11111736>.
 24. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2016. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* 8:959–970. <https://doi.org/10.2217/mt-2016-0020>.
 25. Rose-John S. 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 8:1237–1247. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4989>.
 26. Patra T, Meyer K, Geerling L, Isbell TS, Hoft DF, Brien J, Pinto AK, Ray RB, Ray R. 2020. SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog* 16:e1009128. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009128>.
 27. Nishimoto N, Kishimoto T. 2008. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol* 2008:151–160. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_7.
 28. Boyce EG, Rogan EL, Vyas D, Prasad N, Mai Y. 2018. Sarilumab: review of a second IL-6 receptor antagonist indicated for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother* 52:780–791. <https://doi.org/10.1177/1060028018761599>.
 29. Rossi J-F, Nègrier S, James ND, Kocak I, Hawkins R, Davis H, Prabhakar U, Qin X, Mulders P, Berns B. 2010. A phase I/II study of siltuximab (CNO 328), an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in metastatic renal cell cancer. *Br J Cancer* 103:1154–1162. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605872>.
 30. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2019. Targeting interleukin-6 signaling in clinic. *Immunology* 50:1007–1023. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>.
 31. Gordon AC, Angus DC, Derde LPG. 2021. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with Covid-19. *N Engl J Med* 385:1147–1149. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2108482>.
 32. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368:339–342. <https://doi.org/10.1038/368339a0>.
 33. Geng Z, Yu Y, Hu S, Dong L, Ye C. 2019. Tocilizumab and the risk of respiratory adverse events in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Exp Rheumatol* 37:318–323.
 34. Pawar A, Desai RJ, Solomon DH, Santiago Ortiz AJ, Gale S, Bao M, Sarsour K, Schneeweiss S, Kim SC. 2019. Risk of serious infections in tocilizumab versus other biologic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a multi-database cohort study. *Ann Rheum Dis* 78:456–464. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214367>.
 35. Jostock T, Mühlberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 268:160–167. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x>.
 36. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg R-P, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seeger D, Krettek C, Waetzig GH. 2011. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med* 39:1407–1413. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318211ff56>.
 37. Hoge J, Yan I, Jänner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrücker H-W. 2013. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol* 190:703–711. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201044>.
 38. Sodenkamp J, Waetzig GH, Scheller J, Seeger D, Grötzing J, Rose-John S, Ehlers S, Hölscher C. 2012. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. *Immunobiology* 217:996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.01.015>.
 39. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. 2005. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309:1864–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>.

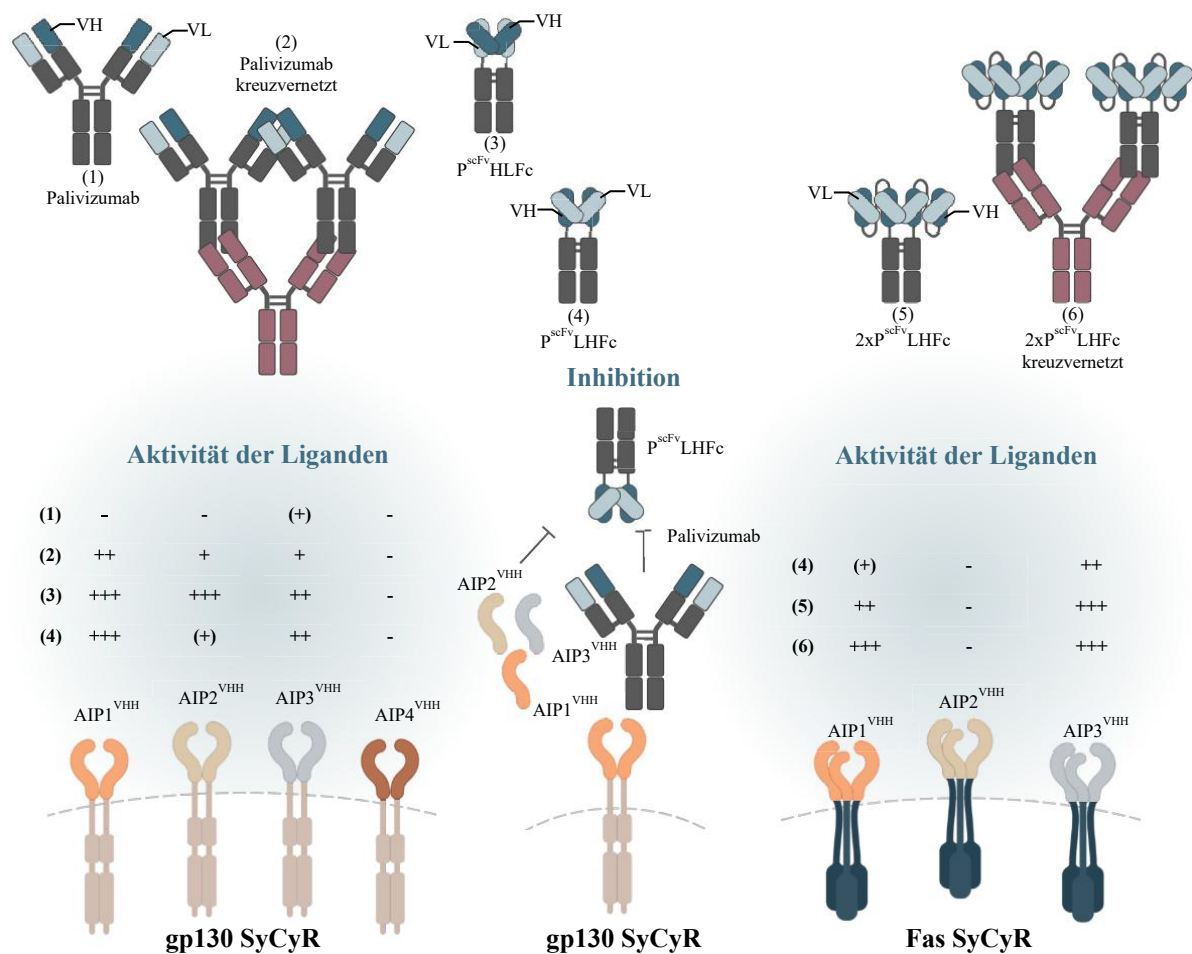
40. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. 2020. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581: 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>.
41. Kyriakidis NC, Lopez-Cortes A, Gonzalez EV, Grimaldos AB, Prado EO. 2021. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines* 6:28. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>.
42. Bhattacharjee A, Saha M, Halder A, Debnath A, Mukherjee O. 2021. Therapeutics and vaccines: strengthening our fight against the global pandemic COVID-19. *Curr Microbiol* 78:435–448. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02310-x>.
43. Deb P, Molla MMA, Saif-Ur-Rahman KM. 2021. An update to monoclonal antibody as therapeutic option against COVID-19. *Biosaf Health* 3:87–91. <https://doi.org/10.1016/j.bshealth.2021.02.001>.
44. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, Roese K, van Schie L, VIB-CMB COVID-19 Response Team, Hoffmann M, Pöhlmann S, Graham BS, Callewaert N, Schepens B, Saelens X, McLellan JS. 2020. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell* 181:1004–1015.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.031>.
45. Lu Q, Zhang Z, Li H, Zhong K, Zhao Q, Wang Z, Wu Z, Yang D, Sun S, Yang N, Zheng M, Chen Q, Long C, Guo W, Yang H, Nie C, Tong A. 2021. Development of multivalent nanobodies blocking SARS-CoV-2 infection by targeting RBD of spike protein. *J Nanobiotechnology* 19:33. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00768-w>.
46. Heise D, Derrac Soria A, Hansen S, Dambietz C, Akbarzadeh M, Berg AF, Waetzig GH, Jones SA, Dvorsky R, Ahmadian MR, Scheller J, Moll JM. 2021. Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion. *Sci Signal* 14: eabc3480. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc3480>.
47. Sommer J, Garbers C, Wolf J, Trad A, Moll JM, Sack M, Fischer R, Grötzinger J, Waetzig GH, Floss DM, Scheller J. 2014. Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor gp130-E10. *J Biol Chem* 289:22140–22150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.560938>.
48. Adams R, Burnley RJ, Valenzano CR, Qureshi O, Doyle C, Lumb S, Del Carmen Lopez M, Griffin R, McMillan D, Taylor RD, Meier C, Mori P, Griffin LM, Wernery U, Kinne J, Rapecki S, Baker TS, Lawson ADG, Wright M, Ettore A. 2017. Discovery of a functional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling. *Sci Rep* 7:37716. <https://doi.org/10.1038/srep37716>.
49. Fischer M, Goldschmidt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. 1997. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 15:142–145. <https://doi.org/10.1038/nbt0297-142>.
50. Rosa RB, Dantas WM, do Nascimento JCF, da Silva MV, de Oliveira RN, Pena LJ. 2021. In vitro and in vivo models for studying SARS-CoV-2, the etiological agent responsible for COVID-19 pandemic. *Viruses* 13:379. <https://doi.org/10.3390/v13030379>.
51. Werner J, Kronberg RM, Stachura P, Ostermann PN, Müller L, Schaal H, Bhatia S, Kather JN, Borkhardt A, Pandya AA, Lang KS, Lang PA. 2021. Deep transfer learning approach for automatic recognition of drug toxicity and inhibition of SARS-CoV-2. *Viruses* 13:610. <https://doi.org/10.3390/v13040610>.
52. Brinkmann U, Kontermann R. 2021. Bispecific antibodies. *Science* 372: 916–917. <https://doi.org/10.1126/science.abg1209>.
53. Labrijn A, Janmaat M, Reichert J, Parren P. 2019. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov* 18:585–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>.
54. Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, Taxer W, Rymarenko O, Schünemann J, Dienemann C, Gunkel P, Mussil B, Krull J, Teichmann U, Groß U, Cordes VC, Döbelstein M, Görlich D. 2021. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *EMBO J* 40:e107985. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021107985>.
55. Heink S, Yogeve N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, Husterer V, Croxford AL, Möller-Hackbarth K, Bartsch HS, Sotlar K, Krebs S, Regen T, Blum H, Hemmer B, Misgeld T, Wunderlich TF, Hidalgo J, Oukka M, Rose-John S, Schmidt-Suppran M, Waisman A, Korn T. 2017. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 18:74–85. <https://doi.org/10.1038/ni.3632>.
56. Lamertz L, Rummel F, Polz R, Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Moll JM, Floss DM, Scheller J. 2018. Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Sci Signal* 11:eaar7388. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar7388>.
57. Dhar SK, K V, Damodar S, Gujar S, Das M. 2021. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon* 7:e06155. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06155>.
58. Galván-Román JM, Rodríguez-García SC, Roy-Valejo E, Marcos-Jiménez A, Sánchez-Alonso S, Fernández-Díaz C, Alcaraz-Serna A, Mateu-Albero T, Rodríguez-Cortes P, Sánchez-Cerrillo I, Esparcia L, Martínez-Fleta P, López-Sanz C, Gabriele L, del Campo Guerola L, Suárez-Fernández C, Ancochea J, Canabal A, Albert P, Rodríguez-Serrano DA, Aguilar JM, del Arco C, de Los Santos I, García-Fraile L, de la Cámara R, Serra JM, Ramírez E, Alonso T, Landete P, Soriano JB, Martín-Gayo E, Fraile Torres A, Zurita Cruz ND, García-Vicuña R, Cardeñoso L, Sánchez-Madrid F, Alfaraña A, Muñoz-Calleja C, González-Álvarez I, REINMUN-COVID Group. 2021. IL-6 serum levels predict severity and response to tocilizumab in COVID-19: an observational study. *J Allergy Clin Immunol* 147:72–80.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.09.018>.
59. Sabaka P, Koščálová A, Straka I, Hodosy J, Lipták R, Kmotorková B, Kachlíková M, Kušnírová A. 2021. Role of interleukin 6 as a predictive factor for a severe course of Covid-19: retrospective data analysis of patients from a long-term care facility during Covid-19 outbreak. *BMC Infect Dis* 21:308. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05945-8>.
60. Choy E, De Benedetti F, Takeuchi T, Hashizume M, John M, Kishimoto T. 2020. Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat Rev Rheumatol* 16:335–345. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0419-z>.
61. Schreiber S, Aden K, Bernardes JP, Conrad C, Tran F, Höper H, Volk V, Mishra N, Blase JI, Nikolaus S, Bethge J, Kühnbacher T, Röcken C, Chen M, Cottingham I, Petri N, Rasmussen BB, Lokau J, Lenk L, Garbers C, Feuerhake F, Rose-John S, Waetzig GH, Rosenstiel P. 2021. Therapeutic interleukin 6 trans-signaling inhibition by olamicept (sgp130Fc) in patients with active inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 160:2354–2366. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.062>.
62. Fazel Modares N, Polz R, Haghighi F, Lamertz L, Behnke K, Zhuang Y, Kordes C, Häussinger D, Sorg UR, Pfeffer K, Floss DM, Moll JM, Piekorz RP, Ahmadian MR, Lang PA, Scheller J. 2019. IL-6 trans-signaling controls liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 70:2075–2091. <https://doi.org/10.1002/hep.30774>.
63. Effenberger M, Grander C, Grabherr F, Griesmacher A, Pioner T, Hartig F, Bellmann-Weiler R, Joannidis M, Zoller H, Weiss G, Adolph TE, Tilg H. 2021. Systemic inflammation as fuel for acute liver injury in COVID-19. *Dig Liver Dis* 53:158–165. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.08.004>.
64. McConnell MJ, Kawaguchi N, Kondo R, Sonzogni A, Licini L, Valle C, Bonaffini PA, Sironi S, Alessio MG, Previtali G, Seghezzi M, Zhang X, Lee AI, Pine AB, Chun HJ, Zhang X, Fernandez-Hernando C, Qing H, Wang A, Price C, Sun Z, Utsumi T, Hwa J, Strazzabosco M, Iwakiri Y. 2021. Liver injury in COVID-19 and IL-6 trans-signaling-induced endotheliopathy. *J Hepatol* 75:647–658. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.04.050>.
65. Kang S, Tanaka T, Inoue H, Ono C, Hashimoto S, Kioi Y, Matsumoto H, Matsura H, Matsubara T, Shimizu K, Ogura H, Matsura Y, Kishimoto T. 2020. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:22351–22356. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010229117>.
66. Scudellari M. 2021. How the coronavirus infects cells—and why Delta is so dangerous. *Nature* 595:640–644. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02039-y>.
67. Siemieniuk RA, Bartoszko JJ, Díaz Martínez JP, Kum E, Qasim A, Zeraatkar D, Izcovich A, Mangala S, Ge L, Han MA, Agoritsas T, Arnold D, Avila C, Chu DK, Couban R, Cusano E, Darzi AJ, Devji T, Foroutan F, Ghadimi M, Khamis A, Lamontagne F, Loeb M, Miroshnichenko A, Motaghi S, Murthy S, Mustafa RA, Rada G, Rochwerf B, Switzer C, Vandvik PO, Vermoortel RW, Wang Y, Yao L, Guyatt GH, Brignardello-Petersen R. 2021. Antibody and cellular therapies for treatment of covid-19: a living systematic review and network meta-analysis. *BMJ* 374:n2231. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2231>.
68. Gupta S, Wang W, Hayek SS, Chan L, Mathews KS, Melamed ML, Brenner SK, Leonberg-Yoo A, Schenck EJ, Radbel J, Reiser J, Bansal A, Srivastava A, Zhou Y, Finkel D, Green A, Mallappallil M, Faugno AJ, Zhang J, Velez JCQ, Shaefi S, Parikh CR, Charytan DM, Athavale AM, Friedman AN, Redfern RE, Short SAP, Correa S, Pokharel KK, Admon AJ, Donnelly JP, Gershengorn HB, Douin DJ, Semler MW, Hernán MA, Leaf DE, STOP-COVID Investigators. 2021. Association between early treatment with tocilizumab and mortality among critically ill patients with COVID-19. *JAMA Intern Med* 181:41–51. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6252>.
69. Hashimoto S, Yoshizaki K, Uno K, Kitajima H, Arai T, Tamura Y, Morishita H, Matsuoka H, Han Y, Minamoto S, Hirashima T, Yamada T, Kashiwa Y, Kameda M, Yamaguchi S, Tsuchihashi Y, Iwashashi M, Nakayama E, Shioda

- T, Nagai T, Tanaka T. 2021. Prompt reduction in CRP, IL-6, IFN-gamma, IP-10, and MCP-1 and a relatively low basal ratio of ferritin/CRP is possibly associated with the efficacy of tocilizumab monotherapy in severely to critically ill patients with COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 8:734838. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.734838>.
70. Li J, Liao X, Zhou Y, Wang L, Yang H, Zhang W, Zhang Z, Kang Y. 2021. Association between glucocorticoids treatment and viral clearance delay in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 21:1063. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06548-z>.
71. Russell CD, Millar JE, Baillie JK. 2020. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet* 395:473–475. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30317-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30317-2).
72. Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL, Borca MV. 2019. The role of interleukin 6 during viral infections. *Front Microbiol* 10:1057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01057>.
73. Akinosoglou K, Velissaris D, Ziazias D, Davoulos C, Tousis A, Tsiotsios K, Kalogeropoulou C, Spyridonidis A, Marangos M, Fligkou F, Gogos C. 2021. Remdesivir and tocilizumab: mix or match. *J Med Virol* 93:56–58. <https://doi.org/10.1002/jmv.26117>.
74. Feuillet V, Canard B, Trautmann A. 2021. Combining antivirals and immunomodulators to fight COVID-19. *Trends Immunol* 42:31–44. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.11.003>.
75. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. 2016. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol* 13: 3–10. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.74>.
76. Bockmann JH, Dandri M, Luth S, Pannicke N, Lohse AW. 2015. Combined glucocorticoid and antiviral therapy of hepatitis B virus-related liver failure. *World J Gastroenterol* 21:2214–2219. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i7.2214>.
77. Ye Z-W, Yuan S, Chan JF-W, Zhang AJ, Yu C-Y, Ong CP, Yang D, Chan CC-Y, Tang K, Cao J, Poon VK-M, Chan CC-S, Cai J-P, Chu H, Yuen K-Y, Jin D-Y. 2021. Beneficial effect of combinational methylprednisolone and remdesivir in hamster model of SARS-CoV-2 infection. *Emerg Microbes Infect* 10: 291–304. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1885998>.
78. Korolowicz KE, Suresh M, Li B, Huang X, Yon C, Leng X, Kallakury BV, Tucker RD, Menne S. 2021. Treatment with the immunomodulator AIC649 in combination with entecavir produces antiviral efficacy in the woodchuck model of chronic hepatitis B. *Viruses* 13:648. <https://doi.org/10.3390/v13040648>.
79. Zheng B-J, Chan K-W, Lin Y-P, Zhao G-Y, Chan C, Zhang H-J, Chen H-L, Wong SSY, Lau SKP, Woo PCY, Chan K-H, Jin D-Y, Yuen K-Y. 2008. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8091–8096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711942105>.
80. Moseley CE, Webster RG, Aldridge JR. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice. *Influenza Other Respir Viruses* 4: 307–311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2010.00155.x>.
81. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. 2007. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110:1748–1755. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067918>.
82. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. 2021. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 30:70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.

PUBLIKATION 3

RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS-APPROVED MAB PALIVIZUMAB AS LIGAND FOR ANTI-IDIOTYPE NANOBODY-BASED SYNTHETIC CYTOKINE RECEPTORS

Julia Ettich, Christoph Wittich, Jens M. Moll1, Kristina Behnke, Doreen M. Floss, Jens Reiners, Andreas Christmann, Philipp A. Lang, Sander H. J. Smits, Harald Kolmar, und Jürgen Scheller



Journal: Journal of Biological Chemistry, v.299(11); 2023 Nov.

Veröffentlichung: 19. September 2023

Impact-Faktor: 5.486 (2021)

Anteil an dieser Arbeit: 40%

Klonierung synthetischer Rezeptoren und Liganden, Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen, Proteinexpression und Quantifizierung, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Durchflusszytometrie, Zellviabilitätstests, Inhibitionstests, Stimulationstests, Western Blots, ELISA, Datenanalyse, Schreiben des Manuskripts.



Respiratory syncytial virus–approved mAb Palivizumab as ligand for anti-idiotypic nanobody-based synthetic cytokine receptors

Received for publication, April 26, 2023, and in revised form, September 4, 2023. Published, Papers in Press, September 19, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105270>

Julia Ettich^{1,4}, Christoph Wittich^{1,4}, Jens M. Moll^{1,2}, Kristina Behnke¹, Doreen M. Floss¹, Jens Reiners³, Andreas Christmann⁴, Philipp A. Lang⁵, Sander H. J. Smits^{3,6}, Harald Kolmar^{4,7}, and Jürgen Scheller^{1,*}

From the ¹Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany; ²PROvendi GmbH, Muelheim an der Ruhr, Germany; ³Institute of Biochemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁴Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Technical University of Darmstadt, Darmstadt, Germany; ⁵Institute of Molecular Medicine II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany; ⁶Center for Structural Studies, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁷Centre of Synthetic Biology, Technical University of Darmstadt, Darmstadt, Germany

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Alex Tokor

Synthetic cytokine receptors can modulate cellular functions based on an artificial ligand to avoid off-target and/or unspecific effects. However, ligands that can modulate receptor activity so far have not been used clinically because of unknown toxicity and immunity against the ligands. Here, we developed a fully synthetic cytokine/cytokine receptor pair based on the antigen-binding domain of the respiratory syncytial virus–approved mAb Palivizumab as a synthetic cytokine and a set of anti-idiotypic nanobodies (AIP^{VHH}) as synthetic receptors. Importantly, Palivizumab is neither cross-reactive with human proteins nor immunogenic. For the synthetic receptors, AIP^{VHH} were fused to the activating interleukin-6 cytokine receptor gp130 and the apoptosis-inducing receptor Fas. We found that the synthetic cytokine receptor AIP^{VHH}gp130 was efficiently activated by dimeric Palivizumab single-chain variable fragments. In summary, we created an *in vitro* non-immunogenic full-synthetic cytokine/cytokine receptor pair as a proof of concept for future *in vivo* therapeutic strategies utilizing nonphysiological targets during immunotherapy.

Cytokine receptors are in a monomeric off-mode and execute signal transduction in a dimeric or multimeric on-mode after cytokine binding (1). The on-mode can be interrupted and converted to the off-mode by depletion of the cytokine from the cytokine receptor, natural cytokine antagonists, or intracellular negative feedback mechanisms. Among others, antibodies as synthetic cytokine antagonists and agonists are a recent but promising development representing an own class of future therapeutic biomolecules (2, 3). Moreover, the approved chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for severe cases of acute lymphatic leukemia (4) is based on synthetic receptors (5) having an extracellular single-chain antibody fragment as a tumor antigen-binding unit.

Recently, we have developed a fully synthetic cytokine/cytokine receptor system that mimicked natural cytokine signaling, exemplified by the proinflammatory cytokines interleukin (IL-) 6, IL-12, IL-22, IL-23, tumor necrosis factor (TNF) α , and death ligand Fas (6–9). This fully synthetic cytokine receptor system (SyCyR) was based on nanobodies specifically recognizing GFP and mCherry (10, 11) fused to the transmembrane and intracellular domains of the receptor of interest. A nanobody or VHH consists of the N-terminal variable domain of Camelidae heavy-chain antibody, which is sufficient for antigen binding (12). Nanobodies are already used in diagnostic and therapeutic applications and are immunologically safe (13). GFP-mCherry fusion proteins served as nanobody-cytokine receptor dimerizers (9). GFP and mCherry as synthetic cytokine ligands and specific nanobodies as receptor entities enabled background-free and cell-type-specific activation of synthetic cytokine receptors due to the lack of existing human equivalents for these antigen–antibody interactions. However, the nonhuman nature of GFP/mCherry represents a significant drawback because repetitive therapeutic application will lead to the development of neutralizing antibodies (14), which eventually will prevent receptor binding of synthetic ligands. Therefore, we considered an alternative synthetic cytokine/cytokine receptor pair, which should be based on a nanobody as extracellular receptor moiety. This nanobody should not bind to human proteins, and the synthetic ligand should not be immunogenic in humans. We considered that an antibody:anti-idiotypic nanobody pair in which the antibody is not directed against a human protein might be suited for this purpose. Moreover, the antibody should be licensed for human therapeutic applications to ease later approval.

Anti-idiotypes are antibodies or nanobodies that bind specifically to the variable regions or hypervariable loops of an antibody (15). Accordingly, we selected Palivizumab as bait for the development of anti-idiotypic nanobodies. Palivizumab is a monoclonal humanized antibody (IgG) directed against an epitope in the antigenic site of the fusion (F) protein of

* These authors contributed equally to this work.

* For correspondence: Jürgen Scheller, jscheller@uni-duesseldorf.de.



RSV mAb as synthetic receptor ligand

respiratory syncytial virus (RSV) (16). It was approved in 1998 to prevent infection and severe disease caused by RSV in infants at high risk. Palivizumab inhibits the entry of RSV into host cells (16). We immunized a llama with Palivizumab, followed by the selection of anti-idiotypic nanobodies using yeast display technology. Palivizumab and reformatted dimeric Palivizumab single-chain variable fragment (P^{scFv}) served as synthetic cytokine ligands to activate the synthetic anti-idiotypic Palivizumab nanobody (AIP^{VHH}) cytokine receptor fusion protein.

Results

Generation and characterization of anti-idiotypic nanobodies against Palivizumab (AIP^{VHH})

A llama was immunized with Palivizumab, peripheral B cells were isolated, copy DNAs (cDNAs) coding for the VHH nanobody repertoire were amplified by PCR and introduced by

gap repair cloning into linearized yeast display vector pCT using yeast strain EBY100 (17). Yeast cells were incubated with Palivizumab for flow cytometry sorting (Fig. S1A). Yeast cells were incubated with 1 mg/ml Gamunex 10% (human IgG mixture) to exclude unspecific IgG binders, followed by a fluorescent-labeled anti-human-fragment crystallizable (Fc)-phycoerythrin conjugate incubation. These prestained cells were incubated with Palivizumab (60 nM), followed by an anti-Fab(κ -chain)-allophycocyanin (APC) conjugate. Cells carrying only the APC fluorescence (Palivizumab-specific) were selected (Fig. S1B). After two rounds of sorting, clones were sequenced, and four different anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab ($AIP1-4^{VHH}$) were isolated (Fig. S2), expressed as Twin-Strep-tagged soluble proteins in Expi293F cells and purified by affinity chromatography (Fig. S3). First, the affinity of soluble $AIP1-4^{VHH}$ to Palivizumab was determined by surface plasmon resonance (Fig. 1A). Soluble $AIP1^{VHH}$ displayed a

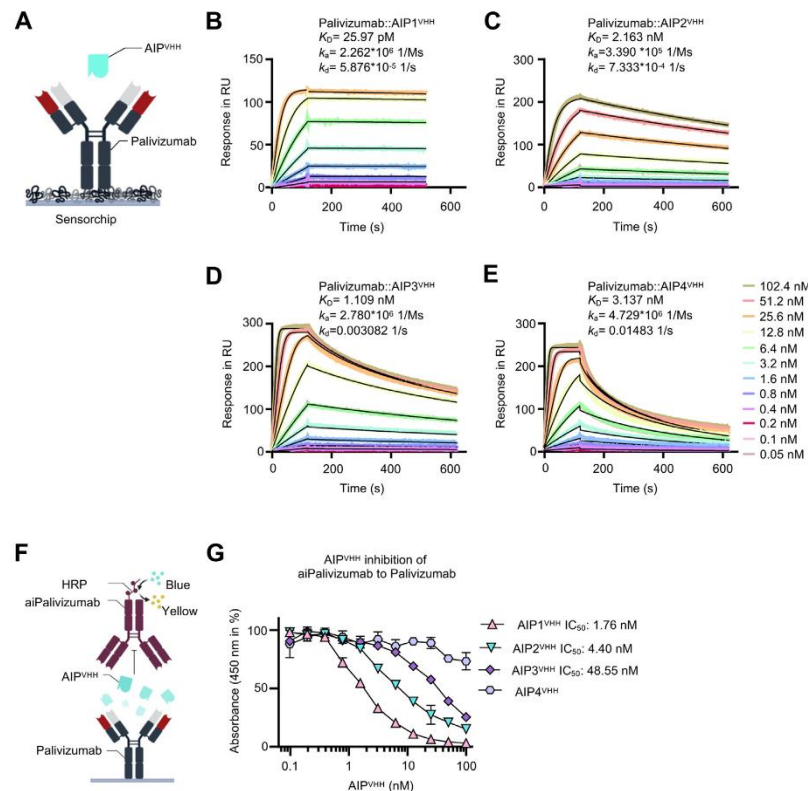


Figure 1. Characterization of anti-idiotypic nanobodies against Palivizumab. A, schematic illustration of surface plasmon resonance analytes with captured Palivizumab coated on a Protein A chip and soluble AIP^{VHH} . Surface plasmon data from binding of (B) $AIP1^{VHH}$, (C) $AIP2^{VHH}$, (D) $AIP3^{VHH}$, and (E) $AIP4^{VHH}$ (concentration range: 102.4, 51.2, 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 nM) to Palivizumab. Sensograms in response units (RU) over time are depicted as colored lines, global fit displayed as black lines. Analytes were injected for 120 s and dissociation rate was recorded for 500 s. F, schematic illustration of the competitive anti-idiotypic Palivizumab ELISA. Palivizumab was coated and binding of aiPalivizumab is quantified, coinubation with competitors $AIP1-4^{VHH}$ should reduce signal strength. G, competitive anti-idiotypic Palivizumab ELISA. Incubation of 1 nM anti-idiotypic Palivizumab IgG antibody (AbD23967) as detection antibody with increasing amounts of soluble $AIP1-4^{VHH}$ nanobodies (0.1–100 nM). Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates is shown (n = 3). AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab.

K_D of 25.97 pM (Fig. 1B), AIP2^{VHH} of 2.16 nM (Fig. 1C), AIP3^{VHH} of 1.11 nM (Fig. 1D), and AIP4^{VHH} of 3.14 nM (Fig. 1E) for Palivizumab, respectively. The monomeric AIP1^{VHH} revealed a very stable complex with Palivizumab characterized by a high k_a of 2.3×10^6 1/Ms and a low k_d of 5.9×10^{-5} 1/s. Next, we used the commercially available Palivizumab-specific anti-idiotypic IgG antibody AbD23967 (aiPalivizumab) to test for anti-idiotypic binding of AIP^{VHH} to Palivizumab, because AIP^{VHH} should compete for binding with aiPalivizumab to Palivizumab (Fig. 1F). Titration of AIP1^{VHH}, AIP2^{VHH}, and AIP3^{VHH} but not of AIP4^{VHH} resulted in a clear dose-dependent displacement of aiPalivizumab with an IC_{50} of 1.76 nM, 4.40 nM, and 48.55 nM, respectively (Figs. 1G and S4). Therefore, we conclude that AIP1^{VHH},

AIP2^{VHH}, and AIP3^{VHH} have the same or an overlapping anti-idiotypic binding site to Palivizumab as aiPalivizumab, while AIP4^{VHH} either has a too high k_d to compete with aiPalivizumab in this assay or it binds at a different epitope. Our data showed that AIP1-3^{VHH} are high-affinity anti-idiotypic binders to Palivizumab.

To further determine the anti-idiotypic character of AIP1^{VHH}, we determined the small-angle X-ray scattering (SAXS) profile of AIP1^{VHH} (Table S1 and Fig. S6), Palivizumab (Table S1 and Fig. S7, A, C, and E black curves), and the complex of both (Table S1 and Fig. S7, B, C, and E green curves) (18–22). The AlphaFold2 models of the Fc and Fab fragments were used as template and subsequently realigned with CORAL until the protein tertiary structure describe the

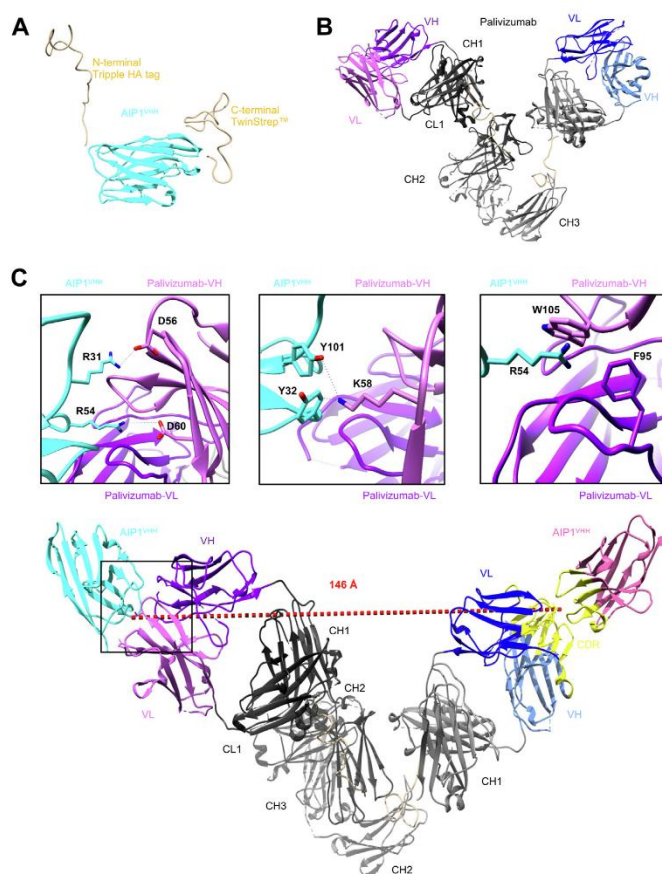


Figure 2. Small-angle X-ray scattering structural characterization of the AIP1^{VHH} and Palivizumab complex. A, rigid body model of AIP1^{VHH} based on AlphaFold from small-angle X-ray scattering with flexible N- and C-terminal parts. B, rigid body model of the IgG with flexible linkers (beige) between the Fc and Fab domains of Palivizumab. C, docking of AIP1^{VHH} to Palivizumab. Distance between the paratopes is 146 Å and is indicated by a red dotted line. On the right side, residues of AIP1^{VHH} and Palivizumab CDRs are colored yellow. Close-up views of the interaction area highlight hot spot amino acids, distances are indicated with blue dotted lines. Heavy chain, purple or dark blue; light chain, pink or light blue; constant region, black and coal; and AIP1^{VHH}, cyan or magenta. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; CDR, complementarity determining region; Fab, fragment antigen-binding; Fc, fragment crystallizable.

RSV mAb as synthetic receptor ligand

SAXS profile. We show that AIP1^{VHH} (Fig. 2A) and Palivizumab (Fig. 2B) are folded correctly and AIP1^{VHH} is a monomer and Palivizumab a dimer in solution (Table S1). The incubation of AIP1^{VHH} and Palivizumab results in a complex, where each monomer of Palivizumab binds one AIP1^{VHH}. As expected AIP1^{VHH} binds the hypervariable antigen-binding loops of Palivizumab and sterically covers the loops on both heavy and light chain (Fig. 2C). We determined an important role between R31/R54 and Y101/Y32 of AIP1^{VHH} and D56/D60 and K58 of Palivizumab light chain, respectively. Furthermore, we assume hydrophobic interactions of W105 and F95 of Palivizumab with R54 of AIP1^{VHH} via cation- π interactions (Fig. 2C) (23).

Cross-linked Palivizumab efficiently activated synthetic AIP^{VHH}-gp130 receptor signaling

AIP1-4^{VHH} were genetically fused to a cDNA coding for the transmembrane and intracellular domain of gp130 and named AIP1^{VHH}gp130, AIP2^{VHH}gp130, AIP3^{VHH}gp130, and AIP4^{VHH}gp130 (Figs. 3A and S5). The expression of AIP^{VHH}gp130 proteins in Ba/F3-gp130 cells was shown by Western blotting against the N-terminal myc tag (Fig. 3B). Flow cytometry revealed that cell surface localization of AIP1^{VHH}gp130 in Ba/F3-gp130 cells was stronger than AIP2^{VHH}gp130 and AIP3^{VHH}gp130, whereas AIP4^{VHH}gp130 was the lowest, the expression levels might have an influence on the concentrations necessary for proliferation and might contribute to the distinct behavior of the receptors on the cells (Fig. 3C). Ba/F3-gp130 cells are murine pre-B cells, and due to

stable expression of gp130, these cells become responsive to Hyper IL-6 (HIL-6, fusion protein of IL-6 and soluble IL-6 receptor α), which induces cell proliferation *via* Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling (24). We expected that forced dimerization of the AIP^{VHH}gp130 receptor by Palivizumab would result in synthetic cytokine receptor activation, induction of signal transduction, and cellular proliferation. Only minimal proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP3^{VHH}gp130 was observed, albeit the highest concentration of 66 nM Palivizumab induced only 20% of the maximal proliferation seen for 140 pM HIL-6. In contrast, Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1,2,4^{VHH}gp130 did not proliferate in response to Palivizumab (Fig. 3D). Palivizumab also failed to induce STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing any of the AIP^{VHH}gp130 receptors (Fig. 3E). We calculated the maximal distance between the two antigen-binding epitopes of Palivizumab and AIP1^{VHH} to be 150 Å using SAXS-based tertiary structure modeling (Fig. 2C). We hypothesized that this distance might be too spacious to activate two synthetic gp130 receptors. Therefore, higher ordered multimerization *via* a cross-linking human Fc-directed mAb (hFc-mAb) was tested to force synthetic gp130 receptor multimerization (Fig. 4A). Initially, we chose a 6-fold molar excess of the cross-linking hFc-mAb over Palivizumab to stimulate Ba/F3-gp130-AIP^{VHH}gp130 cells. Cellular proliferation was observed for Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 (EC_{50} = 215 nM), AIP2^{VHH}gp130 (EC_{50} = 48.78 nM) and AIP3^{VHH}gp130 (EC_{50} = 2.71 nM) cells but not for Ba/F3-gp130-AIP4^{VHH}gp130 cells at the highest concentration of

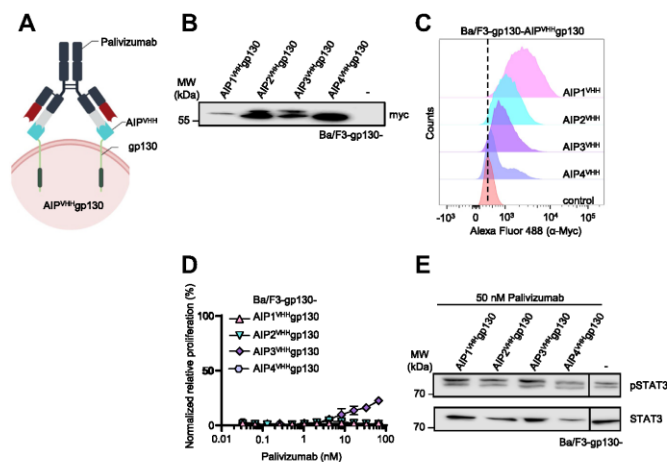


Figure 3. Palivizumab is a poor activator of synthetic AIP3^{VHH}gp130 receptor signaling. A, schematic illustration of Palivizumab binding to cellular AIP^{VHH}gp130. B, Western blot detection of myc-tagged synthetic cytokine receptors in lysates of Ba/F3-gp130 cell lines expressing AIP1-4^{VHH}gp130. C, flow cytometry analysis of myc-tagged synthetic receptors on the surface of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-4^{VHH}gp130 with increasing concentrations of Palivizumab (0.033–66 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. D, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-4^{VHH}gp130 cells treated with 50 nM Palivizumab, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 µg/lane) were analyzed *via* specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; HIL, hyper interleukin; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

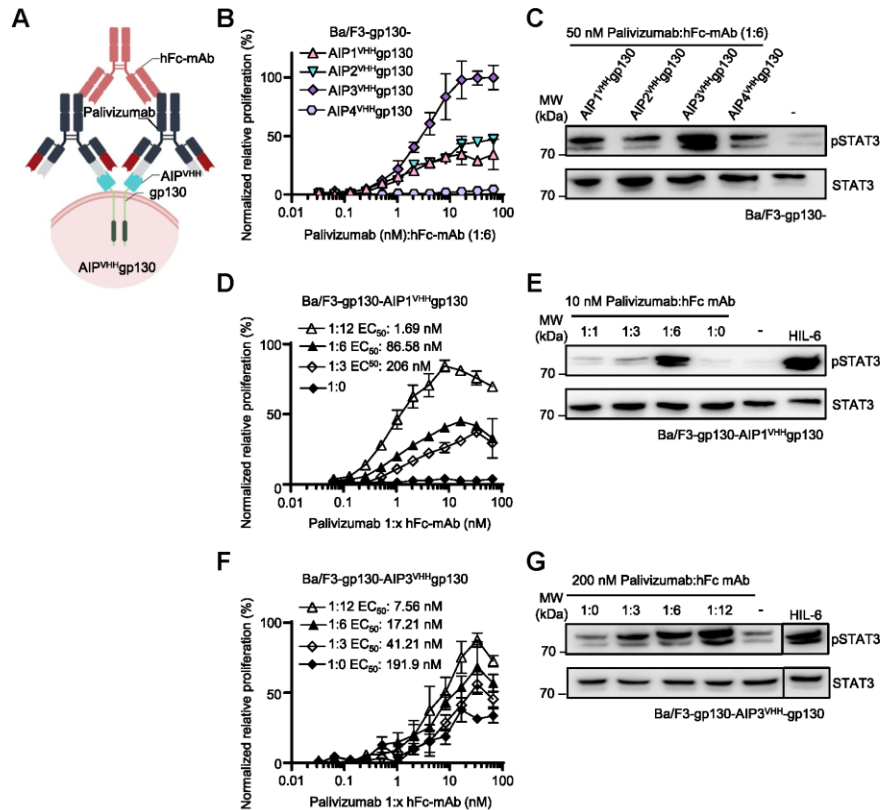


Figure 4. Cross-linked Palivizumab efficiently activated synthetic AIP1-3^{VHH}gp130 receptor signaling. A, schematic illustration of cross-linked Palivizumab binding to cellular AIP^{VHH}gp130. Cross-linking is achieved by a Palivizumab Fc-binding mAb. B, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-4^{VHH}gp130 with increasing concentrations of Palivizumab (0.033–66 nM) in the presence of a 6-fold molar excess of hFc-mAb. Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. C, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-4^{VHH}gp130 cells treated with 50 nM Palivizumab in the presence of a 6-fold molar excess of hFc-mAb, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 µg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. D, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1^{VHH}gp130 with increasing concentrations of Palivizumab (0.033–66 nM) in the presence of a 3-, 6-, and 12-fold molar excess of hFc-mAb. Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. E, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells-expressing AIP1^{VHH}gp130 cells treated with 10 nM Palivizumab in the presence of a 1-, 3-, 6-, and 12-fold molar excess of hFc-mAb, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 µg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. F, proliferation of Ba/F3-gp130 cells-expressing AIP3^{VHH}gp130 with increasing concentrations of Palivizumab (0.033–66 nM) in the presence of a 3-, 6-, and 12-fold molar excess of hFc-mAb. Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. G, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells-expressing AIP3^{VHH}gp130 cells treated with 200 nM Palivizumab in the presence of a 3-, 6-, 12-fold molar excess of hFc-mAb, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 µg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; Fc, fragment crystallizable; hFc-mAb, human Fc-directed mAb; HIL, hyper interleukin; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

Palivizumab/hFc-mAb (Fig. 4B). As shown in Figure 4C, stimulation with 50 nM Palivizumab/hFc-mAb (1:6) induced STAT3 phosphorylation in all four Ba/F3-gp130-AIP^{VHH}gp130 cell lines, whereas the intensity was strongest for Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 and Ba/F3-gp130-AIP3^{VHH}gp130. Neither the unrelated IL-23_p40 antibody Ustekinumab in combination with the cross-linking hFc-mAb

(1:6) nor the cross-linking hFc-mAb alone did induce STAT3 phosphorylation and proliferation of any Ba/F3-gp130-AIP^{VHH}gp130 cell line (Fig. S9, A–C). Next, the ratio of Palivizumab:hFc-mAb was varied from 1:0, 1:3, 1:6, to 1:12 (Fig. 4, D–G) and tested on Ba/F3-gp130-AIP1/3^{VHH}gp130 cells. Proliferation was already induced by a 1:3 Palivizumab:hFc-mAb ratio. However, a 1:12 ratio was the

RSV mAb as synthetic receptor ligand

most efficient (Fig. 4, D and F). Moreover, stimulation of the Ba/F3-gp130-AIP1/3^{VHH}gp130 cells with Palivizumab:hFc-mAb from 1:3 to 1:12 M ratios resulted in sustained STAT3 phosphorylation (Fig. 4, E and G).

Taken together, our data showed that cross-linked Palivizumab efficiently activated the synthetic AIP^{VHH}gp130 cytokine receptors AIP1,2,3^{VHH}.

Reformatting of Palivizumab into single-chain Fv fragments, maintained binding to AIP1^{VHH}

Palivizumab alone is a poor activator of synthetic AIP^{VHH}gp130 receptors, which might be due to the hinge region flexibility and the determined distance of about 150 Å between the two antigen-binding sites (Fig. 2C). Therefore, we reformatted Palivizumab into single-chain Fv fragments where the variable domains of the light and the heavy chain were fused by a flexible peptide linker, resulting in the cDNAs coding for P^{scFv}LH and P^{scFv}HL. The designation LH and HL indicated the order of the variable domains of the light chain (L) or the heavy chain (H). In LH, the variable domain of the light chain is N terminally located, whereas in HL, the variable domain of the heavy chain is N terminally located (Fig. S8A). P^{scFv}LH and P^{scFv}HL were fused to an Fc part of an IgG1 antibody (25). The distance of P^{scFv}LH or P^{scFv}HL to the first N-terminal cysteine of the Fc hinge region was 23 and 15 amino acids, respectively. Further, the linker ensures a

maximal distance of the variable domains of about 90 and 114 Å as defined by molecular modeling (Fig. S8, A and B). P^{scFv}LHFc and P^{scFv}HLFc were expressed in stably transfected CHO cells and transiently transfected Expi293F cells, respectively, and purified as dimers from the cell supernatants *via* Protein A affinity chromatography (Fig. S10, A–F). Next, we determined the interaction affinities of captured P^{scFv}LHFc and P^{scFv}HLFc to soluble AIP1^{VHH} by surface plasmon resonance. AIP1^{VHH} binds P^{scFv}LHFc, P^{scFv}HLFc, and Palivizumab with comparable affinities of 9.80 pM, 27.18 pM, and 25.97 pM, respectively (Figs. 1B and 5), demonstrating successful reformatting of Palivizumab into scFv fragments.

P^{scFv} are effective activators of synthetic AIP^{VHH}gp130 receptors

Next, we tested P^{scFv}LHFc on Ba/F3-gp130-AIP^{VHH}gp130 cells to induce cell proliferation and STAT3 phosphorylation (Fig. 6A). As only seen for cross-linked Palivizumab, P^{scFv}LHFc alone induced cellular proliferation and STAT3 phosphorylation *via* AIP^{VHH}gp130. Dose-dependent stimulation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP^{VHH}gp130 with P^{scFv}LHFc revealed an EC₅₀ of 0.21 nM for AIP1^{VHH}gp130 and 6.61 nM for AIP3^{VHH}gp130 (Fig. 6B), which is in good agreement with natural cytokine concentrations needed for receptor activation (6). However, the expression of AIP2^{VHH}gp130 was the least effective, and AIP4^{VHH}gp130 failed to induce cellular proliferation

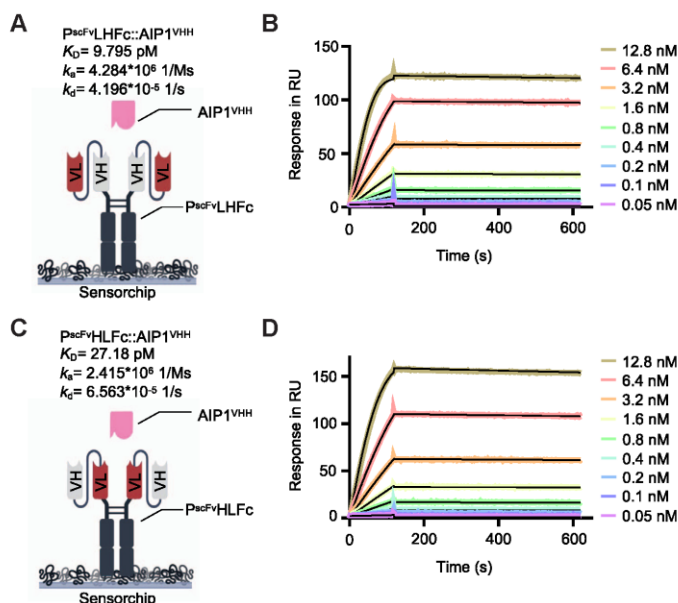


Figure 5. Reformatting of Palivizumab into P^{scFv} maintained binding to AIP1^{VHH}. Schematic illustration and surface plasmon resonance data with captured (A and B) P^{scFv}LHFc and (C and D) P^{scFv}HLFc coated on a Protein A chip and soluble AIP1^{VHH} (concentration range: 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 nM). Sensograms in response units (RU) over time are depicted as colored lines, global fit displayed as black lines. Analytes were injected for 120 s and dissociation rate was recorded for 500 s. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; P^{scFv}, Palivizumab single-chain variable fragment.

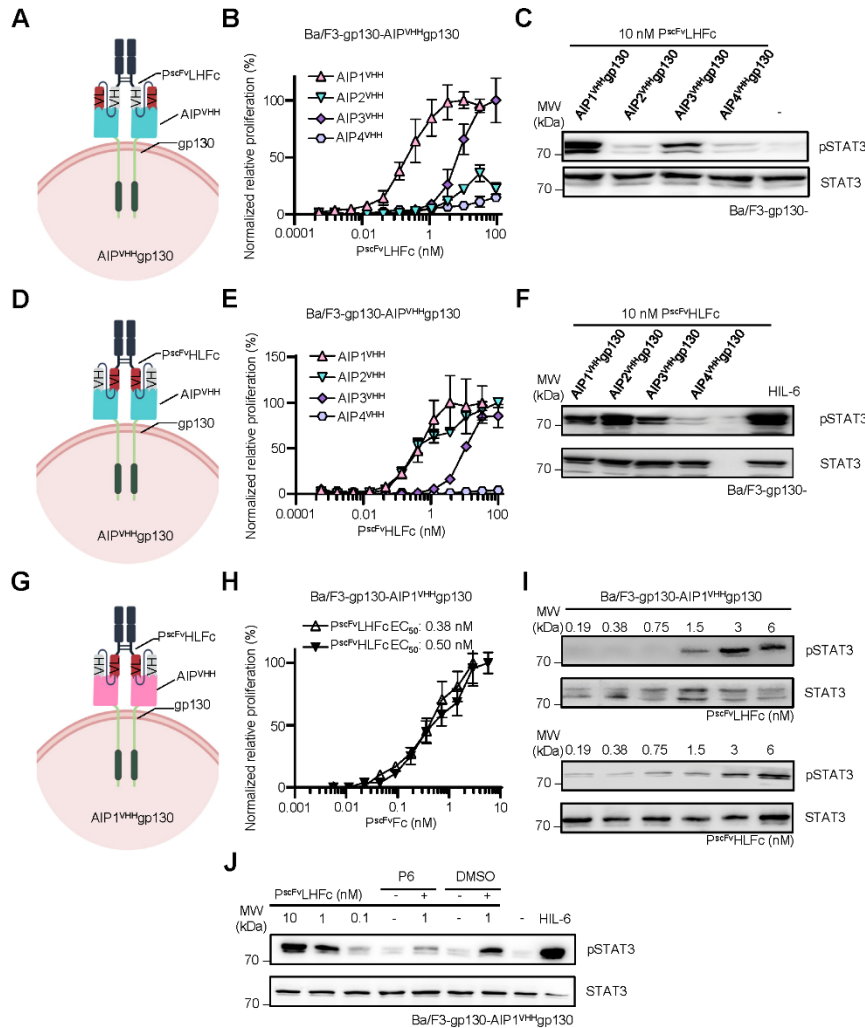


Figure 6. pscFvFc are effective activators of synthetic $\text{AIP}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ receptors. A, schematic illustration of pscFvLHFc binding to cellular $\text{AIP}^{\text{VHH}}\text{gp130}$. B, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing $\text{AIP1-4}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ with increasing concentrations of pscFvLHFc (0.00053–93.5 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml) induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. C, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing $\text{AIP1-4}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ cells treated with 10 nM pscFvLHFc or left untreated for 90 min. D, schematic illustration of pscFvLHFc binding to cellular $\text{AIP}^{\text{VHH}}\text{gp130}$. E, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing $\text{AIP1-4}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ with increasing concentrations of pscFvLHFc (0.00056–100 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. F, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing $\text{AIP1-4}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ cells treated with 10 nM pscFvLHFc or HIL-6 (10 ng/ml) for 90 min. G, schematic illustration of pscFvLHFc and pscFvHLFc binding to cellular $\text{AIP1}^{\text{VHH}}\text{gp130}$. H, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing $\text{AIP1}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ with increasing concentrations of pscFvLHFc and pscFvHLFc (0.00563–5.77 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml) induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. I, phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130- $\text{AIP1}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ cells treated with increasing concentrations of pscFvLHFc or pscFvHLFc from 0.19 to 6 nM or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. J, phosphorylation of STAT3 in Ba/F3-gp130- $\text{AIP1}^{\text{VHH}}\text{gp130}$ cells treated with 0.1, 1, and 10 nM pscFvLHFc in the presence and absence of 10- μM P6 inhibitor, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Dimethyl sulfoxide (1% v/v)-treated cells served as control. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; FC, fragment crystallizable; HIL, hyper interleukin; pscFv , Palivizumab single-chain variable fragment; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

RSV mAb as synthetic receptor ligand

(Fig. 6B). These findings were mirrored by STAT3 phosphorylation, where 10 nM P^{scFv}LHFc was most effective on AIP1^{VHH}gp130, followed by AIP3^{VHH}gp130 (Fig. 6C). AIP2^{VHH}gp130 and AIP4^{VHH}gp130 were not activated by P^{scFv}LHFc (Fig. 6C). Next, we tested whether the alternative heavy/light chain ordered single-chain P^{scFv}LHFc is also biologically active (Fig. 6D). The activity of P^{scFv}LHFc was determined for Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 and Ba/F3-gp130-AIP3^{VHH}gp130 cells with EC₅₀ of 0.4 nM and 9.1 nM, respectively. In contrast, cellular proliferation of Ba/F3-gp130-AIP2^{VHH}gp130 was induced with P^{scFv}LHFc with an EC₅₀ of 0.7 nM (Fig. 6E). Stimulation with 10 nM P^{scFv}LHFc induced STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130-AIP1-3^{VHH}gp130 cells, whereas the intensity was strongest for Ba/F3-gp130-AIP2^{VHH}gp130, followed by Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130, and AIP3^{VHH}gp130 (Fig. 6F). We found that P^{scFv}LHFc induced proliferation of Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells with an EC₅₀ of 0.50 nM (Fig. 6H), which was in the same range as seen for P^{scFv}LHFc (EC₅₀ of 0.38 nM). Accordingly, low amounts starting at 0.19 nM P^{scFv}LHFc and 1.5 nM P^{scFv}LHFc already induced STAT3 phosphorylation of Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells (Fig. 6I). STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells was suppressed by the pan JAK inhibitor P6 (26), demonstrating that STAT3 activation was mediated *via* the JAK/STAT pathway, following activation of AIP1^{VHH}gp130 (Fig. 6J).

Palivizumab-induced signaling was potentiated by cross-linking. Therefore, we tested the ability to induce receptor activation through cross-linking of P^{scFv}LHFc with hFc-mAb (Fig. 7A). First, we showed that the hFc-mAb binds P^{scFv}LHFc. The detection of P^{scFv}LHFc was only achieved in the presence but not in the absence of hFc-mAb using Western blotting (Fig. 7B). Increasing the molar ratio of hFc-mAb:P^{scFv}LHFc from 1:0, 1:3, 1:6, to 1:12 did, however, not enhance the proliferation of Ba/F3-gp130-AIP1/3^{VHH}gp130 cells (Fig. 7, C and E). Cross-linking did also not increase STAT3 phosphorylation of Ba/F3-gp130-AIP1/3^{VHH}gp130 cells (Fig. 7, D and F). As a control, neither Palivizumab nor P^{scFv}LHFc alone induced cellular proliferation or STAT3 phosphorylation of Ba/F3-gp130 cells (Fig. S9, D and E).

In summary, the reformatted dimeric P^{scFv} variants are efficient anti-idiotypic synthetic cytokine ligands that induce sustained signal transduction and cell proliferation. Cross-linking did, however, not increase the activity of the synthetic gp130 cytokine receptors.

Competition of Palivizumab and P^{scFv} inhibits synthetic AIP1^{VHH}gp130 signaling

Both dimeric Palivizumab scFv variants P^{scFv}LHFc and P^{scFv}LHFc efficiently activate synthetic AIP1^{VHH}gp130 cytokine receptor signaling. As depicted in Figure 8A, competition experiments with a constant concentration of P^{scFv}LHFc and increasing concentrations of Palivizumab showed that Palivizumab is an inhibitor of P^{scFv}LHFc-induced receptor activation. 2 nM P^{scFv}LHFc was used to induce sustained proliferation of Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells (Fig. 8B).

Adding increasing amounts of Palivizumab resulted in dose-dependent suppression of cellular proliferation. The IC₅₀ for inhibition of P^{scFv}LHFc by Palivizumab was 8.28 nM, demonstrating 4-fold excess of Palivizumab was sufficient to inhibit P^{scFv}LHFc-induced cell proliferation (Fig. 8B). For STAT3 phosphorylation, at least an 8-fold molar excess of Palivizumab over P^{scFv}LHFc (2 nM) resulted in complete suppression of signal transduction in Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells (Fig. 8C). Next, monomeric AIP1^{VHH} was tested for inhibition of P^{scFv}LHFc-induced proliferation of Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells (Fig. 8D). Soluble AIP1^{VHH} inhibited P^{scFv}LHFc (2 nM) induced cellular proliferation with an IC₅₀ of 2.79 nM, whereas higher inhibitory concentrations of AIP2^{VHH} and AIP3^{VHH} were needed (IC₅₀ = 83.14 and 364.40 nM, respectively). AIP4^{VHH} might not function as an antagonist because of its high *k_d* compared to AIP2^{VHH} and AIP3^{VHH} (Fig. 8E). The high affinity of AIP1^{VHH} might explain these inhibitory differences compared to AIP2^{VHH}, AIP3^{VHH}, and AIP4^{VHH} to Palivizumab.

Synthetic AIP^{VHH}Fas receptors efficiently induce cellular apoptosis

The death receptor Fas induces apoptosis through initiator Caspase 8 and effector Caspase 3/6/7 *via* the trimeric FasL (27, 28). Recent data, however, suggests also higher than trimeric receptor-oligomerization upon binding induce apoptosis (29). Using GFP/mCherry as synthetic ligands, we previously showed that apoptosis by the Fas-SyCyR was also induced by dimers, which was, however, less efficient than the trimeric or oligomeric Fas-SyCyR complexes (7). Here, the anti-idiotypic synthetic cytokine systems were adopted to Fas-induced apoptosis. AIP1-3^{VHH} were genetically fused to a cDNA coding for the transmembrane and intracellular domain of human Fas, with an N-terminal signal peptide, followed by a myc tag for detection (Fig. S5). Flow cytometry against the N-terminal myc tag showed cell surface expression of synthetic AIP1,2,3^{VHH}Fas receptors on Ba/F3-gp130 cells (Fig. 9A). Ba/F3-gp130-AIP1-3^{VHH}Fas cells were analyzed for activation of caspase 3/7 and induction of apoptosis after AIP^{VHH}Fas stimulation in comparison to HIL6-induced gp130 activation. The synthetic dimeric P^{scFv}LHFc and tetrameric 2× P^{scFv}LHFc ligands were designed to induce dimeric and tetrameric AIP1-3^{VHH}Fas receptor assemblies, respectively. Tetramerization of 2× P^{scFv}LHFc was achieved by linker peptide connected tandem arrangement of two P^{scFv} fused to the IgG1-Fc fragment. Higher-ordered Fas oligomerization was induced by cross-linking of 2× P^{scFv}LHFc with hFc-mAb (1:6 M ratio). Tetrameric and oligomeric ligands induced caspase 3/7 activation after 4 h in Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}Fas and Ba/F3-gp130-AIP3^{VHH}Fas cells (Fig. 9B). Apoptosis was not induced *via* AIP2^{VHH}Fas incubated with any of the synthetic ligands. Compared to tetramerization, oligomerization of AIP1^{VHH}Fas was about 2.5- to 5-fold more effective in inducing caspase 3/7. The amount of activated caspase 3/7 was maximal and independent of ligand concentration, when oligomerization clustered AIP1^{VHH}Fas. For AIP3^{VHH}Fas, 2× P^{scFv}LHFc-induced

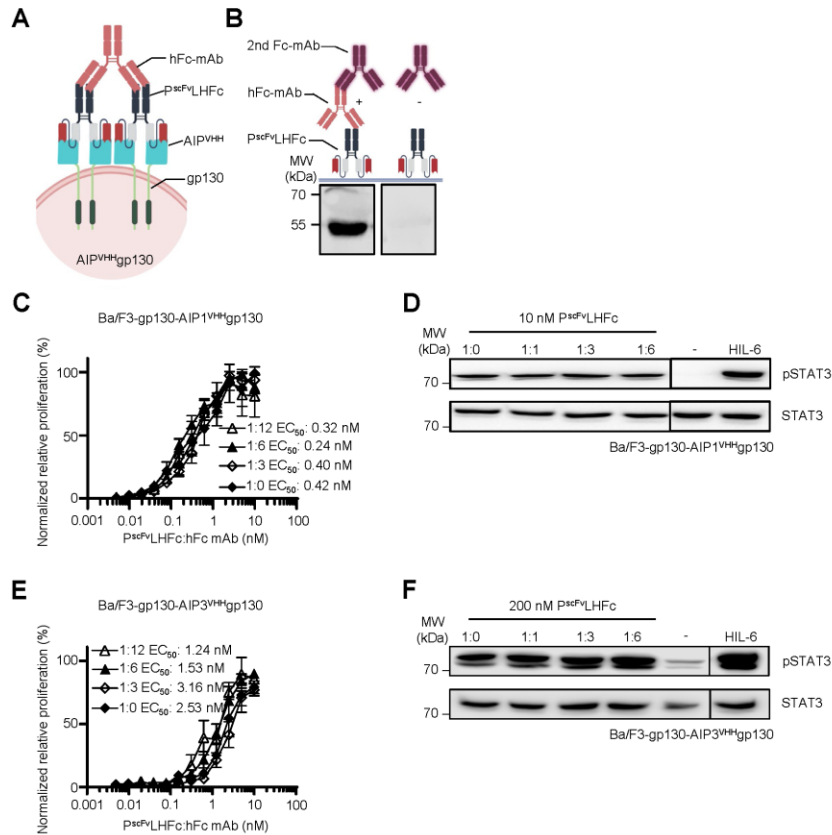


Figure 7. Cross-linking of $P^{scFv}Fc$ did not enhance synthetic $AIP^{VHH}gp130$ receptor activation. A, schematic illustration of cross-linked $P^{scFv}LHFc$ binding to cellular $AIP^{VHH}gp130$. Cross-linking is achieved by a $P^{scFv}LHFc$ Fc-binding mAb. B, Western blotting of $P^{scFv}LHFc$ with and without primary Fc-binding mAb from goat (hFc-mAb, used for cross-linking), followed by secondary anti-goat specific antibody (second Fc-mAb). C, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP1^{VHH}gp130$ with increasing concentrations of $P^{scFv}LHFc$ (0.0049–10 nM) in the presence of a 3-, 6-, and 12-fold molar excess of hFc-mAb. Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. D, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP1^{VHH}gp130$ cells treated with 10 nM $P^{scFv}LHFc$ in the presence of a 1-, 3-, and 6-fold molar excess of hFc-mAb, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. E, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP3^{VHH}gp130$ with increasing concentrations of $P^{scFv}LHFc$ (0.0049–10 nM) in the presence of a 3-, 6-, and 12-fold molar excess of hFc-mAb. Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml)-induced proliferation of each cell line. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. F, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP3^{VHH}gp130$ cells treated with 200 nM $P^{scFv}LHFc$ in the presence of a 1-, 3-, 6-fold molar excess of hFc-mAb, HIL-6 (10 ng/ml), or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; Fc, fragment crystallizable; hFc-mAb, human Fc-directed mAb; HIL, hyper interleukin; P^{scFv} , Palivizumab single-chain variable fragment; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

caspace 3/7 activation upon tetramerization was as effective as oligomerization at least for 1, 10, and 100 nM. Additionally, dimeric $P^{scFv}LHFc$ activated $AIP3^{VHH}Fas$ up to 50% compared to oligomerization at 100 nM (Fig. 9B).

Finally, apoptosis of Ba/F3-gp130- $AIP^{VHH}Fas$ cells was quantified using flow cytometry after 24 and 48 h of stimulation with synthetic cytokine ligands. Ethanol treatment served as positive control, whereas stimulation with HIL-6 was the proliferation control (Fig. S11). Again, stimulation

of $AIP2^{VHH}Fas$ in Ba/F3-gp130 cells failed to induce apoptosis, whereas Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP1^{VHH}Fas$ and $AIP3^{VHH}Fas$ were apoptotic, following synthetic cytokine stimulation. Apoptotic Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP1^{VHH}Fas$ were, however, also found after dimeric receptor activation with $P^{scFv}LHFc$ albeit not before 48 h, whereas tetrameric and oligomeric receptor activation efficiently induced apoptosis already after 24 h. Apoptotic Ba/F3-gp130 cells expressing $AIP3^{VHH}Fas$ were provoked after

RSV mAb as synthetic receptor ligand

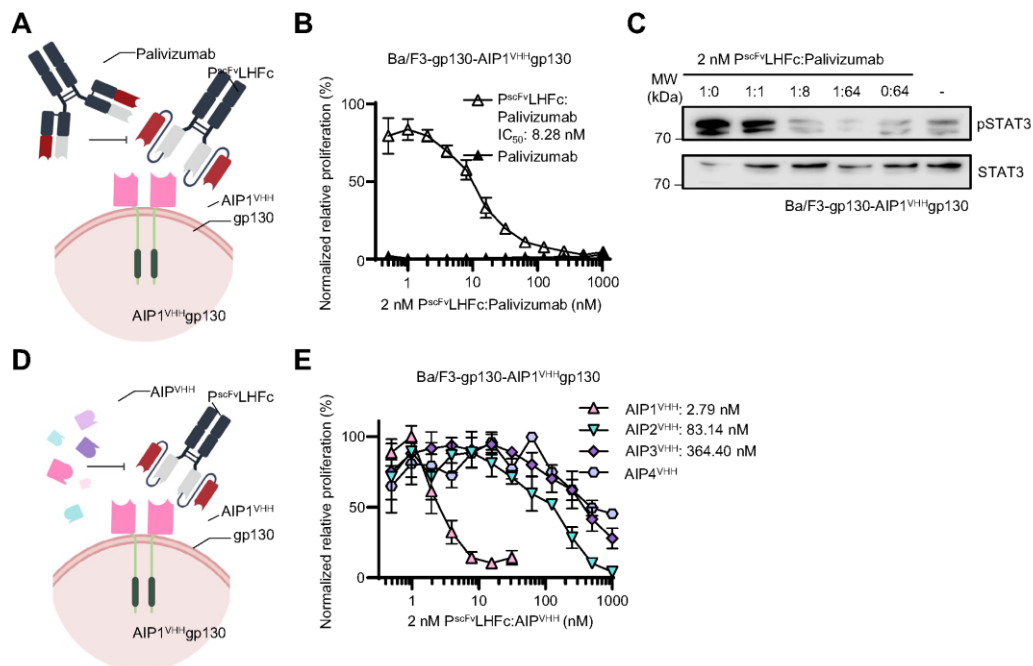


Figure 8. Competition of Palivizumab and P^{scFv} inhibits synthetic AIP1^{VHH} gp130 signaling. A, schematic illustration of competition between Palivizumab and P^{scFv} LHFc on Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells. B, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1^{VHH}gp130 with 1.8 nM P^{scFv} LHFc in the presence increasing concentrations of Palivizumab (0.49–1000 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml). As negative control, Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells were treated with Palivizumab alone. Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. C, STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1^{VHH}gp130 cells treated with 2 nM P^{scFv} LHFc in the presence of a 0-, 1-, 8-, and 64-fold molar excess of Palivizumab or left untreated for 90 min. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blotting data show one representative experiment out of three. D, schematic illustration of competition between P^{scFv} LHFc and soluble AIP1-4^{VHH} on Ba/F3-gp130-AIP1^{VHH}gp130 cells. E, proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1^{VHH}gp130 with 2 nM P^{scFv} LHFc in the presence increasing concentrations of soluble AIP1-4^{VHH} (0.49–1000 nM). Cell proliferation was normalized to HIL-6 (10 ng/ml). Error bars, SD. One representative experiment with three biological replicates out of three independent experiments is shown. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; Fc, fragment crystallizable; HIL, hyper interleukin; P^{scFv} , Palivizumab single-chain variable fragment; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

24 h stimulation with dimeric, tetrameric, and oligomeric P^{scFv} LHFc (100 nM) (Fig. 9C). Taken together, we have shown that activation of synthetic Fas efficiently induced apoptosis.

Discussion

Our data showed that the generated antibody:anti-idiotypic nanobody-cytokine receptor pair is well-suited for synthetic cytokine receptor assembly and signaling. An anti-idiotypic antibody is directed against the hypervariable loops of another antibody, which constitute the antigen-binding site of the antibodies (15). In general, the fully synthetic cytokine/cytokine receptor system presented in this study results in cellular activation *via* gp130 or cellular apoptosis *via* Fas, which allows the assembly of up to four synthetic cytokine receptors in one complex. This system is on/off-switchable because signal activation can be rapidly inhibited by applying soluble nanobodies or Palivizumab, which opens up therapeutic regimes involving

nonphysiological targets in immunotherapy. Reliably inducible death switches such as iCASP9 and our SyCyRs are anticipated in immunotherapy and may increase the safety index of CAR T-cell therapy (30, 31). We believe selecting an approved therapeutic antibody will enable the establishment of a from the shelf, nonimmunogenic, fully synthetic receptor system for the modulation, and selective activation of cytokine signaling in a complex environment without the danger of unwanted activation of neighboring nontarget cells. Recently, we developed a SyCyR based on nanobody/cytokine receptor fusion proteins activated by dimeric GFP and mCherry ligands (6). Moreover, we showed that the distance of the GFP/mCherry subunits in the synthetic dimeric ligand formed through Fc-mediated dimerization is crucial for effective receptor activation (9). This system was used to phenocopy cytokine signaling for IL-6 and IL-12 signaling, for IL-10 and interferon signaling, and also for the trimeric receptor class of tumor necrosis factor receptor/Fas (6–8, 32). The homomeric and heteromeric ligands generally showed high affinity and specificity. However, GFP and

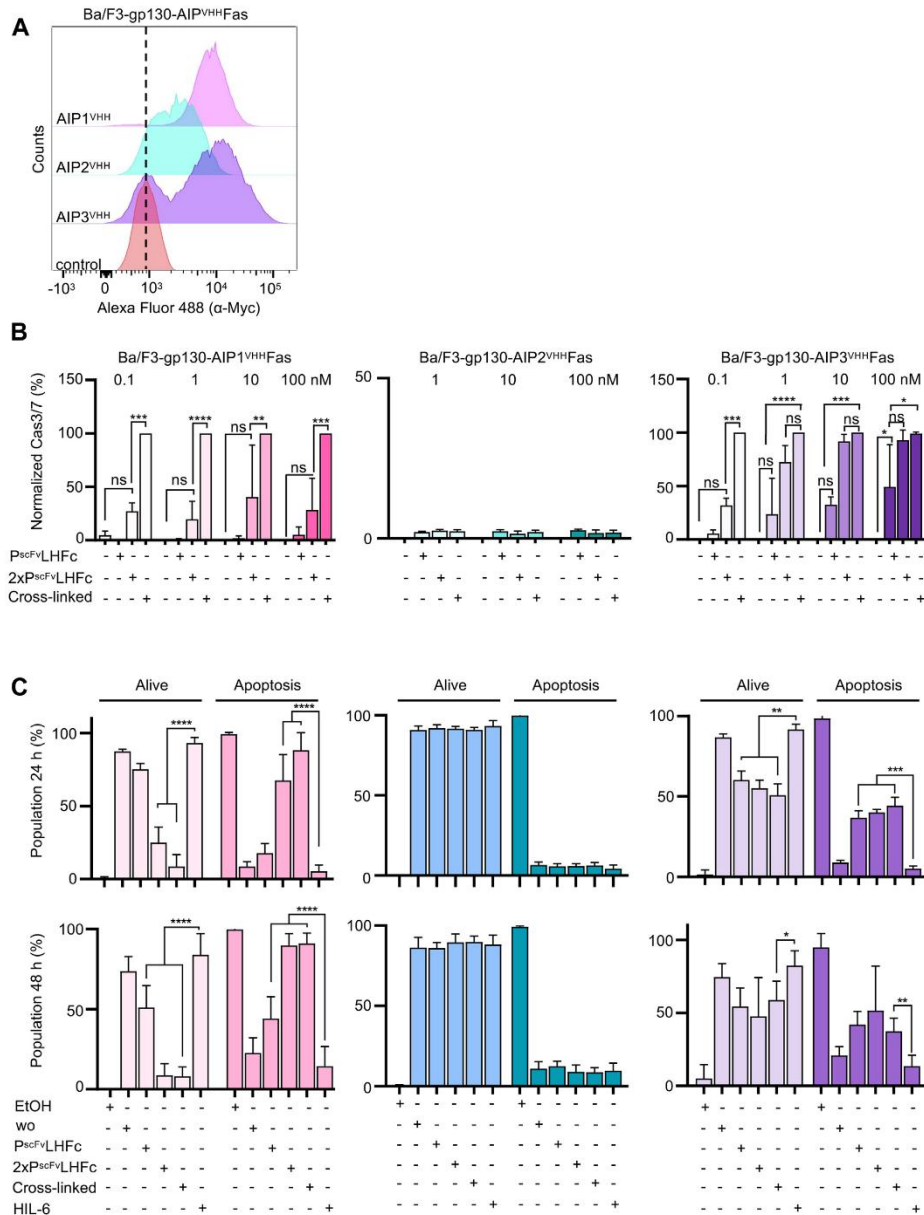


Figure 9. AIP^{VHH} fusion to Fas efficiently induce cellular apoptosis. A, flow cytometry analysis of myc-tagged synthetic receptors on the surface of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-3^{VHH}Fas. B, relative caspase-3/7 activity after incubation of Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-3^{VHH}Fas with increasing concentrations (0.1, 1, 10, and 100 nM) of dimeric pscFvLHFc, tetrameric 2 × pscFvLHFc, or cross-linked 2 × pscFvLHFc for 6 h, control cells were left untreated. C, Ba/F3-gp130 cells expressing AIP1-3^{VHH}Fas were incubated for 24 h or 48 h with 100 nM dimeric pscFvLHFc, tetrameric 2 × pscFvLHFc, or cross-linked 2 × pscFvLHFc (1:6). Controls cells were either untreated or grown with HIL-6 (10 ng/ml). Cells were incubated with HIL-6 (10 ng/ml) and washed with 70% EtOH before the measurement for the EtOH condition. Cells were stained with AnnexinV and 7-aminoactinomycin D and analysis was carried out using flow cytometry. AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; Fc, fragment crystallizable; hFc-mAb, human Fc-directed mAb; HIL, hyper interleukin; pscFv, Palivizumab single-chain variable fragment.

RSV mAb as synthetic receptor ligand

mCherry are foreign antigens to the body which eventually will produce antibodies, resulting in the neutralization of these synthetic ligands (14). Therefore, we envisioned that approved commercial antibodies might serve as surrogate synthetic ligands for anti-idiotypic nanobody-cytokine receptors. Our premise was that such antibodies should not have the human body's targets or antigens. Therefore, clinically Food and Drug Administration (FDA)/European Medicines Agency (EMA)-approved antibodies with anti-inflammatory or anticancer properties, such as Tocilizumab (anti-IL-6R) (33), Infliximab (anti-TNF α) (34), or Ipilimumab (anti-CTLA-4) (35) were unsuitable because these target human proteins. Therefore, we identified several FDA/EMA-approved antibodies that target foreign viral and bacterial antigens, including anti-RSVs humanized IgG1 Palivizumab (16) and the follow-up human IgG1 Nirsevimab (RSV) (2), anti-SARS-CoV2 human IgG1s Sotrovimab (36), Regdanvimab (37), Imdevimab (38) or Casirivimab (38), anti-Ebola human IgG1 Ansuvimab (39) and the triple antibody cocktail REGN-EB3 (atoltivimab, maftivimab, odesivimab) (39), and anti-bacterial/anthrax human IgG1 Raxibacumab (40).

We chose Palivizumab to generate the first proof-of-principle anti-idiotypic nanobodies because Palivizumab has the longest-lasting positive safety history since its approval in 1998 (41). Palivizumab binds an epitope in the A antigenic site of the fusion (F) protein of RSV and inhibits the entry of RSV into host cells (16). Unfortunately, nanobody-cytokine receptor signaling was only efficiently activated after cross-linking Palivizumab by Fc antibodies. However, cross-linking of IgG antibodies remains challenging *in vivo*. Therefore, we reformatted Palivizumab in dimeric and tetrameric scFv-Fc fusion proteins, which were highly biologically active. We hypothesize that the distance of the variable regions/complementarity determining regions was too large for an efficient pairing of nanobody-cytokine receptors, which would likely be a common issue for other antibody classes. The overall structure of antibodies can be subdivided into the fragment antigen-binding (Fab) region and the Fc region. The Fc part is connected through interchain disulfide bridges, whereas the Fab region contains the variable domains, followed by one constant domain of the heavy or light chain in the IgG, IgD, and IgA antibody classes. In contrast, IgMs and IgEs contain two constant domains in Fab. In the scFv-Fc fusion proteins, which were the biologically active synthetic cytokine surrogates, the constant domains of the Fab region were deleted, thereby resulting in synthetic antibodies with closer variable domains (Fig. S8B). From the list of FDA/EMA-approved antibodies, all were IgG1 subtypes except Ibalizumab, Natalizumab, Lebrikizumab, Tislelizumab, Mirikizumab, and Gemtuzumab, as humanized IgG4 subtypes (42). It remains to be seen if reformating Palivizumab into other antibody formats, such as IgA1/2, IgE, or IgM, will induce synthetic anti-idiotypic cytokine signaling without cross-linking. Since they also contain at least one constant domain within the Fab region, we assume that these antibody classes will likely not activate our synthetic cytokine receptors. IgMs might mimic the cross-linking effect due to the pentameric arrangement with ten antigen-binding

sites. Therefore, reformatting Palivizumab scFv into an IgM antibody format lacking the CH1 and CL domains might be of interest in future studies. Reliable methods for their production have been established and the first IgM-derived antibodies have entered clinical trials (43).

The generation of further antibody/anti-idiotypic nanobody combinations of the listed anti-viral/bacterial antibodies might allow the assembly of heterodimeric receptor complexes. For now, heterodimeric receptor recruitment might also be possible with GFP or mCherry fused to Palivizumab scFv. We have not tested this possibility because this study generally aimed to replace GFP/mCherry as synthetic ligands. The tetrameric P^{scFv}-P^{scFv}-Fc fusion proteins enable the combination of two or more synthetic receptor pairs. It was shown in this study that Fas signaling activated apoptosis based on higher-ordered ligands. Notably, lower affinity between AIP^{VHH} and P^{scFv} leads to higher potency, in accordance with previous studies on TNF receptor superfamily signaling (44, 45). Alternatively, heterodimeric scFv can be generated with preferentially heterodimer-forming Fc through SEEDbodies or using the knob-into-hole technology for generating heavy-chain heterodimers (46, 47). Therefore, the generation of heterodimeric scFvs should be generally feasible. In case that other than IgG full-length antibody subtypes might serve as efficient synthetic ligands, these antibody subclasses might be used to generate bispecific antibodies as heterodimeric/multimeric synthetic ligands. The bispecific antibodies made significant progress in the last decade and many are in clinical development (48).

Both components used in this study can be considered nonimmunogenic since scFv is part of clinical applications' CAR T-cell therapy. Nanobodies have a high sequence similarity of 75 to 90% to the human VH3 gene family, explaining their general low immunogenicity in clinical applications (49), however, one or all of the AIP^{VHH}s described in this study might be immunogenic nonetheless. Although the SyCyR system has been shown to function in mice (6), the presented antibody:anti-idiotypic nanobody-cytokine receptor pair has not been tested *in vivo* and might have to be optimized before use in clinical applications. While various nanobodies and scFvs are used in the clinic, no pharmacokinetic or pharmacovigilance analysis of the components used in this study has been done yet. Moreover, straightforward strategies exist to humanize them, that is to mutate them to their human heavy-chain variable domain equivalent (50). Caplacizumab, a nanobody directed against von Willebrand factor to treat thrombotic thrombocytopenic purpura, was the first clinically approved molecule in Europe and the USA (51).

Since patient-specific autologous therapies such as CAR T cells are advancing, new tools will be required. Tailor-made SyCyRs either supporting or repressing the activity of CAR T cells might help support CAR T-cell-like therapies.

Experimental procedures

Generation of anti-idiotypic VHHs

An approximately five-year-old lama (*Lama glama*) was immunized with Palivizumab at preclinics GmbH. All

experimental procedures and animal care were in accordance with local animal welfare protection laws and regulations. In brief, for each immunization 300 µg of Palivizumab diluted in a volume of 1 ml PBS were emulsified with either 1 ml Complete Freund's Adjuvant (first immunization) or Incomplete Freund's Adjuvant (subsequent immunizations). Injections were administered subcutaneously at three sites. A total of four immunizations were performed over the course of 56 days (0, 28, 42, and 56). On day 60, blood (100 ml) was collected and total RNA was extracted. After the study, camelids remained alive. mRNA, isolated from peripheral B cells of the immunized Lama was transcribed to cDNA utilizing SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions as described previously (52, 53). For PCR amplification of llama VHHs, heavy chain genes were amplified using forward primer CALL001 (5'-GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG) hybridizing in the region encoding to the leader signal of camelid VH/VHH genes and reverse primer CALL002 (5'-GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC) in the region encoding the CH2 domain. Amplicon DNA was separated by agarose gel electrophoresis and an 800-bp band corresponding to VHH genes was excised, purified using the Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) and used for a second PCR with primer pair pCT-VHH-Up (5'-GGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGAACAAAACTCATCTCAGAAAGAGATCTCGGCGGAGGGGTTTCAGATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG) and pCT-VHH-Lo (5'-TACACTGTTGTTATCAGATCTCGACTATTATGAGGAGACGGTGA CCTGGGT). The resulting DNA was introduced into yeast strain EBY100 via gap repair of NheI/BamHI linearized pCT vector as described (54). Yeast cells were incubated with Palivizumab for flow cytometry sorting (Fig. S1A). To exclude unspecific IgG binders, yeast cells were preincubated with 1 mg/ml Gamunex 10%, a human IgG mixture, followed by incubation with fluorescently labeled anti-human-Fc-phycoerythrin conjugate. These prestained cells were incubated with Palivizumab (60 nM), followed by an anti Fab (κ-chain)-APC conjugate. Cells carrying only the APC fluorescence (Palivizumab-specific) were selected (Fig. S1B). After two rounds of sorting, clones were sequenced.

Cloning of synthetic cytokine ligands and receptors

The cDNAs encoding for the scFv variant of Palivizumab was synthesized by Biotac. The amino acid sequence of Palivizumab was taken from patent US-6955717-B2. The variable heavy and variable light chain sequences were reverse translated into *Homo sapiens*-codon optimized P^{scFv} sequences using EMBOSS Backtranseq V6.6.0. The variable heavy and light chains were separated by a flexible (GGGGS)₄ linker. The P^{scFv} variants were subcloned into the pcDNA3.1-Fc vector coding for an N-terminal signal peptide and myc tag (EQKLISEEDL) and a C-terminal tobacco etch virus-protease followed by a human IgG1-Fc tag, resulting in expression plasmids pcDNA3.1-P^{scFv}LHFc and pcDNA3.1-P^{scFv}HLFc. In the tetrameric 2× P^{scFv}LHFc, a linker peptide (GGGS) was introduced between the first and second P^{scFv}LH. The

pcDNA3.1 expression vectors coding for AIP^{VHH} variants contained an N-terminal signal peptide and hemagglutinin-tag, followed by AIP1-4^{VHH} and C-terminal Twin-Strep-tag (WSHPQFEK). AIP^{VHH} were amplified by PCR (Primer forward: 5'-ACTGAGTCCTTAAGGATG TGCAGCTGCAGGAG-3'; Primer reverse: 5'-ATGCGTATGCGGCCGCTGAGGAG ACGGTGACCTG-3') and cloned *via* AflII and NotI into pcDNA3.1. The resulting plasmids were called pcDNA3.1-AIP1-4^{VHH}. pcDNA3.1 expression plasmids for synthetic cytokine receptors were generated by fusion of coding sequence for the IL-11R signal peptide (Q14626, aa 1–22), a myc tag followed by the anti-idiotypic single-domain nanobody (AIP^{VHH}1–4), residues of the extracellular domain (ECD), the transmembrane domain (TMD), and intracellular domain (ICD) of the cytokine receptors gp130 and Fas. The amino acids E605 to Q918 from human gp130 (P40189) were used, representing 15 amino acids of the ECD, the TMD, and the ICD. The amino acids C165 to V335 from the human Fas (P25445) were included, representing nine amino acids of the ECD, the TMD, and ICD. AIP1-4^{VHH} were amplified by PCR (Primer forward: 5'-AGTT ACGAGGATCCGATGTGCAGCTGCAGGAG-3'; Primer reverse: 5'-TAGTACGTGAATT CTGAGGAGACGGTGA CCTG-3') and cloned *via* BamHI and EcoRI into pcDNA3.1-SyCyR-gp130, resulting in pcDNA3.1-AIP1-4^{VHH}gp130 (6). Subsequently, gp130 cDNA was replaced by Fas cDNA using EcoRI and NotI, resulting in pcDNA3.1-AIP1-4^{VHH}Fas. For retroviral transduction of Ba/F3-gp130 cells with the cDNAs coding for the synthetic receptors, the cDNAs were subcloned into pMOWS-puro (7).

Cells and reagents

The generation of Ba/F3-gp130 cells was described elsewhere (55). The packaging cell line Phoenix-Eco was received from Ursula Klingmüller (DKFZ, Heidelberg, Germany). Cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose culture medium (GIBCO, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO, Life Technologies), 60 mg/l penicillin, and 100 mg/l streptomycin (Genaxxon bioscience GmbH) at 37 °C with 5% CO₂. Proliferation of Ba/F3-gp130 cells was maintained in the presence of 0.2% (10 ng/ml) human HIL-6 (24). Expi293F cells (Thermo Fisher Scientific) were cultured in Expi293 expression medium without antibiotics until they reached a density of 3 to 5 × 10⁶ c/ml in a 37 °C incubator with 8% CO₂ on an orbital shaker at 125 rpm. Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7; catalog #9145; 1:1000), STAT3 (124H6; catalog #9139; 1:1000), and myc (71D10; cat. #2278) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology. StrepMAP-Classic-horseradish peroxidase (HRP) (1:20,000, cat. #2-1509-001) was obtained from IBA GmbH. Rabbit anti-human IgG Fc (#31423) and peroxidase-conjugated secondary mAbs (#31432, #31462) were obtained from Pierce (Thermo Fisher Scientific). Alexa Fluor 488-conjugated Fab goat anti-rabbit IgG (1:500, cat. #4412) was obtained from Cell Signaling Technology. Palivizumab

RSV mAb as synthetic receptor ligand

antibody was from Synagis. The cross-linking goat anti-human IgG antibody was obtained from BIOZOL Diagnostics (cat. # SBA-2048-01).

Transfection of cells

Ba/F3-gp130 cells were retrovirally transduced with the pMOWS expression plasmids coding for AIP1-4^{VHH}gp130 and AIP1-3^{VHH}Fas variants as described in (7). Transduced cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium as described above supplemented with 10 ng/ml HIL-6. Selection of transduced Ba/F3-gp130 cells was performed with puromycin (1.5 µg/ml) (Carl Roth) for at least 2 weeks. Afterward, the generated Ba/F3-gp130 cell lines were analyzed for synthetic receptor cell surface expression *via* flow cytometry.

Mammalian expression and purification of recombinant proteins

pcDNA3.1 encoding P^{scFv}Fc variants and AIP^{VHH}-Twin-Strep were transfected into Expi293F cells using ExpiFectamine. Reaching 4.5 to 5.5 × 10⁶ c/ml, the cells were diluted to a final density of 3 × 10⁶ c/ml in 30 ml Expi293 expression medium. Thirty micrograms of the plasmid expression vectors were used for transfection according to the manufacturer's instructions. After 6 days, the culture was harvested by centrifugation at 450g at 4 °C for 5 min, followed by centrifugation of the resulting supernatant at 4000g at 4 °C for 20 min. The supernatant of the second centrifugation step was filtered (0.45 µm, Carl Roth cat. #P667.1) and purified by affinity chromatography. Recombinant proteins containing a Fc-tag were purified using Protein A resin (1 ml, HiTrap Mab-Select Prisma) at a flow rate of 1 ml/min. The column was washed with 30 column volumes of PBS. Proteins were eluted at pH 3.2 to 3.5 using a 50 mM citric acid buffer. Fractions containing the protein peak were pooled, and the pH was adjusted to pH 7 with 1 M Tris, pH 11. Recombinant proteins containing a C-terminal Twin-Strep-tag were purified using Strep-Tactin resin (IBA cat. #2-5025-001) according to the manufacturer's instructions. All purified proteins were rebuffed to PBS using illustra NAP-25 columns (GE Healthcare Life Sciences). Protein concentrations were determined by measuring absorbance at 280 nm, and samples were flash-frozen in liquid nitrogen. Protein quality was assessed by SDS-PAGE, Coomassie staining, and functional testing.

Surface plasmon resonance

For surface plasmon resonance experiments, the Biacore X100 instrument (Cytiva Life Sciences) and Protein A sensor chip (Cytiva Life Sciences, #29127558) were used. Palivizumab and P^{scFv}Fc variants were captured to a single flow cell at a level of about 1000 or 500 response units per cycle, respectively. Three samples containing only running buffer were injected over both ligand and reference flow cell, followed by AIP1-4^{VHH} serially diluted from 102.4 to 0.1 nM, with an independent final replicate with 6.4 nM. AIP1-4^{VHH} were injected at a flow rate of 30 µl/min for 120 s, and the dissociation was measured for 500 s. Experiments were carried out

at 25 °C in PBS pH 7.4, composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻, and 0.05% (v/v) surfactant P20 (GE Healthcare). The resulting data were reference subtracted and fit to a 1:1 binding model using the Biacore X100 Evaluation software V 2.0.1 (<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-48525-pdf>).

SEC-SAXS measurement

We collect the size exclusion chromatography (SEC)-SAXS data on the P12 beamline (PETRA III, DESY Hamburg (56)). The sample to detector distance of the P12 beamline for was 3 m, results in an achievable q-range of 0.03 to 7 nm⁻¹. The measurements were performed at 10 °C with a protein concentration of 10 mg/ml for apo Palivizumab and Palivizumab 5.5 mg/ml (37.5 µM) with 1.5 mg/ml (74 µM) AIP1^{VHH} for the complex. The SEC-SAXS runs were performed on a Superdex200 increase 10/300 GL column (100 µl inject, buffer: PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻, pH 7.4]) with a flowrate of 0.5 ml/min. We collected 3000 frames for each protein sample with an exposer time of 0.995 s/frame. Apo AIP1^{VHH} was measured in batch mode with a concentration of 0.21 mg/ml and an exposer time of 0.095 s/frame (40 frames). Data were scaled to absolute intensity against water. All used programs for data processing were part of the ATSAS software package (Version 3.0.5; <https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/manuals/install.html>) (57). Primary data reduction was performed with the programs CHROMIXS (58) and PRIMUS (59). With the Guinier approximation (60), we determine the forward scattering I(0) and the R_g. The program GNOM (61) was used to estimate the maximum particle dimension (D_{max}) with the pair-distribution function p(r).

The model of the Palivizumab IgG was generated out of the available structures. For the FC part, we used a nearly identical IgG (pdb code: 1IGY) as template for the Fc part alignment and for the glycosylation's. With AlphaFold2 (62, 63) we created the Fc part based on the original sequence of the Palivizumab IgG and realign the two protomers to the 1IGY FC part. We used the glycans from the 1IGY Fc part as template and kept them in the final model. The structure of the Fab part of the Palivizumab IgG is available (pdb code: 2HWZ), and we used this as template for an AlphaFold2 model to fill some gaps in the original structure. The resulting models of the Fc and Fab parts were then used as rigid bodies for the CORAL (63, 64) modeling to obtain representative conformations. The linker regions between the Fc and the Fab part were used as flexible part for the modeling. This is a similar approach as previously described in (65, 66). The nanobody AIP1^{VHH} model was created with AlphaFold2. Only the nanobody core domain was used as a rigid body and the flexible N- and C-terminal parts were remodeled with CORAL (63, 64). The rigid body Fc and Fab position results from apo Palivizumab CORAL model were used as a starting template for the complex docking with AIP1^{VHH}. For the AIP1^{VHH} nanobody, we used the core domain as a rigid body and the N- and C-terminal parts as flexible dummies in CORAL (63, 64). After several iterations, we found the docking position of the

AIP1^{VHH} nanobody in the Fab part of the Palivizumab. In the final step, we grouped this found position of the AIP1^{VHH} nanobody core domain symmetry equivalent to the Palivizumab Fab domains and did the remodeling with respect to the flexible parts in CORAL again (63, 64).

Anti-idiotypic (competitive) ELISA

For anti-idiotypic detection, manufacturer's instructions were followed. Therefore, Palivizumab was coated overnight at 4 °C with a serial dilution starting from 2 to 0.1 µg/ml in 100 µl PBST (0.05% Tween-20). After washing five times with 250 µl PBST, 300 µl 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS served as blocking solution for 1 h at room temperature (RT). After removal of blocking solution and washing five times, 100 µl of HRP-conjugated anti-idiotypic detection antibody HCA262P was added at 0.2 µg/ml in 1% BSA PBS for 1 h at RT. For detection plate was washed ten times, 100 µl of detection solution per well was added (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; #35930600) and stopped after 30 min incubation at RT by adding 100 µl stop solution (1.8 M H₂SO₄). Infinite M200 PRO plate reader recorded the absorbance at 450 nm with correction at 570 nm. For the refined anti-idiotypic competitive detection, the procedure of commercial anti-idiotypic ELISA was complemented by the following step: the soluble AIP1-4^{VHH} was added at a concentration from 100 to 0.1 nM to the 100 µl containing HRP-conjugated anti-idiotypic detection antibody HCA262P at 0.2 µg/ml.

Cell surface detection of AIP1-4^{VHH} gp130 and AIP1-3^{VHH} Fas via flow cytometry

5 × 10⁵ Ba/F3-gp130 cells and variants thereof were washed in flow cytometry buffer (PBS, 1% BSA) and then incubated in 50 µl of flow cytometry buffer containing primary myc antibody (1:100). After incubation for 1 h at RT, cells were washed and resuspended in 50 µl of flow cytometry buffer containing secondary antibody (Alexa Fluor 488-conjugated Fab anti-rabbit IgG 1:500) and incubated for 1 h at RT. Cells were washed and resuspended in 500 µl of flow cytometry buffer and analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II flow cytometer using the FACSDiva software, BD Biosciences; <https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/software/instrument-software/bd-facsdiva-software>). Data analysis was conducted using FlowJo Version 10 (Tree Star Inc; <https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads/previous-versions>).

Proliferation assays

Ba/F3-gp130 cells were washed and 1 × 10⁴ cells were cultured for 3 days in a final volume of 100 µl in the presence of (synthetic) cytokines and antibodies. The CellTiter-Blue Reagent was used to determine cellular viability by recording the fluorescence (excitation 560 nm, emission 590 nm) using an Infinite M200 PRO plate reader (Tecan) immediately after adding 20 µl of reagent per well (time point 0) and up to 120 min thereafter. All conditions were measured in triplicate per experiment. Fluorescence values were normalized by

subtraction of time point 0 values. All experiments were performed at least three times, and one representative experiment was selected.

Stimulation of cells and lysate preparation

10⁶ Ba/F3-gp130 cells and variants thereof/ml were washed three times with PBS and starved in serum-free medium for at least 3 h. Subsequently, cells were stimulated with the indicated (synthetic) cytokines and antibodies for 90 min (or as indicated), harvested by centrifugation at 4 °C for 5 min at 450g, frozen, and lysed. Cells were lysed for 2 h with buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM sodium vanadate, 10 mM MgCl₂, and one complete EDTA-free protease inhibitor mixture tablet (Roche Diagnostics). For JAK inhibition, cells were pretreated for 1 h with 10 µM Pyridone 6 P6 (JAK inhibitor; Sigma-Aldrich #420097). Protein concentration of cell lysates was determined by the bicinchoninic acid Protein Assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific).

Western blotting

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes for 60 min (20 V, 1 A). Membranes were blocked and probed with the indicated primary antibodies. After washing, membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:2500) or fluorescence-labeled secondary antibodies (1:10,000). The Immobilon Western Reagents (Millipore Corporation) and the ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) or the Odyssey Fc Imaging System (LI-CORE Biosciences) were used for signal detection.

AnnexinV/7-aminoactinomycin D staining

Ba/F3-gp130 cell lines were washed three times with PBS. 1.25 × 10⁵ cells were used per well and incubated with the indicated cytokines for 24 h or 48 h. For the ethanol condition, cells were only incubated with HIL6 (10 ng/ml). Ethanol treatment replaced the last washing step before the measurement. Cells were washed twice with ice-cold PBS and if indicated with 70% ethanol. Cells were resuspended in 300 µl Annexin V binding buffer (BD Bioscience) with 0.5 µl Annexin V-PE (ImmunoTools) and incubated for 15 min in the dark at RT. One microliter 7-aminoactinomycin D (R&D Systems) was added before analysis was carried out by flow cytometry recording 20,000 events.

Fluorimetric caspase 3/7 assay

Ba/F3-gp130 cells were washed three times with PBS. 1.25 × 10⁵ cells were incubated with the indicated cytokines for 6 h in a 96-well plate in a volume of 100 µl. Subsequently, induction of apoptosis was determined using Amplitude Fluorimetric Caspase 3/7 Assay kit (AAT Bioquest, Inc) according to manufacturer's recommendations. In brief, 100 µl of the caspase-3/7 working solution was added to the cells and incubated for 2 h at RT. After centrifugation at 450g for 1 min,

RSV mAb as synthetic receptor ligand

the fluorescence (excitation 350 nm, emission 450 nm) using an Infinite M200 PRO plate reader (Tecan) was determined.

Statistical analyses

For proliferation assays, a representative experiment of $n \geq 3$ assays with comparable results is displayed. EC_{50} or IC_{50} values were determined using a nonlinear regression analysis with variable slope calculation in GraphPad Prism 8.0 (version 8.0.2 for Windows, GraphPad Software, www.graphpad.com) from three individual experiments. The data are presented as means $\pm$ SD. For multiple comparisons, two-way ANOVA including Bonferroni as statistical hypothesis test was used (GraphPad Prism 8.0.2, GraphPad Software Inc). Statistical significance was set at the level of $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$).

Data availability

We will upload the SAXS data to the Small Angle Scattering Biological Data Bank (67).

Supporting information—This article contains supporting information.

Acknowledgments—We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) for provision of synchrotron radiation facilities and in using beamline BM29. We acknowledge DESY (Hamburg, Germany), a member of the Helmholtz Association HGF, for the provision of experimental facilities. Parts of this research were carried out at PETRA III, and we would like to thank Cy M. Jeffries (EMBL Hamburg) for the assistance in using beamline P12.

Author contributions—J. E., C. W., J. R., A. C., S. H. J. S., and J. S. methodology; J. E., C. W., J. R., A. C., and S. H. J. S. investigation; J. E., C. W., J. M. M., K. B., D. M. F., J. R., A. C., P. A. L., S. H. J. S., and H. K. formal analysis; J. E., C. W., and J. S. writing—original draft; J. M. M., K. B., D. M. F., J. R., P. A. L., and H. K. resources.

Funding and additional information—The Center for Structural studies is funded by the DFG (Grant number 417919780 and INST 208/761-1 FUGG to S. S.). J. S. was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHE 907/5-1 and SCHE 907/6-1).

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: AIP, anti-idiotypic nanobodies for Palivizumab; APC, allophycocyanin; BSA, bovine serum albumin; CAR, chimeric antigen receptor; cDNA, copy DNA; ECD, extracellular domain; EMA, European Medicines Agency; Fab, fragment antigen-binding; Fc, fragment crystallizable; FDA, Food and Drug Administration; hFC-mAb, human Fc-directed mAb; HIL, hyper interleukin; HRP, horseradish peroxidase; ICD, intracellular domain; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; PscFv, Palivizumab single-chain variable fragment; RSV, respiratory syncytial virus; RT, room temperature; SAXS, small-angle X-ray scattering; SEC, size exclusion chromatography; STAT, signal transducer and

activator of transcription; TMD, transmembrane domain; TNF, tumor necrosis factor.

References

1. Croxford, A. L., Mair, F., and Becher, B. (2012) IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2263–2273.
2. Domachowski, J., Madhi, S., Simões, E., Atanasova, V., Cabañas, F., Furuno, K., et al. (2022) Safety of Nirsevimab for RSV in infants with heart or lung disease or prematurity. *N. Engl. J. Med.* **386**, 892–894.
3. Spangler, J., Moraga, L., Jude, K., Savvides, C., and Garcia, K. (2019) A strategy for the selection of monovalent antibodies that span protein dimer interfaces. *J. Biol. Chem.* **294**, 13876–13886.
4. Si, W., Li, C., and Wei, P. (2018) Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy. *Synth. Syst. Biotechnol.* **3**, 179–185.
5. Scheller, J., Engelowski, E., Moll, J., and Floss, D. (2019) Immunoreceptor engineering and synthetic cytokine signaling for therapeutics. *Trends Immunol.* **40**, 258–272.
6. Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., et al. (2018) Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nat. Commun.* **9**, 2034.
7. Mossner, S., Floss, D., and Scheller, J. (2021) Pro- and anti-apoptotic fate decisions induced by di- and trimeric synthetic cytokine receptors. *iScience* **24**, 102471.
8. Mossner, S., Kuchner, M., Fazel Modares, N., Knebel, B., Al-Hasani, H., Floss, D., et al. (2020) Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130. *J. Biol. Chem.* **295**, 12378–12397.
9. Mossner, S., Phan, H., Triller, S., Moll, J., Conrad, U., and Scheller, J. (2020) Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands. *PLoS One* **15**, e0230804.
10. Fridy, P. C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M. K., Nudelman, L., Scheid, J. F., et al. (2014) A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat. Methods* **12**, 1253–1260.
11. Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 282–289.
12. Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., et al. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 157–174.
13. Pan, S., Chia, Y., Yee, H., Fang Cheng, A., Anjum, C., Kenisi, Y., et al. (2020) Immunomodulatory potential of anti-idiotypic antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Future Sci. OA* **7**, FS0648.
14. Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D. (1999) Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther.* **6**, 1305–1312.
15. Pan, Y., Yuhasz, S., and Amzel, L. (1995) Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *FASEB J.* **9**, 43–49.
16. Resch, B. (2017) Product review on the monoclonal antibody palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection. *Hum. Vaccin. Immunother.* **13**, 2138–2149.
17. Boder, E., and Wittrup, K. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**, 553.
18. Porod, G. (1951) Die Röntgenkleinwinkelstreuung von Dichtgepackten Kolloiden systemen - 1 teil. *Kolloid Z.* **124**, 83–114.
19. Fischer, H., Neto, M. D., Napolitano, H. B., Polikarpov, L., and Craievich, A. F. (2010) Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *J. Appl. Crystallogr.* **43**, 101–109.
20. Rambo, R. P., and Tainer, J. A. (2013) Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* **496**, 477–481.
21. Hajizadeh, N. R., Franke, D., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2018) Consensus Bayesian assessment of protein molecular mass from solution X-ray scattering data. *Sci. Rep.* **8**, 7204.

22. PyMOL. (2022) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5*. Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany
23. Anderson, M., Ogbay, B., Arimoto, R., Sha, W., Kisselev, O., Cistola, D., et al. (2006) Relative strength of cation- π vs salt-bridge interactions: the G α 13(340-350) peptide/rhodopsin system. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7531–7541
24. Fischer, M., Goldschmidt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., et al. (1997) A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* **15**, 142–145
25. Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J. P., Conrad, C., Tran, F., Hoper, H., et al. (2021) Therapeutic interleukin 6 trans-signaling inhibition by olamkcept (sgp130Fc) in patients with active inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **160**, 2354–2366.e11
26. Thompson, J., Cubbon, R., Cummings, R., Wicker, L., Frankshun, R., Cunningham, B., et al. (2002) Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: a Jak protein kinase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 1219–1223
27. McIlwain, D., Berger, T., and Mak, T. W. (2015) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a026716
28. Wilson, N. S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009) Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* **10**, 348–355
29. Vanamee, E., and Faustman, D. (2020) On the TRAIL of better therapies: understanding TNFRSF structure-function. *Cells* **9**, 764
30. Abate-Daga, D., and Davila, M. (2016) CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Mol. Ther. Oncolytics* **3**, 16014
31. Mirzaee Godarzee, M., Mahmud Hussien, B., Razmara, E., Hakak-Zargar, B., Mohajerani, F., Dabiri, H., et al. (2022) Strategies to overcome the side effects of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1510**, 18–35
32. Zoellner, N., Coesfeld, N., De Vos, F., Dentner, J., Xu, H., Zimmer, E., et al. (2022) Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling. *Front. Microbiol.* **13**, 947169
33. Choy, E., De Benedetti, F., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M., and Kishimoto, T. (2020) Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16**, 335–345
34. Cornillie, F. (2009) Ten years of infliximab (remicade) in clinical practice: the story from bench to bedside. *Eur. J. Pharmacol.* **623**, 1–4
35. Pardoll, D. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264
36. Gupta, A., Gonzalez-Rojas, Y., Juarez, E., Crespo Casal, M., Moya, J., Falcí, D., et al. (2021) Early treatment for covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody Sotrovimab. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1941–1950
37. Kim, C., Ryu, D., Lee, J., Kim, Y., Seo, J., Kim, Y., et al. (2021) A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. *Nat. Commun.* **12**, 288
38. Group, R. C. (2022) Casirivimab and imdevimab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet* **399**, 665–676
39. Mulangu, S., Mbala-Kingebeni, P., and Mbaya, O. (2022) Antibody use during an outbreak of Ebola virus disease in the Democratic Republic of Congo, 2020. *N. Engl. J. Med.* **386**, 1188–1191
40. Migone, T., Subramanian, G., Zhong, J., Healey, L., Corey, A., Devalaraja, M., et al. (2009) Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N. Engl. J. Med.* **361**, 135–144
41. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee (2014) Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* **134**, 415–420
42. Labrijn, A., Buijsse, A., van den Bremer, E., Verwilligen, A., Bleeker, W., Thorpe, S., et al. (2009) Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **27**, 767–771
43. Keyt, B., Baliga, R., Sinclair, A., Carroll, S., and Peterson, M. (2020) Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies* **9**, 53
44. Yu, X., Orr, C., Chan, H., James, S., Penfold, C., Kim, J., et al. (2023) Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody agonism. *Nature* **614**, 539–547
45. Chodorge, M., Züger, S., Stirnimann, C., Briand, C., Jermutus, L., Grütter, M., et al. (2012) A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency. *Cell Death Differ.* **19**, 1187–1195
46. Davis, J., Aperlo, C., Li, Y., Kurosawa, E., Lan, Y., Lo, K., et al. (2010) SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. *Protein Eng. Des. Sel* **23**, 195–202
47. Kontermann, R. (2012) Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* **4**, 182–197
48. Labrijn, A., Janmaat, M., Reichert, J., and Parren, P. (2021) Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 585–608
49. Asadi, Y., Jouneghani, F., Janani, S., and Rahbarizadeh, F. (2021) A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomark. Res.* **9**, 87
50. Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2009) General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J. Biol. Chem.* **284**, 3273–3284
51. Scully, M., Cataland, S., Peyvandi, F., Coppo, P., Knöbl, P., Kremer Hovinga, J., et al. (2019) Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **380**, 335–346
52. Bogen, J. P., Storka, J., Yanakieva, D., Fiebig, D., Grzeschik, J., Hock, B., et al. (2020) Isolation of common light chain antibodies from immunized chickens using yeast biopanning and fluorescence-activated cell sorting. *Biotechnol. J.* **16**, 2000240
53. Grzeschik, J., Yanakieva, D., Roth, L., Krah, S., Hinz, S. C., Elter, A., et al. (2019) Yeast surface display in combination with fluorescence-activated cell sorting enables the rapid isolation of antibody fragments derived from immunized chickens. *Biotechnol. J.* **14**, e1800466
54. Könnig, D., Rhiel, L., Empting, M., Grzeschik, J., Sellmann, C., Schröter, C., et al. (2017) Semi-synthetic vNAR libraries screened against therapeutic antibodies primarily deliver anti-idiotypic binders. *Sci. Rep.* **7**, 9676
55. Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., et al. (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* **110**, 1748–1755
56. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., Jeffries, C. M., et al. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J. Appl. Crystallogr.* **48**, 431–443
57. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., et al. (2021) Atsas 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **54**, 343–355
58. Panjkovich, A., and Svergun, D. I. (2017) CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small angle X-ray scattering data. *Bioinformatics* **34**, 1944–1946
59. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282
60. Guinier, A. (1939) Small-angle X-ray diffraction: application to the study of ultramicroscopic phenomena. *Ann. Phys.* **11**, 161–237
61. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
62. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589
63. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682

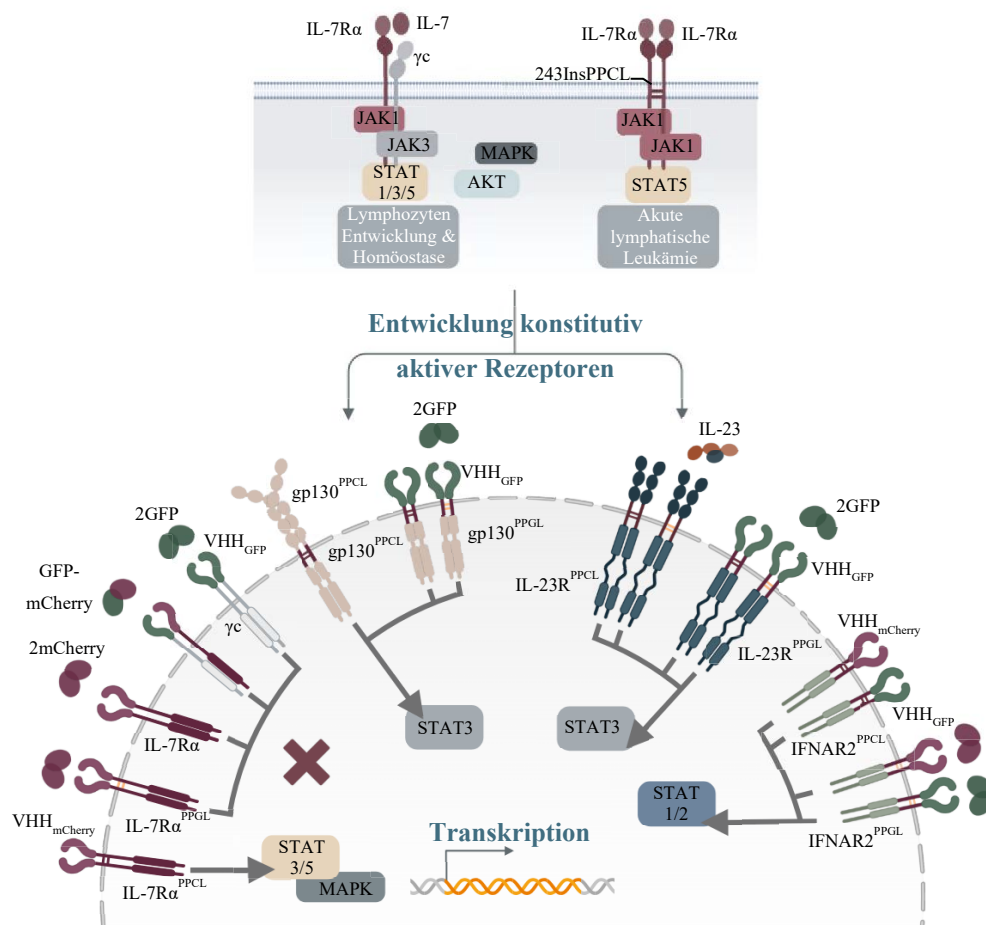
RSV mAb as synthetic receptor ligand

64. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., *et al.* (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350
65. Linsenmeier, L., Mohammadi, B., Shafiq, M., Frontzek, K., Bär, J., Shrivastava, A. N., *et al.* (2021) Ligands binding to the prion protein induce its proteolytic release with therapeutic potential in neurodegenerative proteinopathies. *Sci. Adv.* **7**, eabj1826
66. Belviso, B. D., Mangiatordi, G. F., Alberga, D., Mangini, V., Carrozzini, B., and Caliendo, R. (2022) Structural characterization of the full-length anti-CD20 antibody Rituximab. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 823174
67. Kikhney, A. G., Borges, C. R., Molodenskiy, D. S., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2020) SASBDB: towards an automatically curated and validated repository for biological scattering data. *Protein Sci.* **29**, 66–75

PUBLIKATION 4

UNPAIRED CYSTEINE INSERTIONS FAVOR TRANSMEMBRANE DIMERIZATION AND INDUCE LIGAND-INDEPENDENT CONSTITUTIVE CYTOKINE RECEPTOR SIGNALING

Lynn Affrica Felicitas Baumgärtner, Julia Ettich, Helene Balles, Dorothee Johanna Lapp, Sofie Mossner, Christin Bassenge, Meryem Ouzin, Helmut Hanenberg, Jürgen Scheller und Doreen Manuela Floss



Journal: De Gruyter, Biological Chemistry

Veröffentlichung: 03. Mai 2024

Impact-Faktor: 3,700 (2023)

Anteil an dieser Arbeit: 30%

Klonierung synthetischer Rezeptoren, Zellviabilitätstests, Stimulationstests, Durchflusszytometrie, Datenanalyse, Schreiben des Manuskripts.

Lynn Affrica Felicitas Baumgärtner, Julia Ettich, Helene Balles, Dorothee Johanna Lapp, Sofie Mossner, Christin Bassenge, Meryem Ouzin, Helmut Hanenberg, Jürgen Scheller and Doreen Manuela Floss*

Unpaired cysteine insertions favor transmembrane dimerization and induce ligand-independent constitutive cytokine receptor signaling

<https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0344>

Received November 10, 2023; accepted March 25, 2024;
published online May 3, 2024

Lynn Affrica Felicitas Baumgärtner and Julia Ettich contributed equally to this work.

Dorothee Johanna Lapp: Present address: Institute of Innate Immunity, Medical Faculty, University of Bonn, D-53127 Bonn, Germany and Department of Microbiology & Immunology, The University of Melbourne at the Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Melbourne, Victoria 3000, Australia; Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany.

Sofie Mossner: Present address: MLM Medical Labs, D-41066 Mönchengladbach, Germany; Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany.

Meryem Ouzin: Present address: Institute of Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany; Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany.

*Corresponding author: Doreen Manuela Floss, Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany, E-mail: doreen.floss@uni-duesseldorf.de.
<https://orcid.org/0000-0002-6675-5313>

Lynn Affrica Felicitas Baumgärtner, Julia Ettich, Helene Balles, Dorothee Johanna Lapp, Sofie Mossner, Christin Bassenge, Meryem Ouzin and Jürgen Scheller, Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany.
<https://orcid.org/0000-0003-2387-8935> (D.J. Lapp). <https://orcid.org/0000-0002-9609-1642> (M. Ouzin). <https://orcid.org/0000-0001-9932-1055> (J. Scheller)

Helmut Hanenberg, Department of Otorhinolaryngology and Head/Neck Surgery, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany; and Department of Pediatrics III, University Children's Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, D-45122 Essen, Germany. <https://orcid.org/0000-0003-0451-2735>

Abstract: Naturally occurring gain-of-function (GOF) mutants have been identified in patients for a variety of cytokine receptors. Although this constitutive activation of cytokine receptors is strongly associated with malignant disorders, ligand-independent receptor activation is also a useful tool in synthetic biology e.g. to improve adoptive cellular therapies with genetically modified T-cells. Balanced Interleukin (IL-7) signaling via a heterodimer of IL-7 receptor (IL-7R α) and the common γ -chain (γ c) controls T- and B-cell development and expansion, whereas uncontrolled IL-7 signaling can drive acute lymphoid leukemia (ALL) development. The ALL-driver mutation PPCL in the transmembrane domain of IL-7R α is a mutational insertion of the four amino acids proline-proline-cysteine-leucine and leads to ligand-independent receptor dimerization and constitutive activation. We showed here in the cytokine-dependent pre-B-cell line Ba/F3 that the PPCL-insertion in a synthetic version of the IL-7R α induced γ c-independent STAT5 and ERK phosphorylation and also proliferation of the cells and that booster-stimulation by artificial ligands additionally generated non-canonical STAT3 phosphorylation via the synthetic IL-7R α -PPCL-receptors. Transfer of the IL-7R α transmembrane domain with the PPCL insertion into natural and synthetic cytokine receptor chains of the IL-6, IL-12 and Interferon families also resulted in constitutive receptor signaling. In conclusion, our data suggested that the insertion of the mutated PPCL IL-7R α transmembrane domain is an universal approach to generate ligand-independent, constitutively active cytokine receptors.

Keywords: gain-of-function receptors; signal transduction; interleukin; synthetic receptors; receptor homo-dimerization

1 Introduction

The four α -helical bundle cytokine Interleukin (IL-7) binds class I cytokine receptors and belongs to the common γ -chain receptor (γ c) family, which also includes the cytokines IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, and IL-21 (Kondo et al. 1994; Kondo

et al. 1993; Ozaki and Leonard 2002). IL-7 activates a specific receptor complex consisting of IL-7R α (CD127) and the common γ -chain receptor (γ c, CD132), that predominantly signals through JAK1 (associated with IL-7R α), JAK3 (associated with γ c), and STAT5, but also induces signaling events through non-canonical STAT1, STAT3, PI3K/AKT, and MEK/ERK pathways (Winer et al. 2022). Additionally, heterodimers of IL-7R α with the cytokine receptor like factor 2 (CRLF2) constitutes the receptor complex for thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Here, TSLP signaling results in JAK3-independent STAT5 phosphorylation (Tsilingiri et al. 2017).

Within the hematopoietic system, IL-7 stimulates the proliferation of B-cell precursors, thymocytes and mature T-cells and is required during early lymphoid development for thymocyte expansion (Peschon et al. 1994). About 10 % of blasts from patients with T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukemia (T/B-ALL) have short in-frame insertions within the IL-7R α protein (Shochat et al. 2014; Zenatti et al. 2011; Zhang et al. 2012), that introduce an unpaired cysteine extracellularly or within the transmembrane domain. These unpaired cysteine residues can cause the formation of intermolecular disulfide bonds and ligand-independent IL-7R α homo-dimerization, which in turn activates constitutive JAK1 and STAT5 phosphorylation (Shochat et al. 2014; Zenatti et al. 2011; Zhang et al. 2012). Importantly, these IL-7R α -mutant cells undergo cell death upon suppression of JAK-STAT signaling, indicating that these ALL blasts heavily rely on this signaling pathway for survival (Porcu et al. 2012; Shochat et al. 2014; Zenatti et al. 2011; Zhang et al. 2012).

A prototypical activating mutation in T/B-ALL is the insertion of the four amino acid motif proline-proline-cysteine-leucine (PPCL) within the transmembrane domain of the IL-7R α which resulted in homo-dimerization of the mutated IL-7R α , as shown by the detection of dimeric IL-7R α under non-reducing conditions (Shochat et al. 2011). Here, the mutated IL-7R α receptor chain was still expressed at normal levels on the cell surface, but did not require exogenous IL-7 for signaling (Shochat et al. 2011). Furthermore, the IL-7R α PPCL variant was used in a transgenic mouse model for B-ALL as conditional mutant IL-7R knock-in gene expressed under the normal physiological promoter (Almeida et al. 2021) and for the *in vivo* expansion of human T-cells either expressing chimeric antigen receptors (CARs) (Perna et al. 2014; Shum et al. 2017) or being directed against Epstein–Barr Virus (EBV) (Sharma et al. 2023).

These findings let us hypothesize that the addition of an unpaired cysteine into transmembrane or juxtamembrane domains could be a general mechanism for the activation of class I cytokine receptors. As the insertion of a few amino acids with an unpaired cysteine into the transmembrane

domain of a synthetic cytokine receptor is a comparably small protein modification, the likelihood for it to spontaneously occur in (pre-)malignant cells appears to be rather high, when compared to other ligand-independent mutations in constitutively active cytokine receptors, which typically depend on larger modifications of the extracellular domain (Floss and Scheller 2019). Designing complete replacement of the extracellular domain by dimerizers or by deletion of amino acids in domains of the extracellular region (summarized in Floss and Scheller 2019), the correct folding of the receptor chains can be disturbed and the constitutive activation is mainly mediated by the intracellularly retained receptors, as shown for mutations in the IL-6 receptor gp130 (Rebouissou et al. 2009; Schmidt-Arras et al. 2014).

Here, we selected the IL-7R α transmembrane domain with PPCL insertion (Shochat et al. 2011) to analyze if this mutated domain has transformative capacity in the context of unrelated class I and II cytokine receptors. We chose natural and synthetic gp130 chains as shared receptors of the IL-6 cytokine family (Rose-John et al. 2023), natural and synthetic IL-23R proteins as members of the IL-12 cytokine family (Engelowski et al. 2018), and synthetic IFNAR2 molecule as a member of the class II IFN receptor family (Zoellner et al. 2022). In all cases, stable expression of the IL-7R α transmembrane domain with the PPCL insertion conferred ligand-independent, cell-autonomous signaling by the engineered synthetic cytokine receptors.

2 Results

2.1 Insertion of the four amino acids PPCL into the transmembrane domain of synthetic IL-7R α induces canonical and non-canonical IL-7 signaling

The PPCL insertion in the IL-7R α (Shochat et al. 2011) was introduced into our synthetic IL-7 receptor V_cIL-7R α , where we had replaced the complete extracellular domain of the IL-7R α with the single domain antibody (VHH, nanobody) directed against mCherry called V_c (Supplementary Figure 1). As described previously, replacing the extracellular domains of cytokine receptors by nanobodies directed against green fluorescent protein (GFP) or mCherry resulted in synthetic cytokine receptors (SyCyRs), in which receptor activation can readily be induced by homo- and heterodimeric ligands consisting of GFP and mCherry (Engelowski et al. 2018). Albeit this principle was highly efficient for the cytokine receptors of the IL-6, IL-23 and IFN families, we

previously had failed to activate IL-7 signaling using synthetic V_CIL-7Ra (Supplementary Figure 1), as no induction of STAT5 phosphorylation and no proliferation of the Ba/F3 cells after synthetic receptor stimulation occurred, suggesting that functional synthetic homodimers of V_CIL-7Ra induced by the dimeric mCherry ligands (CC) or heterodimeric V_CIL-7Ra and V_Gyc induced by heterodimeric GFP-mCherry ligands (GC) were not formed at all or at least not sufficiently to induce signaling (Supplementary Figure 1).

To force activation of V_CIL-7Ra, we introduced the four additional amino acids PPCL into the transmembrane domain resulting in the variant V_CIL-7Ra_{PPCL} (Figure 1A) and transiently expressed this protein in HEK293T cells. In contrast to V_CIL-7Ra, V_CIL-7Ra_{PPCL} conferred constitutive and ligand-independent STAT5 and ERK phosphorylation in the transfected HEK293T cells (Figure 1B). Of note, stimulation of these cells with dimeric mCherry ligands even boosted STAT5 and ERK phosphorylation above the constitutive activation level.

Next, Ba/F3 cells stably expressing V_CIL-7Ra_{PPCL} or the inactive V_CIL-7Ra_{PPGL} variants were generated. V_CIL-7Ra_{PPGL} cells carried a similar 4-amino acid insertion motif but with the cysteine being replaced by glycine (Shochat et al. 2011). As shown by flow cytometry, V_CIL-7Ra_{PPCL} and V_CIL-7Ra_{PPGL} were stably expressed on the cell surface of Ba/F3 cells (notably, the V_CIL-7Ra_{PPCL} construct was expressed at lower levels on the cell surface compared to V_CIL-7Ra_{PPGL}) (Figure 1C). Expression of V_CIL-7Ra_{PPCL} in Ba/F3 cells led to cellular proliferation based on ligand-independent phosphorylation of STAT5 and ERK (Figure 1D and E). Additional stimulation of Ba/F3-V_CIL-7Ra_{PPCL} cells with IL-3 slightly increased STAT5 phosphorylation, but did not lead to a significantly increased proliferation of Ba/F3-V_CIL-7Ra_{PPCL} cells. In contrast, stimulation with dimeric mCherry (CC) in these cells boosted STAT5 and ERK phosphorylation and cellular proliferation, and also induced phosphorylation of STAT3 (Figure 1D, Supplementary Figure 2), as described by others (Fridy et al. 2014; Lin et al. 1995). Importantly, co-incubation with the pan-Janus kinase (JAK) inhibitor P6 inhibited STAT3, STAT5 and ERK phosphorylation as well as cellular proliferation of Ba/F3-V_CIL-7Ra_{PPCL} cells (Figure 1D and E).

In the Ba/F3-V_CIL-7Ra_{PPGL} cells, STAT5 and ERK phosphorylation was strongly induced by IL-3, but only weakly detectable after incubation with CC (Figure 1D), reflected by the fact that CC stimulation did not have any effect on cell proliferation (Figure 1E). Since Ba/F3 cells lack expression of the common γ -chain (cy), it was obvious that STAT3, STAT5 and ERK signaling was induced by homodimeric

V_CIL-7Ra_{PPCL} receptor complexes. Signaling of these homodimers already occurred without any ligand present and can be further enhanced by either IL-3 or the CC dimer exposure of the cells. However, these homodimers can only form in sufficient quantities, if a cysteine is present in the IL-7Ra transmembrane domain, as the PPGL insertion completely abrogated constitutive receptor dimerization and signaling (Figure 1F).

2.2 Constitutive activation of synthetic type I interferon α/β receptor 2 chain (IFNAR2)

In a first step, we introduced the PPCL and PPGL transmembrane domains of the IL-7Ra into the synthetic type I Interferon α/β receptor 2 chain (IFNAR2). Since IFN signaling mainly induce STAT1 and STAT2 phosphorylation, IFN signaling did not induce cellular proliferation of Ba/F3 cells. Therefore, we transiently expressed the V_GIFNAR2_{PPCL}, V_CIFNAR2_{PPCL} and V_GIFNAR2_{PPGL}, V_CIFNAR2_{PPGL} variants (Figure 2A) in HEK293 cells, which are better suited to analyze IFN signaling (Zoellner et al. 2022). The expression of HA-tagged V_CIFNAR2_{PPCL} and V_CIFNAR2_{PPGL} as well as myc-tagged V_GIFNAR2_{PPCL} and V_GIFNAR2_{PPGL} constructs was verified by Western Blot (Figure 2B and C). V_GIFNAR2_{PPCL} and V_CIFNAR2_{PPCL} induced sustained ligand-independent STAT1 and STAT2 phosphorylation, which was not seen for the PPGL variants. The addition of P6 verified that STAT phosphorylation was dependent on JAK activation (Figure 2B and C). Stimulation of PPCL variants with GG or CC interestingly did not boost STAT1/2 phosphorylation but resulted in STAT1/2 activation of the PPGL variants. As we recently demonstrated that synthetic IFNAR2 chains are biologically active as a homodimer (Zoellner et al. 2022), we investigated the receptor dimerization via disulfide-bridges in lysates of transiently transfected HEK293T cells under reducing (+ β -Me) and non-reducing (– β -Me) conditions. As shown in Figure 2D, marked homodimers of V_GIFNAR2_{PPCL} were present under non-reducing conditions, whereas the V_GIFNAR2_{PPGL} receptors did not show any dimer formation. Additionally, significant reduction of receptor dimerization and no ligand-independent STAT1 and STAT2 phosphorylation were obtained with V_GIFNAR2_{PPGL} thus confirming the importance of the cysteine for dimerization and abnormal signaling (Figure 2D and E).

To verify that the dimerization of synthetic IFNAR2_{PPCL} is mediated via a disulfide-bridge between the cysteines of the PPCL insertions, the natural occurring cysteine at

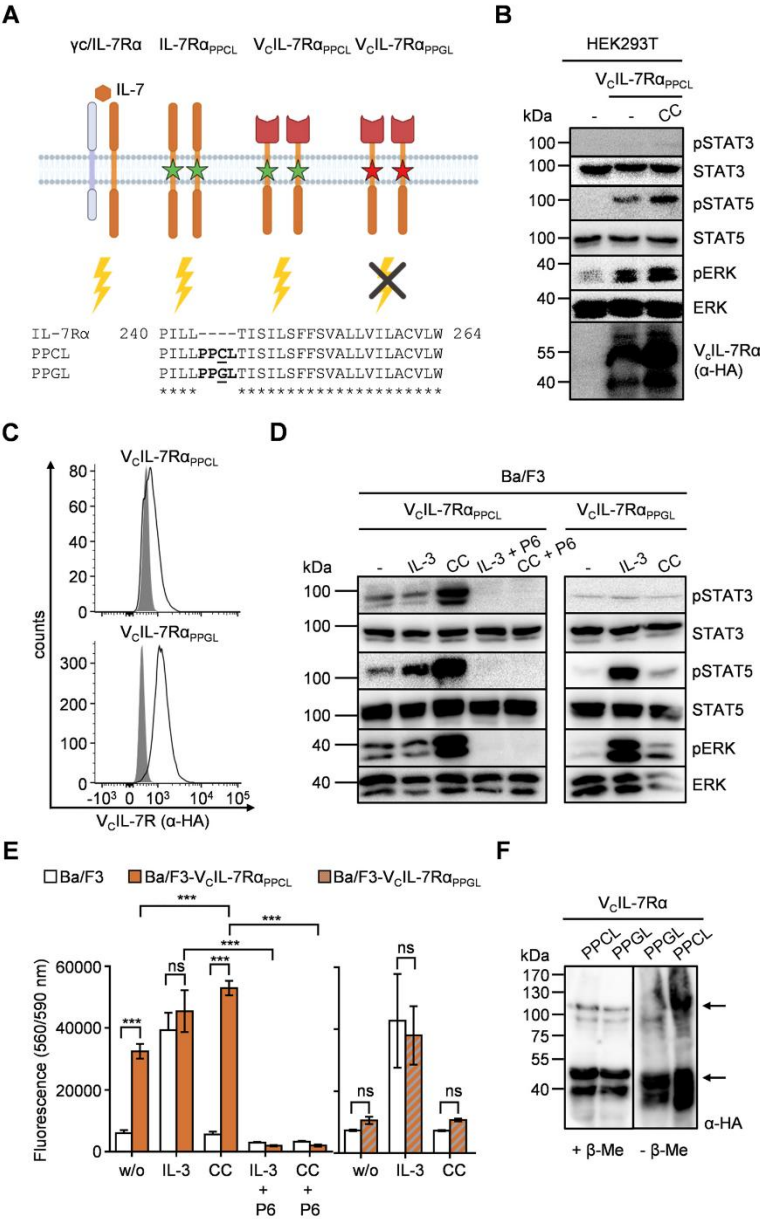


Figure 1: Synthetic IL-7Rα induces IL-7 signaling through PPCL insertion in the transmembrane domain. (A) Schematic overview of IL-7 signaling via natural occurring receptors yc and IL-7Rα, ligand-independent activation via PPCL insertion in the transmembrane domain of IL-7Rα homodimers, and synthetic IL-7Rα variants containing the PPCL or PPGL insertions in the transmembrane domain. In the synthetic receptors, the extracellular domain of IL-7Rα was replaced by a nanobody directed against mCherry (V_C), which is activated by dimeric mCherry ligand (CC). The alignment depicts the

position 261 of the IL-7R α transmembrane domain was mutated to glycine (C261G). C261 is located 17 aa distant from the PPCL insertion. The resulting variant V_CIL7R α PPCL+C261G still induced sustained ligand-independent STAT1 and STAT2 activation (Figure 2F), demonstrating the disulfide-bridge formed between two PPCL motifs is solely responsible for the dimerization of the receptors.

2.3 Constitutive activation of natural and synthetic variants of the IL-6 receptor gp130

Having shown that the PPCL insertion is also working in an unrelated synthetic receptor, the IL-7R α PPCL transmembrane domain was introduced into the (natural) IL-6 signal transducing gp130 receptor (Figure 3A). Immunoblot analysis under non-reducing conditions showed that the gp130_{PPCL} is mostly present as dimer compared to the PPGL variant (Figure 3B). Next, N-terminally myc-tagged gp130_{PPCL} was expressed on the cell surface of Ba/F3-gp130 cells (Figure 3C). As shown in Figure 3D and E, introducing gp130_{PPCL} into Ba/F3-gp130 cells resulted in ligand-independent activation of STAT3 phosphorylation and cellular proliferation, which was blocked by the addition of the pan-JAK inhibitor P6. As a control, cells were stimulated with Hyper-IL-6 (HIL-6), a fusion protein of IL-6 and the soluble IL-6R (Fischer et al. 1997), to induce STAT3 phosphorylation and cellular proliferation in Ba/F3-gp130 cells, which was also blocked by P6 (Figure 3D and E).

The IL-7R transmembrane domain with the PPCL insertion was also introduced in the synthetic gp130 variant V_Ggp130, where the extracellular domain was exchanged with the VHH domain directed against GFP (V_G) (Engelowski et al. 2018; Scheller et al. 2023) (Figure 4A). The cDNAs coding for V_Ggp130_{PPCL} and V_Ggp130_{PPGL} were stably introduced into Ba/F3-gp130 cells and the surface expression of the N-terminally myc-tagged receptors confirmed by flow cytometry using α -myc specific antibodies (Figure 4B).

Although V_Ggp130_{PPCL} had a lower expression level on the Ba/F3 cell surface compared to V_Ggp130_{PPGL} cells, Ba/F3-gp130 expressing V_Ggp130_{PPCL} but not V_Ggp130_{PPGL} showed ligand-independent STAT3 phosphorylation and cellular proliferation (Figure 4C and D). STAT3 phosphorylation and proliferation of Ba/F3-gp130-V_Ggp130_{PPGL} was only observed after stimulation with dimeric GFP for V_Ggp130_{PPGL} or HIL-6 for natural gp130 as receptor ligand. The pan-JAK inhibitor P6 suppressed STAT3 phosphorylation and cellular proliferation of Ba/F3-gp130-V_Ggp130_{PPCL} and Ba/F3-gp130-V_Ggp130_{PPGL} cells (Figure 4C and D). Our data showed, that natural and synthetic constitutive gp130 receptor signaling can be achieved by the introduction of the PPCL transmembrane domain of IL-7R α into the gp130 chain.

2.4 Constitutive activation of synthetic and natural IL-23 receptor

Finally, the natural transmembrane domain of the human IL-23R was replaced by the IL-7R α PPCL and PPGL transmembrane domains (Figure 5A) and the expression of IL-23R_{PPCL} and IL-23R_{PPGL} in Ba/F3-gp130 cells verified by flow cytometry using IL-23R specific antibodies (Figure 5B). As expected, IL-23R_{PPCL} induced ligand-independent STAT3 phosphorylation and cellular proliferation (Figure 5C and D), which was boosted by the addition of Hyper-IL-23 (HIL-23, Figure 5C and D), a fusion protein composed of the p19 and p40 subunits of IL-23 connected via a flexible peptide linker (Oppmann et al. 2000). Signal transduction via IL-23R_{PPGL} was only observed after the addition of HIL-23. Stimulation by HIL-6 served as internal control and induced signal transduction via gp130 in all Ba/F3-gp130 cell lines used, while co-incubation with the pan-JAK inhibitor P6 suppressed signal transduction of all normal and synthetic receptors tested (Figure 5C and D).

Similar to V_Ggp130_{PPCL}, the PPCL and PPGL transmembrane domains of the IL-7R α were transferred to

gain-of-function insertion (PPCL) within the transmembrane domain of IL-7R α . (B) STAT5 and ERK activation in HEK293T cells transiently expressing V_CIL-7R α PPCL treated with 100 ng/ml CC for 30 min or left untreated. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3, phospho-STAT5 and STAT5, phospho-ERK and ERK, and V_CIL-7R α PPCL (HA-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three. (C) Flow cytometry analysis of HA-tagged synthetic receptors on the surface of Ba/F3 cells expressing V_CIL-7R α PPCL and V_CIL-7R α PPGL, indicated as solid line. Gray-shade area indicates non-transfected Ba/F3 cells (negative control). (D) STAT3, STAT5, and ERK activation in Ba/F3 cells expressing V_CIL-7R α PPCL (left), and V_CIL-7R α PPGL (right) treated with 0.2 % (v/v) IL-3, 100 ng/ml CC for 30 min, and if indicated in presence of 10 μ M pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3, STAT3, phospho-STAT5, STAT5, phospho-ERK and ERK. Western blot data shows one representative experiment out of three. (E) Proliferation of Ba/F3 cells expressing V_CIL-7R α PPCL and V_CIL-7R α PPGL without cytokine (w/o), with 0.2 % (v/v) IL-3, 100 ng/ml CC, or 10 μ M pan-JAK inhibitor P6 in presence of cytokines. Error bars, SD. One representative experiment out of three is shown. Statistical analysis used two-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, *** $p \leq 0.001$, ns not significant. (F) Analysis of receptor homo-dimerization under non-reducing conditions. Western blot analysis of HEK293T cells transfected with V_CIL-7R α PPCL, and V_CIL-7R α PPGL under reducing (+ β -Me) or non-reducing (– β -Me) conditions. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting V_CIL-7R α (HA-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three.

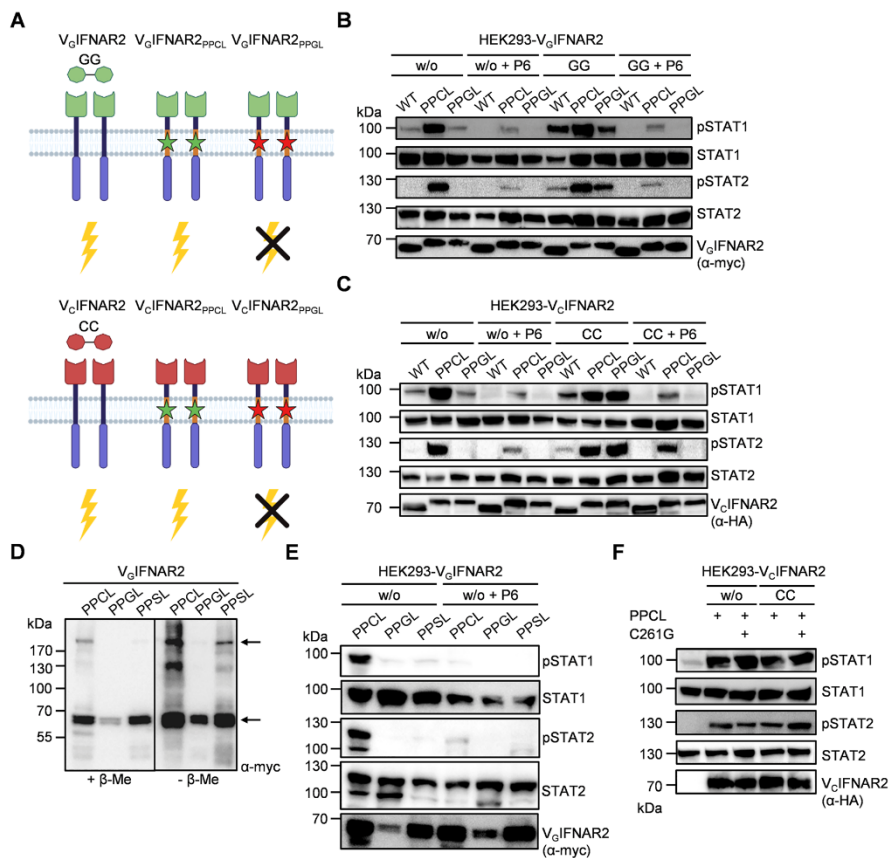


Figure 2: Type I IFN receptor signaling is activated ligand-independent via IL-7Ra transmembrane domain with PPCL insertion. (A) Schematic overview of synthetic IFNAR2 receptors. In the synthetic receptors, the extracellular domain of IFNAR2 was replaced by nanobodies directed against GFP (V_G, green) or mCherry (V_C, red). Synthetic IFNAR2 receptor (V_GIFNAR2), synthetic chimeric IFNAR2 with IL-7Ra transmembrane domain containing PPCL (V_GIFNAR2_{PPCL}), or PPGL (V_GIFNAR2_{PPGL}) insertion is activated by dimeric GFP (GG, upper panel). Synthetic IFNAR2 receptor (V_CIFNAR2), synthetic chimeric IFNAR2 with IL-7Ra transmembrane domain containing PPCL (V_CIFNAR2_{PPCL}), or PPGL (V_CIFNAR2_{PPGL}) insertion is activated by dimeric mCherry (CC, lower panel). (B) STAT1 and STAT2 activation in HEK293 cells transiently expressing V_GIFNAR2_{PPCL} (PPCL), V_GIFNAR2_{PPGL} (PPGL), and V_GIFNAR2 (WT) were treated with 100 ng/ml GG ligand for 30 min, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, phospho-STAT2 and STAT1, STAT2, and V_GIFNAR2 (myc-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three. (C) STAT1 and STAT2 activation in HEK293 cells transiently expressing V_CIFNAR2_{PPCL} (PPCL), V_CIFNAR2_{PPGL} (PPGL), and V_CIFNAR2 (WT) were treated with 100 ng/ml CC ligand for 30 min, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, phospho-STAT2 and STAT1, STAT2, and V_CIFNAR2 (myc-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three. (D) Analysis of receptor homo-dimerization under non-reducing conditions. Western blot analysis of HEK293T cells transfected with V_GIFNAR2_{PPCL}, V_GIFNAR2_{PPGL} or V_GIFNAR2_{PPSL} under reducing (+β-Me) or non-reducing (-β-Me) conditions. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting V_GIFNAR2 (myc-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of two. (E) STAT1 and STAT2 activation in HEK293 cells transfected with V_GIFNAR2_{PPCL}, V_GIFNAR2_{PPGL} or V_GIFNAR2_{PPSL} without stimulation, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, phospho-STAT2 and STAT1, STAT2, and V_GIFNAR2 (myc-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three. (F) STAT1 and STAT2 activation in HEK293 cells transfected with V_CIFNAR2_{PPCL}, V_CIFNAR2_{PPGL} or V_CIFNAR2_{PPSL} with additional C261G mutation in the transmembrane domain were treated with 100 ng/ml CC ligand for 30 min or left untreated (w/o). Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT1, phospho-STAT2 and STAT1, STAT2, and V_CIFNAR2 (HA-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of three.

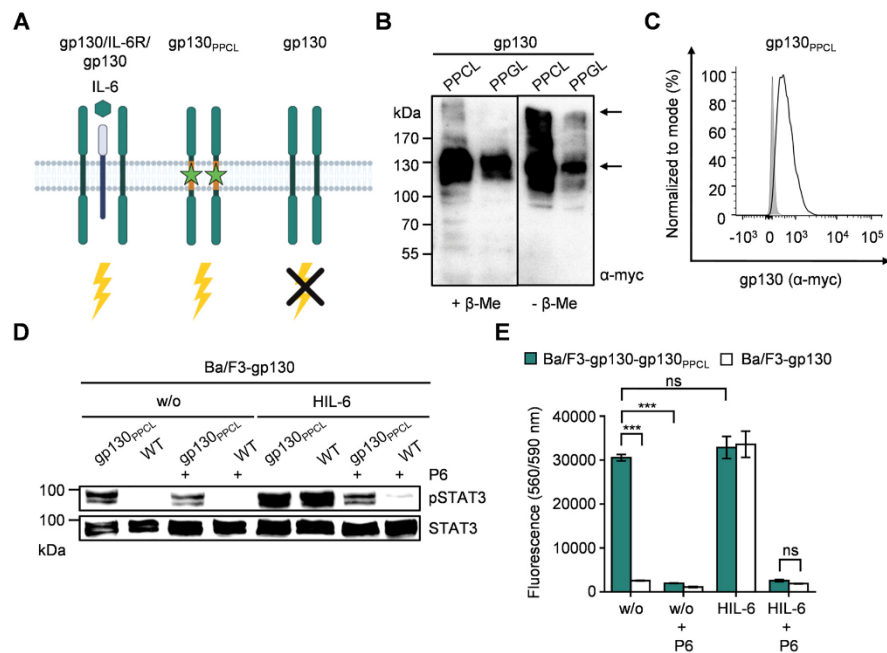


Figure 3: Constitutive activation of the full-length chimeric IL-6 receptor gp130. (A) Schematic overview of activation via natural IL-6 receptor gp130 signaling and full-length chimeric IL-6 receptor gp130 containing the IL-7Ra transmembrane domain with PPCL. (B) Analysis of receptor homo-dimerization under non-reducing conditions. Western blot analysis of HEK293T cells transfected with gp130_{PPCL} or gp130_{PPGL} under reducing (+β-Me) or non-reducing (-β-Me) conditions. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting gp130 (myc-tagged). Western blot data shows one representative experiment out of two. (C) Cell surface analysis of Ba/F3-gp130 cells expressing myc-tagged gp130_{PPCL}, detected by myc-directed antibody, indicated as solid line. Gray-shade area indicates non-transfected Ba/F3-gp130 cells (negative control). (D) STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing gp130_{PPCL} without stimulation (w/o), treated with 10 ng/ml HIL-6, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Ba/F3-gp130 served as wild-type control (WT). Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3, STAT3. Western blot data shows one representative experiment out of three. (E) Proliferation of Ba/F3-gp130 cells and Ba/F3-gp130 cells expressing gp130_{PPCL} without cytokine (w/o), with 10 ng/ml HIL-6, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Error bars, SD. One representative experiment out of three is shown. Statistical analysis used two-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, *** $p \leq 0.001$, ns, not significant.

synthetic V_GIL-23R resulting in V_GIL-23R_{PPCL} and V_GIL-23R_{PPGL} (Figure 6A). Expression of N-terminally myc-tagged V_GIL-23R_{PPCL} and V_GIL-23R_{PPGL} in Ba/F3-gp130 cells was verified by flow cytometry using α-myc specific antibodies, revealing again lower expression levels of V_GIL-23R_{PPCL} on the cell surface compared to V_GIL-23R_{PPGL} (Figure 6B). Still, Ba/F3-gp130-V_GIL-23R_{PPCL} cells showed ligand-independent STAT3 phosphorylation and cellular proliferation likely due to IL-23R homo-dimerization (Engelowski et al. 2018). As seen for V_CIL-7Ra_{PPCL}, stimulation with GG boosted the phosphorylation of STAT3, albeit not the proliferation of the cells under the conditions analyzed. V_GIL-23R_{PPGL} was not constitutively active, but STAT3 phosphorylation and cellular proliferation was induced by stimulation with the

GG ligand (Figure 6C and D). P6 inhibited STAT3 phosphorylation and cellular proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing V_GIL-23R_{PPCL} or V_GIL-23R_{PPGL}, respectively (Figure 6C and D). The data presented here showed that the introduction of the PPCL transmembrane domain of IL-7Ra was also sufficient to induce ligand-independent activation of natural and synthetic IL-23Rs.

3 Discussion

Naturally occurring ligand-independent constitutively active cytokine receptors were identified in patients with direct contribution to disease development. The molecular

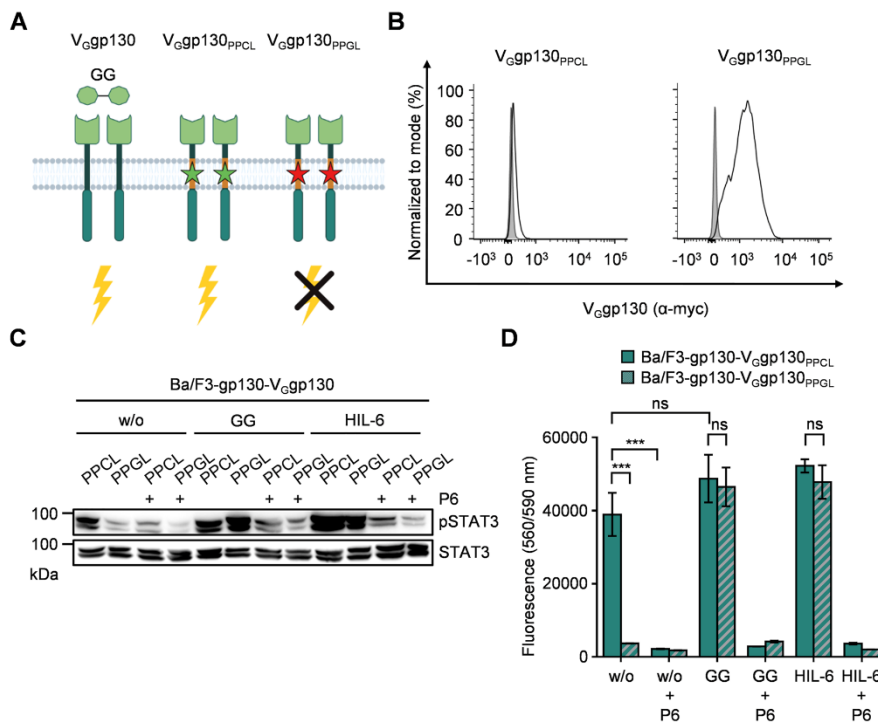


Figure 4: Synthetic IL-6 receptor gp130 is constitutively activated through the IL-7Ra transmembrane domain with PPCL insertion. (A) Schematic overview of IL-6 signaling via the synthetic gp130 receptor, and the chimeric gp130 receptor variants containing the IL-7Ra transmembrane domain with PPCL, or PPGL insertion. The extracellular domain of gp130 was replaced by a nanobody directed against GFP (V_G), which is activated by dimeric GFP ligand (GG). (B) Cell surface analysis of Ba/F3-gp130 cells expressing myc-tagged V_Ggp130_{PPCL} and V_Ggp130_{PPGL} detected by myc-directed antibody, indicated as solid line. Gray-shade area indicates non-transfected Ba/F3-gp130 cells (negative control). (C) STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing V_Ggp130_{PPCL} and V_Ggp130_{PPGL} without stimulation (w/o), treated with 100 ng/ml GG, 10 ng/ml HIL-6, and if indicated in presence of 10 μ M pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3, STAT3. Western blot data shows one representative experiment out of three. (D) Proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing V_Ggp130_{PPCL} and V_Ggp130_{PPGL} without cytokine (w/o), with 10 ng/ml HIL-6, 100 ng/ml GG, or 10 μ M pan-JAK inhibitor P6 in presence of cytokines. Error bars, SD. One representative experiment out of three is shown. Statistical analysis used two-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, *** $p \leq 0.001$, ns, not significant.

basis for these gain-of-function receptors are mutations within the extracellular, transmembrane or intracellular domains. These natural principles were used to develop synthetic constitutive active cytokine receptors (reviewed in Floss and Scheller 2019).

Several constitutively active IL-7Ra variants, which form homodimers due to cysteine insertions within the transmembrane domain, have been reported in T-ALL patients (Campos et al. 2019; Shochat et al. 2011; Shochat et al. 2014; Zenatti et al. 2011; Zhang et al. 2012). One example is the insertion of cysteine, proline and threonine (c.731_732insTTGTCCAC, p.Thr244_Ile245insCysProThr, CPT) in the transmembrane domain of IL-7Ra (abbreviated

as C7R), which results in constitutive hyperactivation of IL-7 signaling independent of γc and JAK3 (Zenatti et al. 2011). The introduction of this unpaired cysteine into the IL-7Ra transmembrane domain leads to dimerization of mutated receptor chains via disulfide bonds, resulting in stable IL-7Ra homodimers that signal independently of IL-7, γc and JAK3 (Campos et al. 2019; Zenatti et al. 2011). Importantly, IL-7Ra CPT dimerization and constitutive signaling were completely abrogated upon substitution of the mutated cysteine to alanine or serine (Zenatti et al. 2011). Mechanistically, the C7R IL-7Ra variant with constitutive STAT5 activation provides a consistent signal 3 for optimal T-cell activity and expansion, complementing

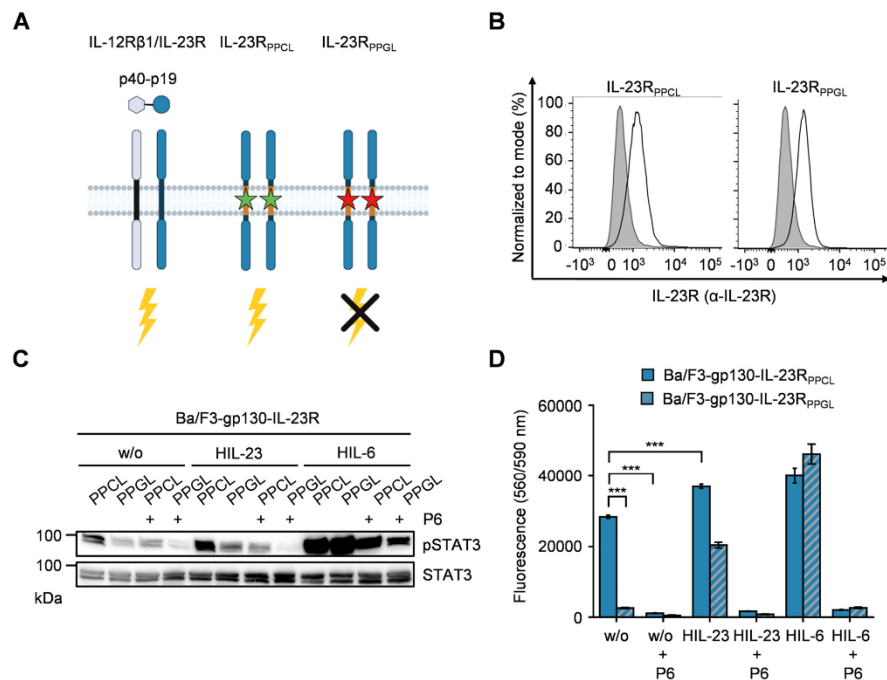


Figure 5: Constitutive activation of the full-length chimeric IL-23R. (A) Schematic overview of IL-23-mediated signaling via IL-12Rβ1 and IL-23R, full-length chimeric IL-23R containing the IL-7Ra transmembrane domain with PPCL, or PPGL insertion. IL-23 is a heterodimeric cytokine consisting of p40 and p19. (B) Cell surface analysis of Ba/F3-gp130 cells expressing IL-23R_{PPCL} and IL-23R_{PPGL} detected via IL-23R-directed antibody, indicated as solid line. Gray-shade area indicates non-transfected Ba/F3-gp130 cells (negative control). (C) STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 cells expressing IL-23R_{PPCL} and IL-23R_{PPGL} without stimulation (w/o), treated with 10 ng/ml HIL-23, 10 ng/ml HIL-6, and if indicated in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μg/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3 and STAT3. Western blot data shows one representative experiment out of three. (D) Proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing IL-23R_{PPCL} and IL-23R_{PPGL} without cytokine (w/o), with 10 ng/ml HIL-23, 10 ng/ml HIL-6, or in presence of 10 μM pan-JAK inhibitor P6. Error bars, SD. One representative experiment out of three is shown. Statistical analysis used two-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, *** $p \leq 0.001$, ns, not significant.

signal 1 from the T-cell receptor and signal 2 from a co-stimulation unit (Etzeberria et al. 2020).

To improve their adoptive cellular product, Shum et al. included the C7R IL-7Ra variant into their lentiviral CAR expression vector and showed enhanced persistence and anti-tumor activity of the CAR T-cells in xenograft models of neuroblastoma and glioblastoma (Shum et al. 2017). C7R co-expression also improved antitumor activity of CAR T-cells against triple-negative breast cancer both *in vitro* and *in vivo* (Zhao et al. 2020). The C7R IL-7Ra chain with a CD34-derived ectodomain was further evaluated in EBV-specific T-cells (EBVSTs), where it enhanced EBVST proliferation and maintained EBV antigen specificity *in vitro* and the persistence and anti-tumor activity of EBVSTs *in vivo* (Sharma et al. 2023). Currently, C7R-EBVSTs are evaluated in

a clinical trial for the treatment of refractory or relapsed EBV-positive lymphoma (NCT04664179). Interestingly, a conditional *knock-in* model, in which the CPT mutant IL-7Ra is expressed at physiological levels under the endogenous promoter, established a pre-leukemic stage in these mice where >60 % of the animals after 80 weeks spontaneously developed progressive B-cell leukemias (Almeida et al. 2021). This study very elegantly demonstrated that IL-7Ra mutational activation, even without overexpression, is sufficient to trigger leukemogenesis, most likely via STAT5, PI3K/mTOR and MYC signaling (Almeida et al. 2021), and that these unpaired cysteine insertion will be helpful to characterize new molecular and cellular players in B-ALL development.

We selected another activating mutation of the IL-7Ra in this study, the IL-7Ra PPCL insertion (c.819ins12, p.P243insPPCL)

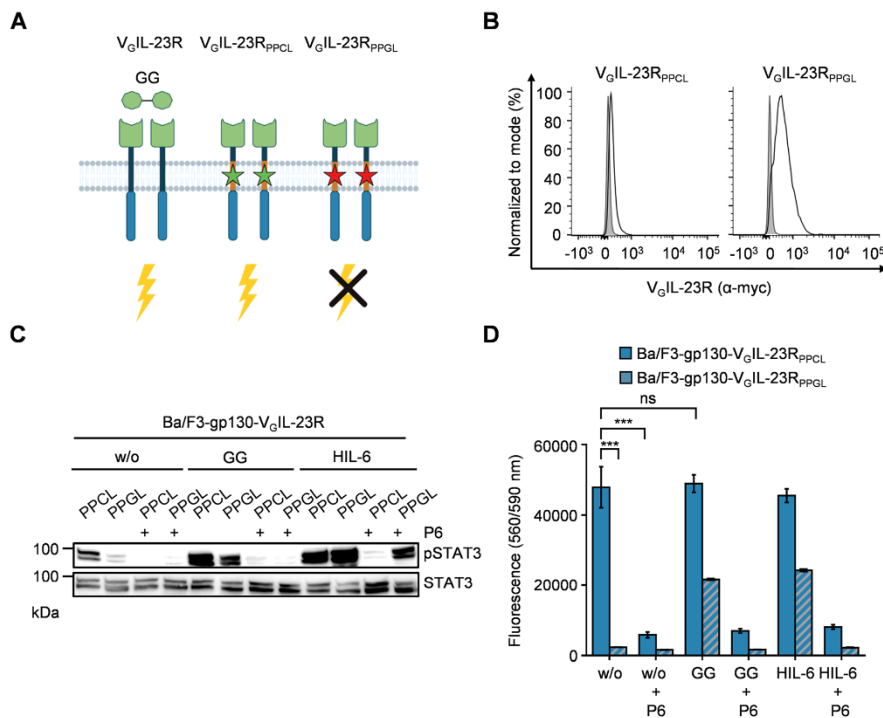


Figure 6: Synthetic IL-23R is constitutively activated through the IL-7R α transmembrane domain with PPCL insertion. (A) Schematic overview of synthetic IL-23 signaling via the synthetic IL-23 receptor, and the chimeric IL-23 receptor variants containing the IL-7R α transmembrane domain with PPCL, or PPGL insertion. The extracellular domain of IL-23R was replaced by a nanobody directed against GFP (V_G), which is activated by dimeric GFP ligand (GG). (B) Cell surface analysis of Ba/F3-gp130 cells expressing myc-tagged V_G IL-23R_{PPCL} and V_G IL-23R_{PPGL}, detected by myc-directed antibody, indicated as solid line. Gray-shade area indicates non-transfected Ba/F3-gp130 cells (negative control). (C) STAT3 phosphorylation in Ba/F3-gp130 expressing V_G IL-23R_{PPCL} and V_G IL-23R_{PPGL} without stimulation (w/o), treated with 100 ng/ml GG or 10 ng/ml HIL-6, and if indicated in presence of 10 μ M pan-JAK inhibitor P6. Equal amounts of proteins (50 μ g/lane) were analyzed via specific antibodies detecting phospho-STAT3, STAT3. Western blot data shows one representative experiment out of three. (D) Proliferation of Ba/F3-gp130 cells expressing V_G IL-23R_{PPCL} and V_G IL-23R_{PPGL} without cytokine (w/o), with 10 ng/ml HIL-6, 100 ng/ml GG, or 10 μ M pan-JAK inhibitor P6 in presence of cytokines. Error bars, SD. One representative experiment out of three is shown. Statistical analysis used two-way ANOVA, followed by Bonferroni correction, *** $p \leq 0.001$, ns, not significant.

(Shochat et al. 2011), which also led to murine B-ALL in genetically engineered mice (Thomas et al. 2022). Consistent with previous findings (Shochat et al. 2011; Thomas et al. 2022), IL-7R α PPCL induced IL-3-independent growth and constitutive STAT5 phosphorylation in Ba/F3 cells and ligand-independent receptor protein dimerization under non-reducing conditions, in contrast to IL-7R α PPGL. We then went a step further and transferred the IL-7R α PPCL into our synthetic cytokine receptor system, based on nanobodies directed against GFP or mCherry fused to truncated cytokine receptors (Engelowski et al. 2018), and confirmed ligand independent receptor dimerization, STAT5 activation and proliferation of Ba/F3 cells with V_G IL-7R α PPCL. Based on an older report showing that the

erythropoietin receptor was activated by the experimental insertion of a cysteine into its transmembrane domain, leading to ligand-independent receptor dimerization (Lu et al. 2006), we decided here to systematically decipher whether the inclusion of PPCL-mutated IL-7R α transmembrane domain as (surrogate) replacement in natural and synthetic cytokine receptors of the IL-6, IL-12 and Interferon families will also generate ligand-independent constitutively active receptors. Corresponding receptors with the IL-7R α transmembrane domain with PPGL or PPSL insertion served as controls and showed no ligand-independent receptor dimerization, no constitutive activation of signaling pathways and no cellular proliferation. Importantly, we demonstrated here that transfer of the PPCL

transmembrane domain from IL-7Ra induced ligand-independent, constitutively signaling of class I and II cytokine receptors using both native and synthetic receptor variants. Therefore, using short unpaired cysteine insertions is an exciting new tool for the generation and functional analysis of gain-of-function receptors. However, a note of caution is needed here as the insertion of a cysteine does not automatically imply the generation of a gain-of-function cytokine receptor: The p.S185C mutation in the extracellular domain of IL-7Ra, which was identified in T-ALL patients, still required CRLF2 co-expression for ligand independent activation (Shochat et al. 2011).

In the future, it will be interesting to analyze if the cysteine positioning within the transmembrane domain of IL-7Ra affects intracellular signaling. Theoretically, the position of the cysteine could influence the receptor chain movement up-and-down in the lipid bilayer and thereby eventually influence the rotation of the receptor molecules in a productive or non-productive signaling manner (Campos et al. 2019).

4 Materials and methods

4.1 Cloning

For synthetic HA-tagged mCherry-nanobody-IL-7Ra (V_L IL-7Ra) coding sequences for human IL-11R signal peptide (SP) (Q14626, aa 1–24), followed by sequences for HA tag (YPYDVPDYA), mCherry-VHH (Fridy et al. 2014) and human IL-7Ra (P16871, T228 to R513) have been fused representing 15 amino acids (aa) of the extracellular domain, the transmembrane domain and the cytoplasmic part of the IL-7Ra. Insertion of the four amino acids PPCL after L243 of the IL-7Ra transmembrane domain (P240 to W264) resulted in the V_L IL-7Ra_{PPCL} variant (c.819 Ins 12, p.P243insPPCL) (Shochat et al. 2011). For synthetic myc-tagged GFP-nanobody- γ_c (V_C γ_c) coding sequences for human IL-11R signal peptide (SP) (Q14626, aa 1–24), followed by sequences for myc tag (EQKLISEEDL), GFP-VHH (V_C) (Rothbauer et al. 2008) and common gamma chain (γ_c , CD32, P31785, E253 to T369) have been fused representing 15 aa of the extracellular domain, the transmembrane domain and the cytoplasmic part of the γ_c . Coding sequences for the receptors were synthesized by BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). For synthetic myc-tagged GFP-nanobody-IL-7Ra-PPCL-gp130 (V_C gp130_{PPCL}), GFP-nanobody-IL-7Ra-PPCL-IFNAR2 (V_C IFNAR2_{PPCL}), GFP-nanobody-IL-7Ra-PPCL-IL-23R (V_C IL-23R_{PPCL}) or synthetic HA-tagged mCherry-nanobody-IL-7Ra-PPCL-IFNAR2 (V_C IFNAR2_{PPCL}), cDNAs were generated by fusion of coding sequences for human IL-11R signal peptide (SP) (Q14626, aa 1–24) followed by sequences for myc tag (EQKLISEEDL) or HA tag (YPYDVPDYA), coding sequences of GFP-VHH (V_C) (Rothbauer et al. 2008), or mCherry-VHH (V_C) (Fridy et al. 2014), 15 aa of the extracellular domain of IL-7Ra (P16871, aa 228–239), the full transmembrane domain of IL-7Ra (P16871, P240–W264) with the PPCL insertion after L243 (Shochat et al. 2011), the intracellular domain of human gp130 (P40189, N642-Q918), murine IFNAR2 (O35664, K264-R513), or human IL-23R (Q5VWK5, N377–K629). Full-length gp130-IL-7Ra-PPCL (gp130_{PPCL})

was generated by fusion of coding sequences for human IL-11R signal peptide (SP) (Q14626, aa 1–24) followed by sequences for myc tag (EQKLISEEDL), the extracellular domain of human gp130 (P40189, E23-E619), the IL-7Ra transmembrane domain containing the PPCL insertion and the intracellular domain of human gp130 (N642-Q918). Full-length IL-23R-IL-7Ra-PPCL (IL-23R_{PPCL}) was generated by fusion of coding sequences for human IL-23R (Q5VWK5, M1-G355), the IL-7Ra transmembrane domain containing the PPCL insertion and the intracellular domain of human IL-23R (N377–K629).

For the generation of the PPSL or PPGL variants of the receptors, expression vectors containing the cDNAs for the synthetic receptors were used as templates for site-directed mutagenesis. Mutation of cysteine to serine or glycine was generated by PCR using Phusion high-fidelity DNA polymerase followed by DpnI digestion of methylated template DNA (Edelheit et al. 2009). The generated expression cassettes were transferred into the retroviral vector pMOWS-puro (Ketteler et al. 2002) or pMOWS-hygro (Suthaus et al. 2010) used for retroviral transduction of Ba/F3 or Ba/F3-gp130 cells (Floss et al. 2013). The generated expression plasmids have been verified by sequencing. All graphical images of the constructs were created with BioRender.com.

4.2 Cells and reagents

Ba/F3 (ACC 300), HEK293 (ACC 305) and HEK293T (ACC 635) cells were purchased from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). The generation of Ba/F3-gp130 cells was described elsewhere (Gearing et al. 1994). Phoenix-Eco cells were obtained from Ursula Klingmüller (DKFZ, Heidelberg, Germany). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with high glucose concentration (GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt, Germany) containing 10 % fetal bovine serum (GIBCO®, Life Technologies), 60 mg/l penicillin and 100 mg/l streptomycin (Genaxxon bioscience GmbH) was used to grow cell lines at 37 °C with 5 % CO₂. Ba/F3 cells were maintained using IL-3 from conditioned cell culture supernatant (0.2 %) from WEHI-3B murine myelomonocytic leukemic cells (ACC 26, DSMZ). Ba/F3-gp130 cells were grown using Hyper-IL-6 (HIL-6) from conditioned cell culture supernatant of HIL-6-secreting CHO–K1 cells or recombinant HIL-6 derived from Expi-293F™ cells (Thermo Fisher Scientific). HIL-6 is a fusion protein composed of IL-6 and the soluble IL-6R (sIL-6R) connected via a flexible peptide linker (Fischer et al. 1997). The expression and purification of synthetic cytokine ligands was described elsewhere (Mossner et al. 2020). Human Hyper-IL-23 (HIL-23) was expressed with Twin-Strep-tag® (iba GmbH, Göttingen) and purified as described (Georgy et al. 2021). HIL-23 is a fusion protein of p40 and p19 connected by a flexible peptide linker (Oppmann et al. 2000).

The following antibodies were obtained from Cell Signaling Technology phospho-STAT1 (Tyr701) (#58D6), #9167), STAT1 (#9172), phospho-STAT2 ((Tyr690) (D3P2P), #88410), STAT2 (D9J7L), #72604), phospho-STAT3 ((Tyr705) (D3A7), #9145), STAT3 ((79D7), #4904), phospho-STAT5 ((C11C5), #9359), STAT5 ((D206Y), #94205), myc-tag ((71D10), #2278), HA-tag ((C29F4), #3724), phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) ((Thr202/Tyr204), #4370), p44/42 MAPK (Erk 1/2) antibody (#9102) and Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit IgG (H + L), F(ab')₂ fragment (#4412). Furthermore, human IL-23R biotinylated antibody (R&D Systems, #BAF1400) and Streptavidin APC (BD Pharmingen™, #554067) were used. Goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, peroxidase-conjugated (#31462) was obtained from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.

4.3 Transfection of cells

HEK293, HEK293T and Phoenix-Eco cells were transiently transfected using Turbofect transfection reagent (Fermentas, Thermo Scientific) following the manufacturer's manual. Ba/F3 and Ba/F3-gp130 cells were retrovirally transduced with the pMOWS-puro or pMOWS-hygro expression plasmids as described (Floss et al. 2013). Selection of transduced Ba/F3 or Ba/F3-gp130 cells was performed with puromycin (1.5 µg/ml; Carl Roth) and/or hygromycin B (1 mg/ml, Carl Roth) for at least 2 weeks.

4.4 Cell surface detection of cytokine receptors via flow cytometry

Stably transfected Ba/F3 and Ba/F3-gp130 cells were analyzed for cell surface expression by flow cytometry using antibodies against HA tag, myc tag or human IL-23R. 500,000 cells were washed with PBS containing 1% BSA and incubated for 1 h at room temperature with the corresponding primary antibody (α-myc 1:100, α-HA 1:100, α-IL-23R 1:50). Afterwards, cells were washed and incubated with the secondary antibody (1:500 in PBS containing 1% BSA) or Streptavidin APC (1:100 in PBS containing 1% BSA) for 1 h. After washing, cells were resuspended in 500 µl PBS containing 1% BSA to be analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II flow cytometer using the FACSDiva software, BD Biosciences). Data were analyzed using Flowjo™ V10 software (BD Biosciences).

4.5 Cell viability assay

Ba/F3-gp130 cells were washed three times and adjusted to 5×10^5 cells in 100 µl DMEM supplemented with 10% FCS, 60 mg/l penicillin, and 100 mg/l streptomycin. Ligands and inhibitors were added, and cells were incubated for 3 d at 37 °C. All values were measured in triplicates per experiment. 20 µl of CellTiter-Blue® Reagent (Promega) was added per well and fluorescence was immediately measured with the Infinite M200 PRO plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) to determine the cell viability (emission 590 nm, excitation 560 nm). These measurements were made every 20 min for 2 h. Fluorescence values were normalized by subtraction of time point 0 values. All experiments were performed at least three times, and one representative experiment was selected for presentation. Data are presented as means ± SD. For the multiple comparisons, two-way ANOVA and Bonferroni correction were used in GraphPad Prism 8. Statistical significance was set to $p \leq 0.05$ (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.6 Stimulation assays

Transiently transfected HEK293 cells were washed and starved overnight in serum free medium. Ba/F3-gp130 cells were washed and starved for 3–4 h. One hour before stimulation, 10 µM pan-JAK inhibitor P6 (CAS 457,081-03-7, InSolution JAK-Inhibitor 1, #420097, Merck) was added to the cells. Afterwards, cells were stimulated with dimeric GFP (GG, 100 ng/ml), dimeric mCherry (CC, 100 ng/ml), GFP-mCherry (GC, 100 ng/ml), HIL-6 (10 ng/ml), HIL-23 (10 ng/ml), 0.2% v/v IL-3 or left untreated depending on the variant for 30 min.

Thereafter cells were harvested by centrifugation at 1500 rpm and 4 °C for 5 min, frozen or directly lysed for 2 h in lysis buffer (10 mM Tris-

HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM sodium vanadate, and 10 mM MgCl₂ supplemented with complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics)). The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Analysis of signaling proteins was performed by Western blotting of 50 µg total soluble protein from total cell lysates and subsequent detection steps using the specific antibodies described above.

4.7 Western blotting

The lysed proteins were mixed with (5×) SDS loading buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoethanol, bromophenol blue) and incubated at 95 °C for 10 min. To separate the proteins by SDS-PAGE 50 µg of protein was loaded per lane. Afterwards, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and blocked in 5% fat-free dried skimmed milk in TBS-T (10 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Tween 20). The membranes were saturated overnight with the primary antibodies (1:1000, HA tag 1:5000) in 5% BSA in TBS-T at 4 °C. After washing three times with TBS-T, membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:2000) diluted in 5% fat-free dried skimmed milk for 2 h. Afterwards the membranes were washed twice with TBS-T and once with TBS. The Immobilon™ Western Reagents (Millipore Corporation) or Signalfire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology) and the ECL ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) were used for signal detection. If samples were to be analyzed by non-reducing SDS-PAGE, cells were washed with ice-cold PBS and cell lysis was carried out as described. Samples were supplemented with volumes of $5 \times$ SDS loading buffer without β-mercaptoethanol (β-Me).

Acknowledgments: We thank Yvonne Arlt for technical assistance.

Research ethics: Not applicable.

Author contributions: The authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission. L.A.F.B., D.J.L., S.M., C.B., M.O. and H.B. formal analysis, validation, investigation; D.M.F. and J.E. supervision; J.E. resources; L.A.F.B. visualization; J.S. and D.M.F. conceptualization; J.S. and H.H. funding acquisition; L.A.F.B., J.E., H.H., J.S. and D.M.F. writing and editing; D.M.F. and J.E. data curation; D.M.F. and J.E. methodology; L.A.F.B., J.S. and D.M.F. writing-original draft; D.M.F. project administration.

Competing interests: The authors state no conflict of interest.

Research funding: J.S. was funded by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHE 907/5-1 and SCHE 907/6-1). H.H. acknowledges a grant from the Deutsche Krebshilfe e.V. (70114844).

Data availability: Not applicable.

References

- Almeida, A.R.M., Neto, J.L., Cachucho, A., Euzebio, M., Meng, X., Kim, R., Fernandes, M.B., Raposo, B., Oliveira, M.L., Ribeiro, D., et al. (2021).

- Interleukin-7 receptor α mutational activation can initiate precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Commun.* 12: 7268.
- Campos, L.W., Pissinato, L.G., and Yunes, J.A. (2019). Deleterious and oncogenic mutations in the IL7Ra. *Cancers* 11, <https://doi.org/10.3390/cancers11121952>.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A., and Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol.* 9: 61.
- Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., Baran, P., Binsch, C., Knebel, B., Al-Hasani, H., et al. (2018). Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nat. Commun.* 9: 2034.
- Etcheberry, I., Olivera, I., Bolanos, E., Cirella, A., Teixeira, A., Berraondo, P., and Melero, I. (2020). Engineering bionic T cells: signal 1, signal 2, signal 3, reprogramming and the removal of inhibitory mechanisms. *Cell. Mol. Immunol.* 17: 576–586.
- Fischer, M., Goldschmidt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grotzinger, J., and Rose-John, S. (1997). A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 15: 145–155.
- Floss, D.M., Mrotzek, S., Klöcker, T., Schröder, J., Grözing, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2013). Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor. *J. Biol. Chem.* 288: 19386–19400.
- Floss, D.M. and Scheller, J. (2019). Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 47: 1–20.
- Fridy, P.C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M.K., Nudelman, I., Scheid, J.F., Oefflinger, M., Nussenzweig, M.C., Fenyo, D., Chait, B.T., et al. (2014). A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat. Methods* 11: 1253–1260.
- Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L., and Mosley, B. (1994). Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 1119–1123.
- Georgy, J., Arlt, Y., Moll, J.M., Ouzin, M., Weitz, H.T., Gremer, L., Willbold, D., Grotzinger, J., Thives-Kurenbach, F., Scheller, J., et al. (2021). Tryptophan (W) at position 37 of murine IL-12/IL-23 p40 is mandatory for binding to IL-12R β 1 and subsequent signal transduction. *J. Biol. Chem.* 297: 101295.
- Kettler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U., and Klingmüller, U. (2002). Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 9: 477–487.
- Kondo, M., Takeshita, T., Higuchi, M., Nakamura, M., Sudo, T., Nishikawa, S., and Sugamura, K. (1994). Functional participation of the IL-2 receptor γ chain in IL-7 receptor complexes. *Science* 263: 1453–1454.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K., and Sugamura, K. (1993). Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor γ chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262: 1874–1877.
- Lin, J.X., Migone, T.S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J.A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Mietz, J., John, S., et al. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2: 331–339.
- Lu, X., Gross, A.W., and Lodish, H.F. (2006). Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 281: 7002–7011.
- Mossner, S., Phan, H., Triller, S., Moll, J., Conrad, U., and Scheller, J. (2020). Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands. *PLoS One* 15: e0230804.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715–725.
- Ozaki, K. and Leonard, W.J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.* 277: 29355–29358.
- Perna, S.K., Pagliara, D., Mahendravada, A., Liu, H., Brenner, M.K., Savoldo, B., and Dotti, G. (2014). Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirection cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition. *Clin. Cancer Res.* 20: 131–139.
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180: 1955–1960.
- Porcu, M., Kleppe, M., Gianfelici, V., Geerdens, E., De Keersmaecker, K., Tartaglia, M., Foà, R., Soulier, J., Cauwelier, B., Uyttebroeck, A., et al. (2012). Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 119: 4476–4479.
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 457: 200–204.
- Rose-John, S., Jenkins, B., Garbers, C., Moll, J., and Scheller, J. (2023). Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects. *Nat. Rev. Immunol.* 23: 666–681.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2008). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 282–289.
- Scheller, J., Ettich, J., Wittich, C., Pudewell, S., Floss, D.M., and Rafii, P. (2023). Exploring the landscape of synthetic IL-6 type cytokines. *FEBS J.*, <https://doi.org/10.1111/febs.16909>.
- Schmidt-Arras, D., Müller, M., Stevanovic, M., Horn, S., Schutt, A., Bergmann, J., Wilkens, R., Lickert, A., and Rose-John, S. (2014). Oncogenic deletion mutants of gp130 signal from intracellular compartments. *J. Cell Sci.* 127: 341–353.
- Sharma, S., Sauer, T., Omer, B.A., Shum, T., Rollins, L.A., and Rooney, C.M. (2023). Constitutive Interleukin-7 cytokine signaling enhances the persistence of Epstein-Barr Virus-specific T-cells. *Int. J. Mol. Sci.* 24, <https://doi.org/10.3390/ijms242115806>.
- Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., et al. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* 208: 901–908.
- Shochat, C., Tal, N., Gryshkova, V., Birger, Y., Bandapalli, O.R., Cazzaniga, G., Gershman, N., Kulozik, A.E., Biondi, A., Mansour, M.R., et al. (2014). Novel activating mutations lacking cysteine in type I cytokine receptors in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 124: 106–110.

- Shum, T., Omer, B., Tashiro, H., Kruse, R.L., Wagner, D.L., Parikh, K., Yi, Z., Sauer, T., Liu, D., Parihar, R., et al. (2017). Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells. *Cancer Discov* 7: 1238–1247.
- Suthaus, J., Tillmann, A., Lorenzen, I., Bulanova, E., Rose-John, S., and Scheller, J. (2010). Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol. Biol. Cell* 21: 2797–2807.
- Thomas, K.R., Allenspach, E.J., Camp, N.D., Wray-Dutra, M.N., Khim, S., Zielinska-Kwiatkowska, A., Timms, A.E., Loftus, J.P., Liggitt, H.D., Georgopoulos, K., et al. (2022). Activated interleukin-7 receptor signaling drives B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *Leukemia* 36: 42–57.
- Tsilingiri, K., Fornasa, G., and Rescigno, M. (2017). Thymic stromal lymphopoietin: to cut a long story short. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 3: 174–182.
- Winer, H., Rodrigues, G.O.L., Hixon, J.A., Aiello, B., Hsu, T.C., Wachter, B.T., Li, W., and Durum, S.K. (2022). IL-7: comprehensive review. *Cytokine* 160: 156049.
- Zenatti, P.P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M.C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J.A., Silveira, A.B., Cardoso, B.A., et al. (2011). Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 43: 932–939.
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., et al. (2012). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481: 157–163.
- Zhao, Z., Li, Y., Liu, W., and Li, X. (2020). Engineered IL-7 receptor enhances the therapeutic effect of AXL-CAR-T cells on triple-negative breast cancer. *Biomed. Res. Int.* 2020: 4795171.
- Zoellner, N., Coesfeld, N., De Vos, F.H., Denter, J., Xu, H.C., Zimmer, E., Knebel, B., Al-Hasani, H., Mossner, S., Lang, P.A., et al. (2022). Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling. *Front. Microbiol.* 13: 947169.

Supplementary Material: This article contains supplementary material (<https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0344>).

DISKUSSION

1. *NEXT GENERATION* TRANS-SIGNALING INHIBITOREN

Interleukin (IL-)6 reguliert über drei Signalwege fundamentale Entzündungsprozesse des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Darüber hinaus ist IL-6 am Energiestoffwechsel der Leber und der Skelettmuskulatur beteiligt und wirkt als Myokin auf den Typ II-Diabetes, den Stoffwechsel und das Herz-Kreislauf-System [57, 205]. Eine Fehlfunktion kann unter anderem zu chronischen Erkrankungen oder Krebs führen [114, 143]. Dabei beeinflussen die drei Signalwege unterschiedliche Prozesse: Der klassische Signalweg erfolgt über die Bindung an den membranständigen IL-6R Rezeptor (IL-6R α) und reguliert Regeneration, Hämatopoese und die Immunantwort [50]. Das Trans-signaling erfolgt über den löslichen IL-6R α (sIL-6R α) und wird unter anderem mit chronisch-entzündlichen Prozessen oder Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [48, 50].

Humanisierte monoklonale Antikörper (mAb) gegen IL-6R α wie Tocilizumab oder Sarilumab wurden zur Hemmung des IL-6 Signalwegs entwickelt. Durch die Hemmung des membrangebundenen und löslichen IL-6R α intervenieren diese und andere IL-6-gerichtete Medikamente in die klassische und das IL-6 Trans-signaling [106]. Tocilizumab und Sarilumab sind für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen oder befinden sich in klinischen Studien für andere chronisch-entzündliche Erkrankungen [96, 206]. Eine unerwünschte Nebenwirkung der Blockade des klassischen Signalwegs ist ein erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen, Hyperlipidämie oder Veränderungen der Herzfunktion [50, 112]. Eine neue Therapiestrategie setzt an der spezifischen Blockade des IL-6 Trans-signalings an [50]. Dabei handelt es sich um das Fusionsprotein sgp130Fc mit dem Handelsnamen Olamkicept, das in zwei Phase-II-Studien bei Colitis ulcerosa (UC) untersucht wurde [118, 132, 207]. In präklinischen Studien wurde dabei der klassische Signalweg von sgp130Fc im Rahmen der Homöostase, der epithelialen Regeneration oder der Immunantwort auf Infektionen im Gegensatz zu Tocilizumab nicht beeinflusst [50].

Weitere Inhibitoren des IL-6 Trans-signalings sind drei natürlich vorkommende Varianten des löslichen gp130 mit einer kleineren Größe von 50, 90 und 110 kDa [137, 208]. Diese wurden im Serum oder Urin von Patienten als Ergebnis von alternativem *splicing* identifiziert, wobei ihr Ursprung noch nicht untersucht wurde [81, 154, 209]. Die kleinste Isoform *sgp130-rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form* (sgp130-RAPS) mit einer Größe von 50 kDa kommt in der Synovialflüssigkeit von Gesunden und Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) vor (**Abbildung 4B**)[154]. Das sgp130-RAPS Molekül

enthält die Zytokin-bindenden Domänen D1-3, die für die neutralisierende Bindung von IL-6/sIL-6R α notwendig sind. Die effektive Hemmung durch das monomere sgp130-RAPS Molekül wurde in Mausmodellen der chronischen Antigen-induzierten Arthritis gezeigt [127]. Antikörper gegen die C-terminale Sequenz von sgp130-RAPS wurden jedoch bei RA-Patienten beschrieben, nicht jedoch bei Gesunden oder Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen [154]. Außerdem korrelierte der Serumspiegel dieser Antikörper mit dem Schweregrad der RA Symptome, weshalb die sgp130-RAPS Variante für eine therapeutische Anwendung nicht weiter verfolgt wurde [154]. Mit einer geringeren Affinität von 6,9 nM im Vergleich zu sgp130Fc (60 pM), war die Affinität vergleichbar mit der monomeren Variante von sgp130 [118, 127]. Neben zwei weiteren splicing-Varianten von gp130 (Diamant, Sharkey), die auf mRNA Level ohne endogenen Expressionsnachweis beschrieben wurden, zeigte eine weitere *splicing*-Variante mit D1-4 von gp130 an Fc fusioniert (sgp130E10-Fc) eine geringere Effektivität im Vergleich zu sgp130Fc (K_D sgp130-E10Fc 71 pM, K_D sgp130Fc 9 pM) [137]. Insgesamt variieren die Affinitäten der sgp130 Varianten in den verschiedenen Studien, was einen direkten Vergleich der Hemmkapazität erschwert [118, 127, 137, 149, 150, 208]. Ein Konsens besteht in der dimerisierten Variante des sgp130Fc, die mit einer potenteren Inhibition und erhöhten *in vivo* Stabilität aus den Studien hervorsticht [137, 138].

Eine chimäre Weiterentwicklung von sgp130Fc zielt auf eine Größenreduktion und Erhöhung der Spezifität für die IL-6 Signaltransduktion ab [138]. Da der Grad der Gewebepenetration mit der Proteingröße korreliert, sollte die Penetration durch einen größenreduzierten sgp130-Inhibitor verbessert werden [136]. Dazu wurden die Domänen D4-6 des sgp130Fc durch eine variable Region eines Einzeldomänenantikörper (Nanobody, VHH) aus Lama ersetzt und als *chimeric soluble* gp130Fc (cs130Fc) bezeichnet [138]. Im Gegensatz zum 240 kDa großen sgp130Fc Inhibitor, hat das cs130Fc eine kleinere Molekülgröße von 157 kDa. Zusätzlich stabilisiert der VHH6 die Bindung an den IL-6/sIL-6R α Komplex und erhöht somit die Inhibitionspezies gegenüber IL-6 Trans-signaling (cs130Fc IC₅₀: 0,46 nM; sgp130Fc IC₅₀: 0,87 nM). In einem Vergleichsexperiment erwies sich die monomere Variante cs130 mit einer Größe von 52 kDa sogar als ähnlich potent wie die Vergleichsmoleküle cs130Fc und sgp130Fc (cs130 IC₅₀: 1,46 nM) [138].

In dieser Arbeit wurde das cs130Fc um drei weitere VHH erweitert, um eine bispezifische Inhibition zu untersuchen und damit in einem *proof-of-concept* Modell die Kombinationsmöglichkeiten des vielfältigen cs130Fc zu zeigen (**Abbildung Publikation 1**). Dabei wurde zwischen dem VHH6 und der Fc Domäne des IgG1 Antikörpers der TNF^{VHH} aus

Ozoralizumab, IL-12/23^{VHH} und VHH72 inseriert, im eukaryotischen Zellsystem rekombinant hergestellt und mittels Affinitätschromatographie gereinigt [159, 210]. Das IL-6 Trans-signaling wurde mit der Zugabe der einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R α ausgelöst und damit die Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen induziert [138]. Dadurch konnte die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) der cs130Fc Varianten bestimmt und mit dem ursprünglichen cs130Fc verglichen werden. Weiterhin wurde das IL-6 Trans-signaling mit den cs130Fc Varianten in Stimulationsassays für die intrazellulären Signale *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 und *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) getestet. Ba/F3-gp130 Zellen, die IL-12R β 1 und IL-12R β 2 auf der Oberfläche tragen, proliferieren konzentrationsabhängig mit HIL-12, einem Fusionsprotein aus p40 und p35. Ba/F3-gp130 Zellen die IL-12R β 1 und IL-23R tragen, proliferieren mit HIL-23, einem Fusionsprotein aus p40 und p19 [211]. Diese Zellen wurden in Proliferations- und Stimulationsassays mit beiden Fusionsproteinen HIL-12 oder HIL-23 stimuliert, um den inhibitorischen Effekt von cs130-IL-12/23^{VHH}Fc zu beleuchten. Demgegenüber induzierte TNF in *in vitro* Experimenten Apoptose von L929-Zellen, wodurch das cs130-TNF^{VHH}Fc hinsichtlich der IC₅₀ untersucht wurde. Vero-Zellen wurden mit SARS-CoV-2 infiziert, um die Inhibition von c19s130Fc, VHH72Fc und cs130Fc nach verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Der zytopathische Effekt und die intrazelluläre Färbung von SARS-CoV-2 zeigten, dass die essentielle Bindestelle des Spike-Proteins von c19s130Fc und VHH72Fc neutralisiert wurde und somit die Zellen somit nicht infiziert wurden (**Abbildung Publikation 2**).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der cs130Fc Inhibitor uneingeschränkt mit weiteren Komponenten erweitert werden kann und diese im Vergleich zu den einzelnen VHH mit gleicher Effektivität hemmen. Die Vorteile von cs130Fc liegen in der geringen Größe, der Stabilität der VHH und der Modularität, die für weitere Fragestellungen in der Forschung zur Verfügung stehen.

1.1. ERHÖHUNG DER SPEZIFITÄT DES SGP130Fc

Alle Zytokine der IL-6 Familie, mit Ausnahme von IL-31, induzieren die Signaltransduktion über mindestens einen gp130 β -Rezeptor. Dazu gehören IL-6, IL-11, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin-M* (OSM), *Cardiotrophin 1* (CT-1), *Ciliary Neutrophic Factor* (CNTF) und *Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1* (CLCF1) [47]. Therapiestrategien durch Hemmung der IL-6 Trans-Signaltransduktion mit sgp130Fc sollten die Auswirkung der IL-6 Familienmitglieder berücksichtigen. Erhöhte Serumlevel von IL-11 werden mit einer Reihe von Pathologien in Verbindung gebracht, darunter Asthma, chronisch-

entzündliche Darmerkrankungen (CED) oder RA [59]. IL-11 wird von verschiedenen Zellpopulationen, wie Immunzellen, Epithelzellen und Fibroblasten sekretiert, wohingegen krankheitsauslösenden Zellpopulationen mit dem responsiven IL-11R α nicht umfassend charakterisiert sind [140]. Darüber hinaus hat sich die Komplexität des IL-11-Signalwegs mit dem Nachweis des ADAM10-vermittelten *shedding* von IL-11R α erhöht [148]. Hiermit erweitert sich die Erreichbarkeit der IL-11 vermittelten Signaltransduktion auf alle Zellen, zudem steht das Forschungsfeld der Regulationsmechanismen der IL-11 Signaltransduktion und deren Beeinflussung im physiologischen Kontext erst am Anfang [147, 148].

Die biologische Rolle des IL-11 Trans-signalings muss jedoch noch entschlüsselt werden [148]. Die physiologische Rolle des IL-11 Trans-signalings wurde postuliert, indem das Fusionsprotein von IL-11 mit sIL-11R α (Hyper-IL-11) zur experimentellen Nachahmung des IL-11 Trans-signalings verwendet wurde [66]. Zumindest in experimentellen Mausstudien konnte ein Einfluss des IL-11 Trans-signalings bei gastrointestinalen Karzinomen, embryonaler Implantation oder kraniofazialen Defekten ausgeschlossen werden [212, 213]. Der lösliche IL-11 Rezeptor (sIL-11R α) ist bei Patienten mit Magenkarzinom erhöht, was auf einen Zusammenhang zwischen IL-11 Trans-signaling und Tumorprogression hinweisen könnte [212]. Darüber hinaus gibt es derzeit keine Untersuchungen, ob das IL-11 Trans-signaling wie das IL-6 Trans-signaling an Entzündungen beteiligt ist [50, 140]. Das sgp130Fc kann an den IL-6/sIL-6R α und den IL-11/sIL-11R α Komplex binden und dadurch die Signalübertragung beider Trans-Signalwege neutralisieren [138, 147, 149].

Es wurden Mutationen in sgp130Fc inseriert, um die Selektivität für das IL-6 Trans-signaling zu modellieren (**Abbildung 4B**). Die Mutationen T102Y/Q113F/N114L in D1 des sgp130Fc (sgp130^{FLY}Fc) erhöhten die Affinität zum IL-6 Trans-signaling, indem die Oberflächeninteraktion von D1 zu *site* III am IL-6/sIL-6R α erhöht wurde [150]. Veränderungen in der Interaktionsfläche in den Domänen D2-D3 zu der *site* II von gp130 verringerten die IL-6/sIL-6R α -hemmende Wirkung von sgp130Fc [150]. In einer neueren Studie wurde erstmals die verminderte Affinität von sgp130^{FLY}Fc zur *site* III von IL-11/sIL-11R α beschrieben, was zu einer geringeren Inhibition von IL-11 Trans-signaling führte [138].

Trotz der Fusion mit VHH6 in cs130Fc mit gesteigerter Affinität zu IL-6/sIL-6R α , blieb eine Affinität zu den IL-11/sIL-11R α Komplexen erhalten (cs130Fc IC₅₀: 7,14 nM, sgp130Fc IC₅₀: 0,22 nM) [138]. Die analogen Mutationen im monomeren cs130 (cs130^{FLY}) führten neben einer erhöhten Affinität zum IL-6 Trans-signaling (cs130^{FLY} IC₅₀: 0,48 nM; cs130 IC₅₀: 1,46 nM) zu einem vollständigen Verlust der Affinität zu IL-11/sIL-11R α in den cs130^{FLY} und cs130^{FLY}Fc Varianten [138]. Eine R281Q Mutation in der D3 Domäne von

sgp130^{FLY}Fc (sgp130^{FLYR}Fc) erhöhte die IL-6 Trans-signaling-Spezifität mit einem vollständigen Verlust der Affinität zu IL-11 Trans-signaling, da diese homozygote Mutation im gp130 Rezeptor bei Kraniosynostosepatienten den IL-11 Signalweg beeinflusst (**Abbildung 4B**) [141]. Dadurch könnten Nebenwirkungen verringert werden, indem die Variante aus dem zuvor entwickelten sgp130Fc die Selektivität für das IL-6 Trans-signaling erhöht, ohne einen Einfluss auf das IL-11 Trans-signaling aufzuweisen [149]. Aktuelle präklinische und klinische Studien visieren die Blockade des IL-6 Trans-signalings im Rahmen des gut untersuchten pathologischen Einflusses an, während die physiologische Bedeutung von IL-11 Trans-signaling noch zu erforschen ist [114, 128, 140, 214].

1.2. SPEZIFISCHER IL-11 TRANS-SIGNALING SGP130Fc INHIBITOR

Um die physiologische Bedeutung von IL-11 Trans-signaling zu untersuchen, ist neben der Induktion der Signaltransduktion durch das Hyper-IL-11 auch eine spezifische IL-11 Trans-signaling-Blockade notwendig. Eine Charakterisierung der relevanten Interaktionsflächen von sgp130 zu den IL-11/IL-11R α Komponenten bei gleichzeitiger Diskriminierung der IL-6/sIL-6R α Komponenten ermöglicht die Identifizierung bestimmter Aminosäuren, die als Kandidaten für Mutationsuntersuchungen hervorstechen. Eine Analyse der 2xgp130:2xIL-6:2xsIL-6R α Struktur im Vergleich zum 2xgp130:2xIL-11:2xsIL-11R α Komplex zeigte einzigartige Interaktionsflächen von gp130, die in **Abbildung 6** hervorgehoben sind [153, 215].

(9B) 10	20	30	(9C) 40	50	
E <u>LLDPC</u> GYIS	PESPVVQLHS	NFTAVCVLKE	<u>KCM</u> D <u>YFHV</u> NA	NYIVWKTNNF	
60	70	80	90	(9A) 100	
TIPKEQYTI	NRTASSVTFT	DIASLN <u>QLT</u>	CNIL <u>TFGQLE</u>	<u>QNVYGI</u> TIIS	
110	(7A) 120	130	140	150	site IIa
GLPPEKPKNL	SCIVNE <u>GKKM</u>	RCEWDGGRET	HLETNFTLKS	EWAT <u>HKF</u> ADC	site IIb
160	170	(7B) 180	190	(7B) 200	site IIIa
KAKRDTPTSC	TVDY <u>STVYFV</u>	<u>N</u> IEVWVEAEN	ALGKVTS DHI	NFD <u>PVY</u> KVKP	site IIIb
210	220	230	240	250	
NPPHNLSVIN	<u>S</u> E <u>ELSS</u> <u>ILKL</u>	TWTNPSIK <u>SV</u>	IILKYNIQYR	TKDASTWSQI	
(8B) 260	270	280	290	300	
PPEDTA <u>STRS</u>	<u>SFTVQ</u> DLKPF	TEYVFRIRCM	KEDGKGYWSD	WSEEASGITY	

Abbildung 6: Aminosäuresequenz der D1-D3 von gp130 mit farblich gekennzeichneten *site II* und *site III* bei IL-6/sIL-6R α . Durchgestrichene Aminosäuren sind wichtig für die Interaktion der *site II* und *site III* für IL-11/sIL-11R α . Fett gedruckte und unterstrichene Aminosäuren sind relevant für IL-6/sIL-6R α und könnten substituiert werden. Bereiche mit geklammerten Zahlen (9B), ..., (8D) sind in Abbildung 7, 8 und 9 als Strukturmodelle dargestellt.

IL-11 bildet mit *site* IIa im Gegensatz zu IL-6 eine größere Interaktionsfläche mit hauptsächlich ionischen Wechselwirkungen zu gp130. IL-11 interagiert mit der *site* IIa über vier Arginine (R111, R114, R117, R118) durch eine hydrophobe Tasche (V167, W142, Y168 und T166) zur D2-3 Domäne (**Abbildung 7Ai**). In der *site* IIa von IL-6 ist jedoch kein Arginin konserviert. Dazu dominieren in der *site* IIa von IL-6 weniger hydrophobe Aminosäuren als bei IL-11. Allerdings geht E110 von IL-6 eine einzigartige elektrostatische Bindung mit K117, K118 und K119 von gp130 ein, die im IL-11 Komplex nicht existiert und Mutationen könnten daher diese starke Bindung auflösen (**Abbildung 7Aii**).

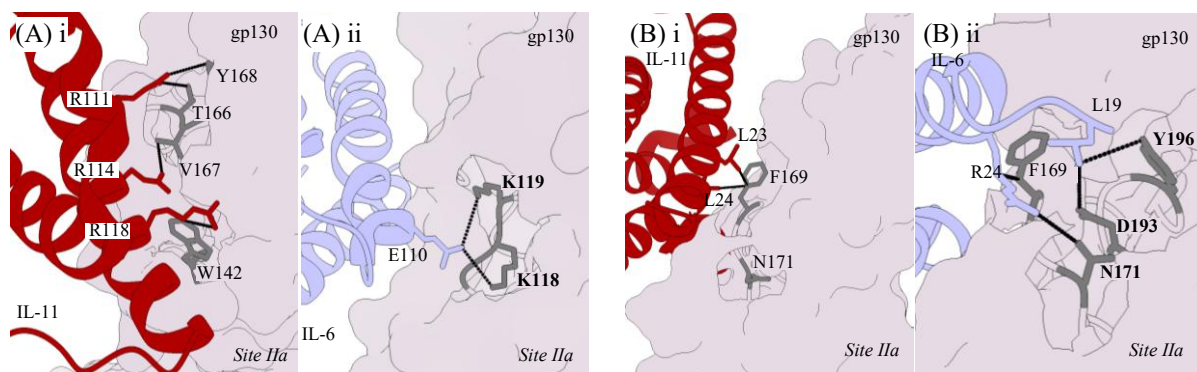


Abbildung 7: Gegenüberstellung der *site* IIa Interaktionen (schwarze Verbindungen) von IL-11/sIL-11R α Komplex (PDB: 8DPU) und IL-6/sIL-6R α (PDB: 1P9M). (A)(i) *Site* IIa Interaktion von IL-11 mit gp130 im Komplex. (ii) Zusätzliche ionische Bindung der *site* IIa von IL-6 mit gp130 im Komplex (fett gedruckt). (B)(i) *Site* IIa Interaktion von IL-11 mit gp130 im Komplex. (ii) Zusätzliche Interaktionen der *site* IIa von IL-6 mit gp130 im Komplex (fett gedruckt).

Der Bereich 164-171 von gp130 interagiert mit *site* IIa von IL-6 und IL-11. Dabei bildet D193 und Y196 eine hydrophobe Bindung mit IL-6 (L19) und F169 von gp130 π -Kationen mit R24 von IL-6. Insbesondere F169 ist essentiell für die Aktivität anderer Mitglieder der IL-6 Familie und eine Mutation reduziert die Aktivität anderer IL-6 Familienmitglieder [216]. F169 von gp130 bildet eine hydrophobe Wechselwirkung mit L23 und L24 von IL-11 (**Abbildung 7Bi**). Mutationen von N171 (Wasserstoffbrücke zu R24 von IL-6) oder D193 und Y196 (L19 von IL-6) könnten jedoch die Affinität zu IL-6/sIL-6R α verringern (**Abbildung 7Bii**).

Die *site* IIb von sIL-11R α bildet zehn ionische Wechselwirkungen mit der D3 Domäne von gp130, während der sIL-6R α Komplex lediglich fünf ionische Wechselwirkungen aufweist. R213 von sIL-11R α bildet eine Salzbrücke mit E253 von gp130 (**Abbildung 8Ai**). E253 von gp130 interagiert ebenfalls mit W214 im IL-6R α Komplex (**Abbildung 8Aii**) [215, 217]. Generell zeigen beide Komplexe ähnliche Interaktionspartner über *site* IIb vor allem im Bereich 250-265 von gp130 auf, wie Mori und Kollegen im HDX-MS Experiment zeigten [218]. Außerdem bildet das R259 von gp130 eine Salzbrücke zu beiden Rezeptorkomplexen (sIL-6R α : D262 und sIL-11R α : D260) [215, 217]. Die humane R281Q Mutation (**R259 in Abbildung 8Aii**) in der sgp130^{FLYR}Fc Variante behält jedoch die

Affinität zum IL-6 Rezeptorkomplex bei und verliert die Bindung zum IL-11 Rezeptorkomplex. Dabei könnte der Austausch zu einer polaren Aminosäure (R281Q) zu einer Abstoßung der polaren Aminosäuren (Y238, T259, D260) des IL-11R α führen, während weiterhin die ionische Bindungstasche des IL-6R α über H261 und D262 gebildet wird [149, 217]. S257 könnte mutiert werden, da es mit sIL-6R α über W249, K252 und H261 Wasserstoffbrücken bildet, sIL-11R α hingegen nicht (**Abbildung 8B**). Dieses S257 entspricht der Mutation von S279I (Variante II) bei Tenhumberg und Kollegen. Es reduzierte die Inhibition von IL-6/sIL-6R α um 60% und könnte daher auf Interaktion mit IL-11/sIL-11R α untersucht werden [150].

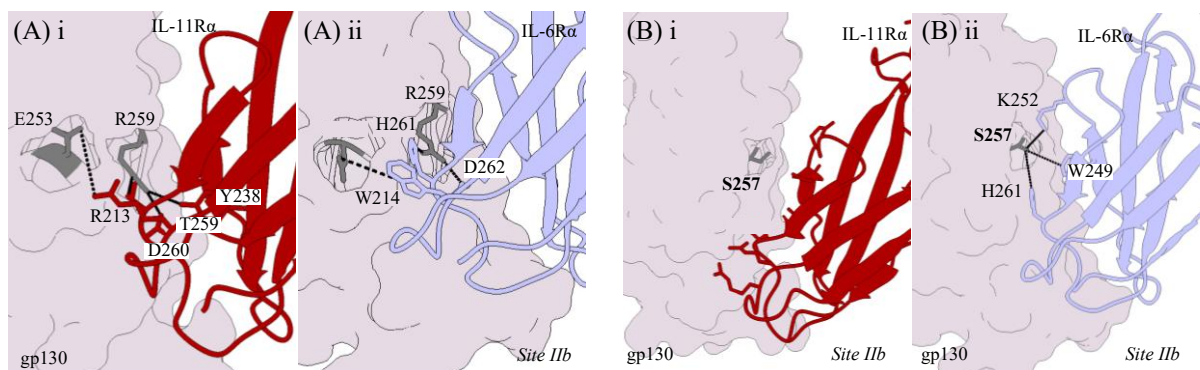


Abbildung 8: Gegenüberstellung der *site IIb* (schwarze Verbindungen) von IL-11/IL-11R α Komplex (PDB: 8DPU) und IL-6/sIL-6R α (PDB: 1P9M). (A) Ionische Interaktion *site IIb* von (i) sIL-11R α mit gp130 im Komplex und (ii) sIL-6R α mit gp130 im Komplex. (B) Wasserstoffbrücken zu S257 in *site IIb* (i) von sIL-11R α mit gp130 und (ii) von sIL-6R α mit gp130.

Beide Komplexe interagieren über *site III* mit dem Bereich 87-95 von gp130 [215, 218]. Dabei bildet *site III* mit der D1 Domäne eines zweiten gp130 einen Komplex. Im Gegensatz zur *site II* unterscheiden sich die interagierenden Aminosäuren der *site IIIa* am stärksten zwischen den Rezeptorkomplexen. Beide Rezeptorkomplexe bilden eine Interaktionsfläche über *site IIIb* mit dem Bereich 86-91 von gp130. Eine ionische Interaktion ist zwischen sIL-11R α -R184 mit Q88 von gp130 und eine hydrophobe von L185 zu F86 von gp130 (**Abbildung 9Ai**). sIL-6R α hat hingegen hydrophobe Interaktionen (F134, F168 und T188) zu L89 und Q91 von gp130, welche hervorgehoben sind (**Abbildung 9Aii**). Bemerkenswert ist, dass vor allem der N-Terminus trunziert und markierte Aminosäuren im Bereich 31-37 von gp130 verändert werden könnten. N-terminal interagiert gp130 zusätzlich mit dem IL-6/sIL-6R α Komplex über *site IIIa* vor allem über hydrophobe Interaktionen, während der N-Terminus von gp130 bis auf P5 mit dem IL-11/sIL-11R α Komplex keine Interaktionen aufweist (**Abbildung 9B**) [215]. Zudem weist der IL-6/sIL-6R α Komplex in *site III* eine zusätzliche Interaktionsfläche mit dem Bereich 31-37 von gp130 auf, die für den IL-11/sIL-11R α Komplex nicht relevant zu sein scheint [215, 218]. Ionische Interaktionen zwischen IL-6 (E59) und gp130 (K31 und C32) bilden starke Interaktionspartner. Zudem hat

sIL-6R α hydrophobe (P138-Y35 von gp130, L57-F36 von gp130) und ionische (R132-H37 von gp130) Interaktionen (**Abbildung 9C**).

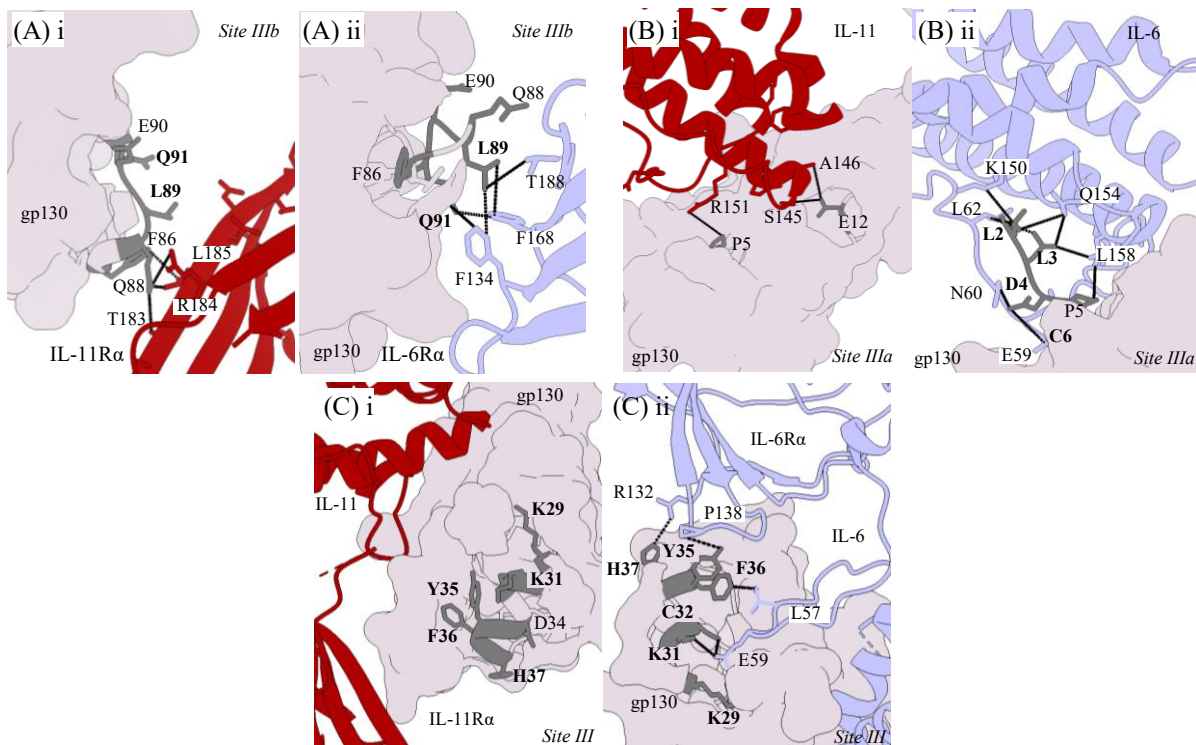


Abbildung 9: Site III Interaktionen (schwarze Verbindungen) von IL-11/sIL-11R α Komplex (PDB: 8DPU) und IL-6/sIL-6R α (PDB: 1P9M). **(A)** Site IIIb Interaktion über **(i)** ionische und hydrophobe Aminosäuren von sIL-11R α zu gp130. **(ii)** Hydrophobe Interaktion von sIL-6R α mit gp130 im Komplex. **(B)** Site IIIa N-terminale Interaktion von gp130 mit **(i)** sIL-11R α und **(ii)** sIL-6R α mit zusätzlicher hydrophober Tasche. **(C)** Der Bereich 31-37 von gp130 geht **(i)** keine Interaktion mit sIL-11R α ein, während mit **(ii)** IL-6/sIL-6R α starke hydrophobe und ionische Bindungen zu sehen sind.

Alternativ kann analog zu VHH6 eine VHH Isolation und Charakterisierung nach Immunisierung eines Lamas mit Hyper-IL-11 erfolgen [152]. Dabei kann der VHH6 im cs130Fc durch den VHH gegen Hyper-IL-11 ausgetauscht werden, um die Spezifität zu IL-11 Trans-signaling zu erhöhen. Denn derzeit existieren weder VHH noch *single-chain variable fragment* (scFv) Varianten gegen den IL-11/sIL-11R α Komplex.

Mit der Identifizierung der proteolytischen Spaltung von membrangebundenem IL-11R α wird das Gesamtbild des IL-11 Signalwegs komplexer. Die Aufklärung, welche Prozesse durch klassisches und/oder Trans-signaling von IL-11 gesteuert werden, steht erst am Anfang [148]. Dennoch könnte die Entwicklung spezifischer IL-11 Inhibitoren, die zwischen klassischem und Trans-signaling unterscheiden können, eine Untersuchung der physiologischen Bedeutung des IL-11 Trans-signaling ermöglichen und die Bedeutung bei entzündlichen Erkrankungen, Fibrose und Krebs erleuchten [59, 148]. In präklinischen Mausmodellen könnte in Anlehnung an IL-6 Trans-signaling die Auswirkung der Blockade von IL-11 Trans-signaling und dessen Bedeutung in der Physiologie und Pathologie

untersucht werden, da gegenwärtig lösliche Rezeptoren als prognostische Biomarker und therapeutische Targets bei pathologischen Prozessen beteiligt sind [145, 146].

1.3. ENTWICKLUNG BISPEZIFISCHER CS130Fc VARIANTEN

Der Einfluss des IL-6 Trans-signalings bei chronischen Autoimmunerkrankungen wurde intensiv studiert [50]. Dabei hat sich das Fusionsprotein sgp130Fc nicht nur als nützliches Werkzeug in der Forschung etabliert, sondern auch in klinischen Studien bei Patienten mit UC seine Wirksamkeit unter Beweis gestellt [135, 219].

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von cs130Fc zum bispezifischen Molekül um einen kombinatorischen Vorteil durch die gleichzeitige Hemmung von Zytokinen zu erzielen. Hierfür wurde das cs130Fc mit einem VHH gegen TNF ergänzt und als cs130-TNF^{VHH}Fc bezeichnet [156, 210]. Zusätzlich wurde ein VHH, welches sich gegen das p40 im IL-12 und IL-23 richtet, in das cs130Fc eingebracht (cs130-IL-12/23^{VHH}Fc) [159]. Diese Inhibitoren wurden rekombinant in einem eukaryotischen Zellsystem exprimiert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und in zellbasierten Proliferationsexperimenten auf ihre Funktionalität untersucht (**Abbildung Publikation 1**). Die bispezifischen Inhibitoren könnten aufgrund der Schlüsselkomponenten TNF, IL-12, IL-23 und IL-6 Trans-signaling bei CED oder RA ihre Anwendung finden. Die Pathologie von TNF und IL-12 bzw. IL-23 bei CED und RA wird im dem Zuge diskutiert und weitere interessante Targets werden vorgestellt.

Die bispezifischen Homodimere wurden auf der Basis des Inhibitors cs130Fc generiert. Dabei besteht das cs130 aus den zytokinbindenden Domänen D1-3, die mit geringer Affinität an den IL-6 Trans-signaling-Komplex aus IL-6 und sIL-6R α binden [137, 138]. Die Fusion mit einem VHH6, der zunächst nicht neutralisierend an den IL-6/sIL-6R α Komplex bindet, erhöht die Affinität zum IL-6/sIL-6R α Komplex und senkt gleichzeitig die Affinität zum IL-11 Trans-signaling [138, 152]. Der Fc-Tag eines IgG1 Antikörpers erhöht die Hemmkapazität durch Aviditätseffekte und ermöglicht eine Affinitätschromatographie basierte Reinigung, die auch bei therapeutischen Antikörpern angewendet wird [220]. Die Erweiterung zum bispezifischen Inhibitor wurde durch eine Fusion eines antagonistischen VHH gegen TNF oder die p40 Domäne in IL-12/IL-23 zwischen der cs130- und der Fc-Domäne erreicht [158, 159].

Die zellbasierten Proliferationsexperimente zeigten die neutralisierende Wirkung der bispezifischen Fusionsproteine gegenüber IL-6 Trans-signaling, der TNF-induzierten Apoptose und der IL-12/IL-23 Signaltransduktion. Die Komponente IL-12/23^{VHH} in der cs130Fc Variante inhibierte mit der gleichen IC₅₀ wie IL-12/23^{VHH}Fc. Zusätzlich wurde die gleichzeitige Inhibition der HIL-23 und IL-6 Trans-signaling induzierten Proliferation mit

cs130-IL-12/23^{VHH}Fc gezeigt. Das cs130-TNF^{VHH}Fc blockierte die Zytokine gleichzeitig ohne die einzelnen Domänen in ihrer Inhibition zu beeinflussen, da die IC₅₀ unverändert blieb. Die Western Blot Analysen zeigten, dass die Erweiterung von cs130Fc mit weiteren VHH die Inhibition im Vergleich zu cs130Fc nicht beeinflusste [138, 155, 156]. Dies wurde mit einer Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) bestätigt.

Interventionen in die IL-6 Signaltransduktion richten sich als komplette Blockade gegen den IL-6R oder gegen das IL-6 selbst. Der IL-6R α -mAb Tocilizumab ist bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen und Symptomen zugelassen, während Siltuximab als IL-6 Inhibitor bei der multizentrischen Castleman-Krankheit genehmigt ist [96]. Angesichts der wichtigen Rolle des klassischen Signalwegs von IL-6 in der epithelialen Homöostase hat dessen Inhibition kontraproduktive Effekte bei Erkrankungen mit Störungen der epithelialen Barrierefunktion, wie Psoriasis oder Morbus Crohn (CD) [221]. Darüber hinaus wurde die Behandlung von CED-Patienten mit Tocilizumab in einer klinischen Phase-II-Studie aufgrund von Nebenwirkungen, einschließlich gastrointestinaler Ulzera und gastrointestinaler Perforation, abgebrochen [113, 134, 222].

Die sgp130 Varianten sind potente IL-6 Trans-signaling Inhibitoren und haben bei physiologischen Serumkonzentrationen keinen Einfluss auf die klassische Signaltransduktion [139]. Höhere Konzentrationen der monomeren Variante wurden im Blut gemessen, erreichen aber nicht die deutlich höheren Konzentrationen von sgp130Fc, die *in vitro* zur Hemmung der klassischen Signaltransduktion erforderlich sind [80, 84, 118, 139]. In einer klinischen Studie der Phase II bei Patienten mit UC wurde bei einer Dosis von 600 mg sgp130Fc eine verbesserte Wundheilung der Mukosa und eine erhöhte Remissionsrate beobachtet [132, 219]. Ein Vorteil der bispezifischen cs130Fc Varianten ist somit, dass die Inhibition des IL-6 Trans-signalings gegenüber der Inhibition des kompletten IL-6 Signalwegs durch IL-6R α -mAb bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen mit Störung der epithelialen Barrierefunktion überlegen sein könnte.

VHH, die die Aktivität von TNF und IL-12/IL-23 blockieren, wurden für die kombinatorische Inhibition mit IL-6 Trans-signaling ausgewählt, da therapeutische Antikörper gegen diese Targets in Monotherapien für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zugelassen sind [45]. TNF-mAbs, darunter Adalimumab, Infliximab, Certolizumab und Golimumab, werden als Goldstandard bei UC und CD eingesetzt [45]. Der hier verwendete TNF^{VHH} ist Teil von Ozoralizumab, einem humanisierten Fusionsprotein aus zwei verschiedenen TNF^{VHH} und einem VHH gegen Serumalbumin, um durch die Bindung an Serumalbumin die Serumhalbwertszeit zu erhöhen [210]. Ozoralizumab hat seine

Wirksamkeit in zwei klinischen Studien der Phase III bei RA gezeigt (OHZORA- und NATSURA-Studie) und ist seit 2022 in Japan zugelassen [210, 223].

TNF wurde als erster Schlüsselfaktor in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen identifiziert. Etanercept und Infliximab eröffneten 1998 mit der Zulassung als TNF Inhibitoren eine neue Therapiestrategie als erste Biologika bei RA als Alternative zu den Glukokortikoiden, nichtsteroidalen Antirheumatika oder Immunsuppressiva [224]. Die Wirksamkeit einer Therapie mit TNF Hemmung ist jedoch begrenzt, da die Patienten entweder nicht darauf ansprechen oder eine Toleranz entwickeln [224]. Neben des therapeutischen Potenzials der TNF Inhibition wurde vermutet, dass verschiedene chronisch-entzündliche Erkrankungen eine gemeinsame Pathophysiologie aufweisen und weitere Interventionen im Zytokinnetzwerk die Therapiestrategien grundlegend verändern könnten. Präklinische Studien bestätigen die klinische Relevanz verschiedener Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-17, IL-23, B-Lymphozyten-Stimulator, Interferon (IFN)- α Rezeptoren, Zelloberflächenmarker, kostimulatorische Moleküle und Signalwege [221, 224]. Es wurden Strategien zur Entwicklung bispezifischer Antikörper verfolgt, um mehrere Schlüsselfaktoren des Zytokinnetzwerks zu blockieren und so die klinische Wirksamkeit von Antikörpertherapien zu verbessern [224, 225].

Therapieansätze zur Behandlung von mittelschweren bis schweren CD sind mAbs, Immunmodulatoren, Kombinationstherapien oder chirurgische Eingriffe. Derzeit sind vier Klassen von Biologika zugelassen: TNF (Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, Infliximab), Integrinantagonisten (Natalizumab, Vedolizumab), p40 Untereinheit von IL-12 und IL-23 (Ustekinumab) und p19 Untereinheit von IL-23 (Risankizumab, Mirikizumab) [226, 227]. Ustekinumab richtet sich gegen die p40 Untereinheit von IL-23 und IL-12 und wird zur Behandlung von Psoriasis, Psoriasis-Arthritis, UC und CD eingesetzt, während Risankizumab als alternativer p19 Inhibitor seit 2022 zur Behandlung von CD zugelassen ist. Mirikizumab ist seit 2023 als zweiter IL-23 spezifischer mAb zur Behandlung der UC zugelassen [227]. Eine Studie mit Guselkumab befindet sich derzeit in der dritten Phase zur Behandlung von Patienten mit CD (GALAXI, NCT03466411) und UC (QUASAR, NCT04033445) [226].

Die Behandlung mit Immunsuppressiva und Infliximab als TNF-mAb zeigt einen synergistischen Effekt bei Patienten mit CED oder RA, die mit einer Monotherapie keine Remission erreichen [228, 229]. Aktuelle klinische Studien befassen sich mit dualen Therapien mit zwei Biologika bei CED, da synergistische, überlappende oder komplementäre Effekte beobachtet wurden [230]. In kleinen Kohorten wurden 83% der Patienten mit einer

Kombination aus Ustekinumab, TNF-mAb oder beiden in Kombination untersucht [230]. Davon erreichten 73% der Patienten eine klinische Remission mit einer 67%igen Reduktion der Steroidmedikation [231]. Die bisherigen Beobachtungen aus *case reports* und *case studies* deuten darauf hin, dass eine duale Therapie bei CED-Patienten, die auf eine Monotherapie refraktär sind, zu einer klinischen Verbesserung führt. Darüber hinaus hat der Erfolg bispezifischer Antikörper (bsAbs) für therapeutische Zwecke in den letzten Jahren neue Strategien für chronisch-entzündliche Immunerkrankungen eröffnet [232].

Mehr als 100 bsAbs befinden sich in klinischen Studien gegen Tumore [233]. Die meisten dieser bsAbs rekrutieren Effektorzellen, um Tumorzellen anzugreifen, indem der bsAbs zunächst eine Antigenbindungsstelle auf Tumoren bindet und gleichzeitig durch die Bindung an einen T-Zell-spezifischen (Co-)Rezeptor T-Zellen rekrutiert und aktiviert. Eine neue klinische Anwendung von bsAbs erstreckt sich auch auf chronische, autoimmune und neurodegenerative Erkrankungen [225]. Im Jahr 2020 befanden sich 12 bsAbs in frühen klinischen Studien zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel UC oder RA. Dabei haben bsAbs im Gegensatz zu mAbs den Vorteil, dass sie mit einem Molekül die Signaltransduktion verschiedener Zytokine inhibieren [44]. Inflammatorische Prozesse, die durch TNF, IL-17, IL-1, IL-4 oder IL-13 induziert werden, sollen durch bsAbs über verschiedene Signalwege unterdrückt werden um die komplexe und heterogene Erkrankung effektiver zu behandeln [225]. So zeigen experimentelle Mausmodelle für Kolitis, RA und allergisches Asthma einen synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Inhibition von IL-6R α und TNF [71, 234-236]. In einer Studie (REBONE) mit RA-Patienten hatte eine duale Behandlung gegen TNF und IL-6R α einen positiven Effekt auf die Reparatur von Knochenerosionen, was die Wirksamkeit einer simultanen Inhibition von IL-6 und TNF bei RA unterstützt [229]. Entsprechend könnte das cs130-TNF^{VHH}Fc einen synergistischen Effekt bei RA zeigen, da die proinflammatorischen Biomarker IL-6, sIL-6R α und TNF nachweislich einen Einfluss auf den Verlauf der RA haben [221]. Somit hat das cs130-TNF^{VHH}Fc das Potential, ein wirksamer Inhibitor bei rheumatischen Erkrankungen zu sein [237].

Die globale Inhibition von IL-6 mit TNF kann bei CED mit dieser Strategie nicht verfolgt werden, da eine Behandlung mit IL-6R α -mAb in klinischen Studien aufgrund intestinaler Perforationen versagte [116]. Zugelassene mAb Therapien bei CED erzielen durch eine Inhibition von TNF oder IL-12/IL-23 eine Remission bei CED-Patienten, während Olamkicept in einer klinischen Phase II-Studie ohne gastrointestinale Nebenwirkungen wirksam war [52, 135]. Somit könnten die beiden Inhibitoren cs130-TNF^{VHH}Fc und cs130-IL-12/23^{VHH}Fc einen kombinatorischen Vorteil bei CED-Erkrankungen bieten.

1.4. POTENTIELLE KANDIDATEN FÜR DIE ERWEITERUNG VON CS130Fc

Das Zytokinnetzwerk induziert proinflammatorische und gewebeschädigende Mediatoren im Synovium von RA-Patienten [238]. Die Mediatoren TNF und IL-6 zeigen eine Schlüsselfunktion in der Leukozytenaktivierung, MMP-Produktion, Angiogenese bei der Initiierung und Progression der RA-Pathogenese, die durch zugelassene Biologika gehemmt werden [238]. Andere *downstream* Akteure wie IL-17 oder IL-1 wurden in klinischen Studien aufgrund geringer Wirksamkeit nicht weiterverfolgt [239]. Im Folgenden werden Kandidaten für eine potentielle bispezifische Inhibition vorgestellt, die im Kontext chronisch-entzündlicher Erkrankungen einen kombinatorischen Vorteil mit der IL-6 Trans-signaling-Blockade haben könnten.

IFN- γ : T_H1 Zellen sekretieren IFN- γ nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Makrophagen oder andere antigenpräsentierende Zellen (APC) und zeichnen sich durch ihre immunstimulierende Wirkung aus [240]. Die Effekte von IFN- γ sind komplex und pleiotrop, da proinflammatorische Signale inhibiert oder starke Entzündungsprozesse induziert werden können [240]. Lymphozyten sekretieren IFN- γ in der Lamina propria von Patienten mit CD [232]. Eine Schlüsselrolle wurde IFN- γ in einem Mausmodell der Kolitis zugeschrieben, da ein T-Zelltransfer mit einem IFN- γ -Knockout aufgrund einer Unterdrückung der T_H1 Zelldifferenzierung zu keiner Pathogenese führte [241, 242]. Darüber hinaus sprachen Patienten mit CD in einer klinischen Studie auf die Behandlung mit einem IFN- γ -mAb an [243].

OSM: OSM ist in entzündeten Kolonläsionen bei Patienten mit aktiver CED erhöht, was zunächst zu der Annahme führte, dass OSM zum Aufbau der intestinalen Epithelbarriere beiträgt [244]. Im Mausmodell der induzierten Kolitis verbesserte OSM die Pathophysiologie [245, 246]. Nicht-synonyme *single nucleotide polymorphism* (SNP) im OSM- oder OSMR β -Lokus erhöhen jedoch das Risiko für CED, da eine daraus resultierende höhere Affinität von OSMR β zu OSM im Kolon mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [246, 247]. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen erhöhter OSM-Expression im entzündeten Gewebe und dem Versagen einer TNF-mAb-Therapie bei CED-Patienten beobachtet [247]. Ein Knockout Mausmodell und die medikamentöse Blockade von OSM reduzierten signifikant eine anti-TNF resistente Kolitis. Diese präklinische Daten deuten darauf hin, dass die Hemmung von OSM eine therapeutische Strategie für CED sein könnte [44].

LIF: In zwei Kolitis-induzierten Mausmodellen und in Patienten mit UC wurde eine erhöhte Expression von LIF beobachtet [248-250]. Die Funktion von LIF wurde jedoch nicht

geklärt. Ein weiteres Mausmodell mit Kolitis-induzierter Entzündung zeigte, dass LIF von intestinalen Epithelzellen sezerniert wird [251]. Die intestinale Entzündung wurde durch eine Gabe von LIF reduziert, indem die TH17 Differenzierung unterdrückt und die Proliferation der intestinalen Epithelzellen gefördert wurde. Bis auf eine Publikation ist die Rolle von LIF bei CED weitgehend ungeklärt, so dass die Funktion von LIF durch einen Inhibitor untersucht werden könnte [251].

IL-11: Eine deregulierte gp130 Signaltransduktion führt zur Hyperaktivierung von STAT3 und damit zu gastrointestinalen, kolorektalen, und Pankreaskarzinomen [142, 252, 253]. Bei der Entstehung und Progression dieser inflammationsassoziierten Tumoren spielen IL-6 und IL-11 eine wichtige Rolle. Während eine Überexpression von IL-11 zu Tumoren führt, sind Mäuse mit einem IL-11R α Knockout nicht davon betroffen [254]. Darüber hinaus zeigen Patientenbiopsien von Magenkarzinomen eine erhöhte IL-11, IL-11R α Expression und eine STAT3 Hyperaktivierung [255]. CED-Patienten zeigen ebenfalls erhöhte IL-11 Level von inflammatorischen Stromazellen in der entzündeten Mukosa und sprechen nicht auf anti-TNF Therapien an [256]. Präklinische Studien in CED-induzierten Mausmodellen zeigen, dass eine Behandlung mit IL-11 zwar positive Effekte hat, das von der Mukosa sekretierte IL-11 jedoch die Pathogenese induziert [257, 258]. Trotz kontroverser Hypothesen im Bereich der IL-11 Forschung könnte IL-11, insbesondere die Rolle des IL-11 Trans-signalings, ein Kandidat für die Evaluation einer therapeutischen Blockade sein [44, 52].

Erste duale Kombinationstherapien mit bsAbs zeigten Wirksamkeit in experimentellen Mausmodellen der RA. bsAbs kombinierten die Inhibition von IL-17 und TNF, IL-17A und IL-6, IL-17A und IL-23, IL-23 und TNF und zeigten einen synergistischen Vorteil bei der Modulation inflammatorischer Mechanismen [235, 259-261]. Einige Monotherapien gegen IL-17 wie Brodalumab, Secukinumab, Ixekizumab, Bimekizumab zeigten in klinischen Studien bei RA keine Wirksamkeit und wurden daher nicht weiter verfolgt [238]. Trotz kombinatorischer Effekte in präklinischen Studien hatte die gleichzeitige Blockade von IL-17 und TNF durch Remtolumab in der zweiten klinischen Studie bei RA und Psoriasis-Arthritis keine erhöhte Wirksamkeit gegenüber Adalimumab [262, 263]. Diese klinische Studie zeigt, dass nicht alle bsAbs eine synergistische Wirksamkeit wie in präklinischen Studien aufweisen. Dennoch sind die klinischen Daten dieser bsAbs von großem Wert für das Verständnis der pathologischen Rolle von inflammatorischen Mediatoren bei Autoimmunerkrankungen. Diese neuartigen Moleküle stellen die nächste Generation therapeutischer Optionen dar, da Behandlungen von Autoimmunerkrankungen mit einer dualen Therapie im Vergleich zu Monotherapien erste Effekte zeigen [225].

Dementsprechend könnten sowohl bsAbs als auch die cs130Fc Varianten durch die Inhibition unterschiedlicher Signalwege einen verbesserten Therapieerfolg erzielen.

1.5. INHIBITION VON IL-6 TRANS-SIGNALING UND SARS-CoV-2 MIT c19s130Fc

Die Infektion und Vermehrung von SARS-CoV-2 erfolgt in der Lunge [264]. Infizierte Epithelzellen und Lungenkapillaren führen zu einer massiven Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, TNF, IL-1 β und Chemokinen. Dies führt zur Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen, die eine Funktionsstörung der alveolarkapillären Barriere verursachen [264, 265]. Die Akkumulation von Immunzellen am Entzündungsort verstärkt die Immunantwort, während andere Organe vom Virus befallen werden und es zu einer überschießenden Immunreaktion im Sinne eines Zytokinsturms kommt. Der Zytokinsturm verursacht schwere Infektionen und Multiorganversagen [177].

IL-6 wird als Reaktion auf Infektionen und Gewebeschäden ausgeschüttet und weist einen komplexen Mechanismus auf, da die Signaltransduktion über verschiedene Signalwege vermittelt werden kann. In der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 den membrangebunden IL-6R α , der hauptsächlich auf Hepatozyten und Immunzellen exprimiert wird und induziert die Homodimerisierung von gp130 [47, 50].

Bei COVID-19 Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf wurden erhöhte Spiegel von sIL-6R α gemessen [170]. Epithelzellen zeigen nach einer SARS-CoV-2 Infektion eine erhöhte ADAM17 Aktivität, die wiederum die Menge an sIL-6R α erhöht [170]. Dieser Signalweg induziert entzündungsfördernde Prozesse (**Abbildung Publikation 2**). Neuere Erkenntnisse beobachten eine Schlüsselrolle des IL-6 Trans-signalings beim letalen Verlauf von COVID-19 in Form einer überschießenden Entzündungsreaktion, Endothelzellaktivierung, Koagulation und Thrombose [265-267]. Das IL-6 Trans-signaling aktiviert dysregulativ mikrovaskuläre Endothelzellen, was zur Infiltration von Immunzellen führt [57, 268]. Die Endothelaktivierung ist mit der Endotheliopathie bei COVID-19 assoziiert und spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von ARDS und Multiorganversagen [95, 268, 269]. Das IL-6 Trans-signaling induziert eine erhöhte Prokoagulanzenbildung, eine hepatozelluläre Fibrinogenexpression, die zu einer nachfolgenden Leberschädigung führt [95, 268]. In sinusoidalen Endothelzellen wurde die durch IL-6 Trans-signaling vermittelte Erhöhung der Gerinnungsfaktoren durch sgp130Fc gehemmt [95].

Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung einer bispezifischen sgp130Fc Variante, die gleichzeitig eine Inhibition des Spike-Proteins von SARS-CoV-2 und des IL-6 Trans-signalings verfolgt. Dabei könnte die selektive Blockade des IL-6 Trans-signalings

gegenüber der globalen Blockade durch IL-6R α -mAb einen vorteilhaften Mechanismus beinhalten, da die Infektion bei einem schweren COVID-19 Verlauf weiterhin über den klassischen IL-6 Signalweg eliminiert während der hyperinflammatorische Prozess reprimiert werden kann.

Hierbei handelt es sich um einen bispezifischen Inhibitor, der aus einem löslichen Rezeptor und zwei VHH besteht, um gleichzeitig das IL-6 Trans-signaling und die Infektion mit SARS-CoV-2 zu hemmen (**Abbildung Publikation 2**). Das sogenannte c19s130Fc erweiterte das Repertoire der bsAb als erstes Beispiel eines bispezifischen löslichen Zytokinrezeptors. Das c19s130Fc basiert auf dem oben beschriebenen cs130Fc Molekül [138]. Die Bispezifität gegenüber SARS-CoV-2 wurde durch die Fusion mit VHH72 erreicht [157]. Dieser neutralisierende VHH richtet sich gegen die *receptor binding domain* des Spike-Proteins (S-RBD), verhindert die Bindung an hACE2 und damit die Internalisierung von SARS-CoV-2 [266]. Das Fusionsprotein c19s130Fc wurde generiert, indem VHH72 zwischen dem VHH6 und dem Fc-Anteil eines IgG1 Antikörpers platziert wurde. Mit Hilfe des Fc-Anteils konnte c19s130Fc gereinigt und die Dimerisierung gewährleistet werden, da die antagonistische Aktivität von VHH72 auf seiner Dimerisierung beruht [157].

Zusätzlich diente VHH72, fusioniert an den Fc-Anteil, als Kontrolle für die Inhibition von SARS-CoV-2 mit c19s130Fc. Beide Proteine wurden rekombinant exprimiert und mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt. In zellbasierten Experimenten wurden die Inhibitoren cs130Fc, c19s130Fc und VHH72Fc hinsichtlich des IL-6 Trans-signalings untersucht. Dazu wurden die Einzelkomponenten IL-6 und sIL-6R α in Anwesenheit der Inhibitoren zu Ba/F3-gp130 Zellen gegeben und die Proliferation gemessen. Die Ba/F3-gp130 Zellen wachsen in Abhängigkeit der IL-6 und sIL-6R α Komponenten, da der signaltransduzierende gp130 Rezeptor ein STAT3-abhängiges Wachstum vermittelt [138]. Die IC₅₀ von c19s130Fc ($1,0 \pm 0,3$ nM) und cs130Fc ($0,6 \pm 0,2$ nM) zeigten eine potente Hemmkapazität, während VHH72Fc das Wachstum über die IL-6 Signaltransduktion nicht inhibierte [155].

Als nächstes wurde das Maß der Bindung von c19s130Fc und VHH72Fc zu S-RBD von SARS-CoV-2 in einem zellbasierten Modellsystem mit viraler Infektion untersucht. Hierfür eigneten sich Vero-Zellen, die mit dem isolierten SARS-CoV-2 Virus für drei Tage in Kultur gehalten und der zytopathische Effekt (CPE) gemessen wurde [270]. Der VHH72 in VHH72Fc und c19s130Fc bindet dabei die Schlüsselkomponente S-RBD des SARS-CoV-2 Virus, die über ACE2 für den Zelleintritt interagiert, und verhinderte so die Infektion der

Zellen. Ähnliche IC_{50} Werte wurden für c19s130Fc ($8,1 \pm 0,8$ nM) und VHH72Fc ($32,3 \pm 18,6$ nM) bestimmt. Virusinfizierte Vero-Zellen wurden mit einem anti-SARS-CoV-2-Nukleokapsid mAb für die Immunfluoreszenz (IF) angefärbt, um die Blockade der Infektion durch SARS-CoV-2 in Abhängigkeit von c19s130Fc zu zeigen. Mit c19s130Fc und VHH72Fc behandelte Vero-Zellen zeigten einen reduzierten Eintritt von SARS-CoV-2 mit vergleichbaren IC_{50} Werten (c19s130Fc: $15,1 \pm 3,7$ nM; VHH72Fc: $20,7 \pm 1,6$ nM), während cs130Fc den Eintritt des Virus nicht verhindern konnte. Zusammenfassend sind die Fusionsproteine in der Zellkultur stabil und können ihre Aktivität für mindestens 48 Stunden aufrechterhalten. Ein limitierender Faktor dieser Studie ist, dass die gleichzeitige Blockade durch das c19s130Fc nicht gezeigt wurde.

Das cs130Fc hat den Vorteil, dass die Hemmkapazität der monomeren Variante cs130 mit einer reduzierten Molekülmasse von 52 kDa im Vergleich zu den dimeren Varianten unverändert bleibt. Daher könnte die Größe von c19s130Fc durch die Generierung einer monomeren Variante ohne Fc-Anteil halbiert werden. Dafür wird allerdings ein Austausch von VHH72 mit einem anderen VHH gegen SARS-CoV-2 benötigt, dessen neutralisierende Aktivität nicht auf Dimerisierung beruht [157]. Da das SARS-CoV-2 Spike-Protein hACE2 für den viralen Zelleintritt bindet, konzentrieren sich präventive Strategien auf die Entwicklung therapeutischer Antikörper, die die Interaktion von S-RBD mit hACE2 unterbinden [271]. Aufgrund des enormen Bedarfs an therapeutischen Inhibitoren in der Pandemie wurden hochaffine VHH entwickelt, die auf das c19s130Fc übertragen werden könnten [272].

Studien mit IL-6R α -mAb wie Tocilizumab oder Sarilumab zeigen die Wirksamkeit der Therapie durch die globale IL-6 Blockade [273]. Die Behandlung mit globalen IL-6 Blocker birgt ein erhöhtes Infektionsrisiko, da der klassische IL-6 Signalweg zur viralen Elimination inhibiert wird und somit die Viruslast ansteigen kann [94, 111, 274]. Rodríguez-Hernández und Kollegen zeigten in Studien mit fatalen COVID-19 Verläufen, dass vor allem Komponenten des IL-6 Trans-signalings mit dem Schweregrad und der Gewebeschädigung zunahmen, wenn nicht ausreichend sgp130 als Puffersystem zur Verfügung stand [84]. Dieselbe Gruppe zeigte auch in COVID-19 Mausmodellen, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 das IL-6 Trans-signaling induziert und dadurch Endothelzellschädigung, Kapillarentzündung und Thrombose auslöst [95, 170, 275]. Dabei wurde gezeigt, dass das IL-6 Trans-signaling im proinflammatorischen Zustand bei COVID-19 Erkrankungen pathologisch sein kann. Die Inhibition von IL-6 Trans-signaling mit sgp130Fc reduzierte

signifikant Lungenschäden und Endotheliopathie im Mausmodell und verbesserte somit das Überleben [275].

Im frühen Verlauf der COVID-19 Erkrankung sind antivirale Antikörper wirksam gegen den Viruseintritt [276]. In späteren Stadien einer schweren COVID-19 Erkrankung sind antivirale Antikörper nicht mehr wirksam, da der Organismus bereits infiziert ist. Es entwickeln sich ein hyperinflammatorischer Zustand, Endothelzellaktivierung, Neutrophilie, Multiorganschäden und respiratorische Insuffizienz. In diesem Stadium können immunsuppressive Therapien die Überlebensrate erhöhen und den Bedarf an mechanischer Sauerstoffzufuhr verringern [277]. Eine immunmodulatorische Behandlung verzögert jedoch die Viruselimination [273, 278, 279]. Daher können immunmodulatorische und antivirale Therapien kombiniert werden, um synergistische Effekte bei SARS-CoV-2-, Hepatitis-B- und Influenza-Infektionen zu erzielen [280-282]. Theoretisch könnte c19s130Fc beide Stadien der Infektion bei COVID-19-Patienten abdecken und somit einen Vorteil gegenüber einer Monotherapie bieten. Im frühen Stadium verhindert c19s130Fc eine unkontrollierte Infektion. Sobald sich hyperinflammatorische Zustände im späteren Stadium entwickeln, hat c19s130Fc zusätzlich das Potenzial diesen Zustand zu reduzieren, da es bereits systemisch vorhanden ist. Somit könnten bispezifische Inhibitoren wie c19s130Fc während des Übergangs vom frühen zum späten Stadium von COVID-19 einen Vorteil bieten. Die spezifische IL-6 Trans-signaling Inhibition mit sgp130Fc oder c19s130Fc könnte ein alternatives therapeutisches Ziel zur globalen IL-6 Blockade darstellen. So kann die durch IL-6 Trans-signaling induzierte Endotheliopathie mit nachfolgender Lungen- und Leberschädigung verhindert werden, während der klassische IL-6 Signalweg regenerative und viruseliminierende Prozesse einleiten kann [55, 275].

Zusammenfassend zeigt c19s130Fc als erstes Mitglied einer neuen Klasse bispezifischer Inhibitoren die multifunktionale Strategie, durch die Fusion mit einem weiteren VHH maßgeschneiderte Funktionen zu kreieren. Dabei entsteht ein bispezifisches Molekül, das antivirale und immunmodulatorische Einheiten enthält. Die Inhibition durch sgp130Fc zeigte, dass es eine Alternative zur Behandlung von SARS-CoV-2 Komplikationen sein könnte. Des Weiteren zeigte sgp130Fc, dass das IL-6 Trans-signaling in der Pathogenese von COVID-19 involviert ist [275]. Darüber hinaus könnte die bispezifische Blockade mit c19s130Fc neben der Inhibition des IL-6 Trans-signaling auch die virale Replikation und damit die Viruslast und deren Folgeschäden reduzieren.

2. WEITERENTWICKLUNG SYNTHETISCHER ZYTOKINREZEPTOREN

Die Fähigkeit, neue Funktionen für Zellen zu entwickeln, ist zu einer herausragenden Aufgabe der biomedizinischen Forschung geworden und hat den Bereich der zellbasierten Diagnostik und Therapie revolutioniert [185]. Ein Gebiet der synthetischen Biologie ist die kontrollierte Regulation genetischer Netzwerke, die durch Signale ohne unspezifische Hintergrundaktivität gesteuert werden können. Insbesondere synthetische Rezeptoren ermöglichen die Entwicklung von Designerzellen, die Krankheitszustände verbessern sollen. Die Entwicklung solcher genetischer Regulatoren im eukaryotischen System ermöglichte die chimäre Antigenrezeptor (CAR)-T-Zelltherapie zur gezielten Interaktion von T-Zellen bei Bindung durch ein bestimmtes Antigen [185]. Durch das gezielte Intervenieren in das Immunsystem kann diese Strategie verschiedene metabolische und autoimmune Erkrankungen regulieren und eliminieren. Um die Spezifität dieser therapeutischen Anwendung weiter zu verbessern, werden ständig neue Schaltkreise zur kombinatorischen Erkennung eingeführt und ausprobiert. Die Herausforderung besteht nach wie vor darin, unspezifische Signale der synthetischen Rezeptoren zu reduzieren oder *off-target* Effekte zu eliminieren [186].

2.1. DIE SYCYR-TECHNOLOGIE WIRD ZUR THERAPEUTISCHEN APPLIKATION ANGEPAST

Die Technologie der synthetischen Rezeptoren aus dieser Arbeit basiert auf der *Synthetic Cytokine Receptor* (SyCyR) Entwicklung von Engelowski und Kollegen [193]. Das System ist modular aufgebaut und kann mit verschiedenen Rezeptoren versehen werden. Die extrazelluläre Domäne ist mit einem Nanobody gegen GFP oder mCherry mit einer TMD und ICD des zu analysierenden Rezeptors fusioniert [193]. Diese Technologie kann über synthetische Liganden, hier frei kombinierbare GFP oder mCherry Fusionsproteine, spezifisch aktiviert werden. Vorherige Arbeiten beschäftigten sich mit dem SyCyR System zur Untersuchung alternativer Rezeptorkomplexe oder SNP Aktivitätsanalysen [193, 194, 196].

Eine davon war die effiziente, selektive und phänokopierende IL-23 Signaltransduktion des SyCyR Systems, die in einer detaillierten Analyse der Signaltransduktionswege und Transkriptomprofile untersucht wurde [193, 194]. Die synthetischen Liganden aktivierten spezifisch über dimere GFP-mCherry Fusionproteine. Eine klinische Anwendung zur gezielten Adressierung von CAR-T-Zellen ist langfristig problematisch, da GFP oder mCherry als Antigene von der zellulären Immunabwehr erkannt

und humoral neutralisiert werden können [283]. Da vor allem GFP als Reportermolekül zur Genexpression und Proteinlokalisierung *in vivo* und *in situ* eingesetzt wird, gibt es eine Vielzahl von Publikationen mit intrazellulär fluoreszierenden Reporterproteinen [283]. Allerdings beeinflussen die Fluoreszenzproteine kontextabhängig endogene Signale in Wachstum und Metabolismus, die berücksichtigt werden müssen [284, 285]. So untersuchten Stripecke und Kollegen die Immunogenität von intrazellulärem GFP in T_H Zellen, die Zytotoxizität und die Gedächtnisantwort unter der Berücksichtigung des Genexpressionssignals veränderte [202]. Im immunkompetenten Mausmodell wurde eine immuninduzierte Elimination von GFP über die T-Zellantwort gezeigt, die eine Applikation von GFP in der klinischen Gentherapie ausschließt [283]. Die Immunogenität bzw. Zytotoxizität von mCherry wurde sporadisch untersucht und befindet sich derzeit im Anfangsstadium der Forschung [286]. Was eine mehrmalige Injektion von GFP oder mCherry in regelmäßigen Abständen bei einer begleitenden T-Zellantwort bewirkt, wurde nach dem aktuellen Kenntnisstand nicht untersucht [287].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das SyCyR System auf extrazellulärer Ebene modifiziert, um langfristig eine Anwendung in der klinischen Therapie zu ermöglichen. Hierfür soll ein zugelassener mAb als synthetischer Ligand zur Aktivierung der SyCyR-Technologie im menschlichen Körper ohne Hintergrundaktivität eingesetzt werden. Dementsprechend fiel die Wahl auf die Reformation eines Antikörper:anti-idiotypischen-VHH Interaktionspaares. Ein Hauptmerkmal des mAbs war das Ziel nicht-humaner Epitope. Dabei stehen Kandidaten gegen bakterielle oder virale Antigene zur Verfügung. Potentiell können anti-idiotypische VHH gegen Palivizumab, Nirsevimab, Sotrovimab, Regdanvimab, Imdevimab, Ansuvimab, REGN-EB3 (Atoltivimab, Maftivimab, Odesivimab) und Raxibacumab entwickelt werden, aus denen eine große Vielfalt synthetischer Zytokinrezeptoren hervorgehen kann [198]. Da die Pharmakodynamik und Sicherheit von Palivizumab mit seiner Zulassung seit 1998 am besten beschrieben ist, wurde dieser humanisierte IgG1 Antikörper zur Immunisierung eines Lamas und Isolation anti-idiotypischer VHH verwendet [203]. Beide in dieser Studie verwendeten Komponenten könnten als nicht-immunogen angesehen werden, da als extrazelluläre Komponente der VHH humanisiert werden kann, um die Immunogenität zu reduzieren [288]. Generell werden VHH bereits in diagnostischen und therapeutischen Anwendungen eingesetzt und sind immunologisch sicher [288]. Bei den CARs handelt es sich ebenfalls um Fusionsproteine, die aus einem extrazellulären, nicht-natürlichen *single chain variable fragment* (scFv) bestehen und als klinisch sicher eingestuft werden [185].

Mit der *Yeast Display* Technologie wurden in zwei Selektionsrunden vier anti-idiotypische Nanobody (AIP1-4^{VHH}) identifiziert, die Palivizumab mit niedriger K_D (< 4 nM) binden. Die geringste Dissoziation zeigte AIP1^{VHH}, welcher im kompetitiven ELISA einen anti-idiotypischen Palivizumab-Antikörper (aiPalivizumab) in äquimolarem Verhältnis neutralisierte. Außerdem wurde der anti-idiotypische Charakter von AIP^{VHH} im kompetitiven ELISA nachgewiesen. Lediglich AIP4^{VHH} neutralisierte die Signalstärke von aiPalivizumab im kompetitiven ELISA nicht, was entweder auf die Dissoziationsrate oder die nicht überlappende Epitopenbindung von AIP4^{VHH} und aiPalivizumab zurückzuführen ist. Der Hintergrund dafür wurde jedoch nicht weiterverfolgt [198]. Eine *small angle X-ray scattering* (SAXS) Profilanalyse von AIP1^{VHH} und Palivizumab identifizierte 4 Aminosäuren in AIP1^{VHH}, die mit der hypervariablen Region von Palivizumab interagierten. Im Multisequenzalignment von AIP1- 4^{VHH} war insbesondere Y101 einzigartig in AIP1^{VHH}. Die höchste Übereinstimmung in den interagierenden Aminosäuren der AIP^{VHH} wies AIP3^{VHH} auf, welcher auch in zellbasierten Analysen eine biologische Aktivität zeigte.

2.2. DIE AIP^{VHH}SYCYR SIND BIOLOGISCH AKTIV

Die AIP1-4^{VHH} wurden über eine Rezeptorfusion der TMD und ICD zur Diversität des SyCyR Systems hinzugefügt und retroviral in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert [195]. Die Nanobodies GFP^{VHH} oder mCherry^{VHH} wurden gegen AIP1-4^{VHH} getauscht, um die Signalweiterleitung über gp130 und Fas zu untersuchen (**Abbildung Publikation 3**). Die Funktionalität und Spezifität des SyCyR Systems wurde bereits gezeigt [193, 195]. Die natürliche IL-6 Signalweiterleitung basiert auf der Bindung von IL-6 an den IL-6R α und anschließend an den β -Rezeptor gp130. Die Signaltransduktion erfolgt über die Homodimerisierung von gp130 und damit über die Aktivierung der gp130-assoziierten Januskinasen [49]. Diese phosphorylieren die Tyrosinreste des gp130 Rezeptors, die Signalmoleküle der Januskinase (JAK)/STAT-, *mitogen-activated protein-kinase* (MAPK)- und Akt/Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalwege regulieren [49]. Ba/F3-gp130 Zellen eignen sich für die Analyse der AIP^{VHH}gp130 Aktivität, da diese Zellen ausschließlich zytokinabhängig über die gp130 Homodimerisierung wachsen. Dementsprechend wurde die Stimulation mit HIL-6 über endogenes gp130 als Vergleichsstudie herangezogen [195]. Die Varianten der Ba/F3-gp130 Zellen wurden hinsichtlich ihrer Proliferation und Signaltransduktionswege untersucht.

Selbst hohe Mengen von Palivizumab induzierten keine Proliferation oder Signaltransduktion der Ba/F3-gp130-AIP^{VHH}gp130 über den JAK/STAT Signalweg. Umfangreiche Studien zeigen, dass die Signalstärke eines dimeren Rezeptors von

extrazellulären Parametern wie der Ligandenaffinität oder Halbwertszeit des Komplexes auf der Zelloberfläche bestimmt wird [289]. Allerdings ist die Rolle topologischer Effekte im Detail ungeklärt [290]. Um einen Zusammenhang zwischen der Topologie und der aktivierenden Dimerisierung des gp130 Rezeptors zu untersuchen, wurde die Publikation zur EpoR Dimerisierung herangezogen [290]. Mit Hilfe verschiedener Diabodies, die unterschiedliche Distanzen beider Rezeptoren hervorrufen, wurde die Aktivierung der EpoR hinsichtlich der Dimerisierung und seiner Signalaktivität untersucht. Die naive Bindung mittels EPO zeigte die geringste Distanz der ECDs, während die agonistischen Diabodies eine größere Distanz von 127 bzw. 148 Å zwischen den dimerisierten EpoR aufwiesen [290]. Die hypervariablen Regionen von Palivizumab wurden mittels SAXS auf 146 Å determiniert [198]. Eine Dimerisierung und Aktivierung über die AIP^{VHH}gp130 wäre daher plausibel. Moraga und Kollegen stellten jedoch fest, dass Distanz, Topologie oder eine Kombination beider Faktoren für die Unterschiede in der Signalübertragung zwischen den alternativen Topologien der dimeren ECD von EpoR verantwortlich sind, die die relative Ausrichtung und Nähe der JAKs intrazellulär beeinflussen [290]. Selbst geringfügige strukturelle Unterschiede in der relativen Orientierung des extrazellulären Rezeptors, die durch unterschiedliche Liganden induziert wurden, wurden in der Signalantwort differenziell vermittelt [291, 292].

Um AIP^{VHH}gp130 SyCyR durch eine Änderung der Orientierung oder Geometrie zu aktivieren, könnten andere Antikörperklassen wie IgG4, IgA, IgD, IgE oder IgM untersucht werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass diese Formate den großen Abstand bewahren und optimale Dimerisierungsgeometrien verhindern. Im Falle der AIP^{VHH}gp130 SyCyR waren vermutlich die hypervariablen Regionen von Palivizumab mit 146 Å zu weit voneinander entfernt, um durch geometrische Umorientierung die Distanz der Dimere zu überbrücken. Erst eine Kreuzvernetzung mit einem Fc-mAb im 12 molaren Überschuss zu Palivizumab induzierte eine dosisabhängige Proliferation von AIP1-3^{VHH}gp130 und zeigte damit die Funktionalität des SyCyR Systems mit anderen VHH [198]. Da die Kreuzvernetzung mit zwei synthetischen Liganden im *in vivo* Modell oder in der humanen Therapie ein Hindernis darstellt und der anti-humane-Fc Antikörper sich gegen humane Antikörper im Menschen richtet, kann diese Art der Applikation *in vivo* nicht verfolgt werden.

Erst eine Reformatierung von Palivizumab zu scFvFc Fusionsproteinen in zwei Orientierungen *heavy chain-light chain* (HL, P^{scFv}HLFc) oder *light chain-heavy chain* (LH, P^{scFv}LHFc)) aktivierte die AIP^{VHH}gp130 zur gp130-induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen. Die Distanz der hypervariablen Regionen von P^{scFv}LHFc (90 Å) oder

P^{scFv}HLFc (114 Å) wurde durch Deletion der CH1 Domäne verkürzt und mit AlphaFold zur Veranschaulichung modelliert [293]. Die gp130 Signalweiterleitung mittels SyCyR erfolgte erst nach Bindung der synthetischen Liganden ohne autonome Aktivierung. Der humanisierte mAb Ustekinumab induzierte keine Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen mit AIP1-4^{VHH}gp130. Damit wurde die spezifische Aktivierung der AIP^{VHH}SyCyR gezeigt.

Interessanterweise zeigten die AIP^{VHH}gp130 SyCyR Varianten unterschiedliche Aktivierungsmuster in Abhängigkeit der P^{scFv}Fc Liganden. AIP1^{VHH}gp130 und AIP3^{VHH}gp130 induzierten in Anwesenheit von P^{scFv}LHFc eine effiziente dosisabhängige Proliferation und Signaltransduktion der Ba/F3-gp130 Zellen. Im Gegensatz dazu wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit AIP2^{VHH}gp130 nur von P^{scFv}HLFc mit vergleichbarer Proliferation und Signaltransduktion angeregt. Dabei unterscheiden sich die AIP^{VHH}gp130 Varianten nur in den *complementarity-determining regions* (CDR) der AIP^{VHH}. Die Anzahl der Aminosäuren in der Juxtaposition, der TM und der ICD des gp130 Rezeptors wurde nicht verändert [193, 195, 198]. Die Beobachtung, dass die spezifische Aktivierung von AIP2^{VHH}gp130 allein durch P^{scFv}HLFc reguliert wird, spricht für eine veränderte Topologie der Rezeptorkomplexe im SyCyR System.

2.3. DIE ARCHITEKTUR BEEINFLUSST DIE SIGNALTRANSDUKTION DER AIP^{VHH}SYCYR

Wie Zytokine über ihre Bindung an den extrazellulären Bereich des Rezeptors die Signalübertragung koordinieren und über die strukturelle Geometrie ihre Signalantwort initiieren, ist Gegenstand aktueller Forschung und kann durch hochpräzise biophysikalische Messungen zunehmend besser untersucht werden. Dabei ist die Übertragung der Bindungsgeometrie über die Transmembran auf die ICD zur Aktivierung der JAK Teil der Fragestellung [4].

Es spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle, die nach der Bindung eines Zytokins den Signalweg beeinflussen: Die Bindungsaffinität, die Effizienz und Art der Dimerisierung, die Rezeptordynamik, andere beteiligte Ko-Rezeptoren und die Art und Dauer der Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes [217, 289]. Wie von Martinez-Fabregas und Kollegen gezeigt, können sich die Phosphorylierungsmuster und die Signalstärke zwischen STAT1 und STAT3 je nach Affinität des Zytokins unterscheiden [289]. Dabei kann die Signaltransduktion sowohl durch die Geometrie als auch die Distanz der Liganden verändert werden. Im Falle der Bindungskinetik des IL-6:gp130 Komplexes führen IL-6 Mutationen mit höherer Affinität zu einer veränderten Aktivierung von Signalwegen und deren Intensität [289]. Beispielsweise beeinflusst HIL-6 durch die hohe Affinität zu gp130 nicht nur

die Signalstärke von STAT1, sondern auch das STAT1/STAT3 Phosphorylierungsverhältnis und den Phosphorylierungsgrad von Y701 und Y705 bei STAT3, was insgesamt zu einer veränderten Zellantwort und Genexpression führt [289]. Dies unterstreicht die entscheidende Rolle der Stabilität des Zytokin-gp130-Komplexes für die Signalaktivität.

Die AIP1^{VHH}gp130 und AIP2^{VHH}gp130 zeigen ein ähnliches Proliferationsverhalten wie HIL-6 (AIP1^{VHH}gp130 EC₅₀: 0,21 nM, AIP2^{VHH}gp130 EC₅₀: 0,7 nM). Die in Publikation 3 verwendete Vergleichskontrolle wurde mit 10 ng/ml HIL-6 angesetzt und entspricht 0,17 nM [138, 149]. Im Gegensatz dazu zeigte die AIP3^{VHH}gp130 Variante eine höhere EC₅₀ (6,6 nM, 9,1 nM) im Proliferationsverhalten. Neben dem ähnlichen Proliferationsverhalten der AIP^{VHH}gp130, wurde die Imitierung des Signaltransduktionsweges untersucht. Dabei zeigten AIP1-4^{VHH}gp130 nach der Stimulation mit 10 nM P^{scFv}LHFc, jedoch nicht mit Palivizumab, eine Aktivierung von STAT3-Y705 als Teil des JAK/STAT Signaltransduktionsweges. Weitere Signalmoleküle, wie ERK1/2 und Akt/PI3K sollten im Rahmen der IL-6-typischen Signaltransduktion in ihrer zeitabhängigen Aktivität untersucht werden [193, 289]. Dabei kann das kinetische Aktivierungsprofil zwischen pSTAT3 und SOCS3 von HIL-6 als Vergleichskontrolle dienen und sollte mit den AIP^{VHH}gp130 übereinstimmen. Solch ein kinetischer Verlauf wurde bereits mit dem synthetischen IL-23 Signalweg über 8 h untersucht und damit die Imitierung der typischen Signalwege gezeigt [193]. Der Austausch der extrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren durch Nanobodies beeinflusste dabei nicht die Signalstärke und Kinetik. Dies zeigte sich in einer Transkriptomanalyse zwischen natürlichem und synthetischem IL-23-Rezeptorkomplex mit einer hohen Übereinstimmung der Genregulation von 97%, die in einer *pathway*-Analyse den gleichen Signalwegen zugeordnet werden konnten [193]. Da die Signaltransduktion nicht nur durch die ICD definiert wird, sondern die Art und Genauigkeit der gesamten Rezeptorarchitektur die Signaltransduktion und -stärke beeinflusst, sollten die neuen AIP^{VHH}gp130 SyCyR Varianten in einem zeitabhängigen Aktivierungsprofil detaillierter mit dem Profil von gp130 verglichen werden [289].

Im Falle des EpoR, korrelierten die Abstände der Dimere mit der Signalstärke und Varianz in dem Sinne, dass agonistische Liganden die ECD des EpoR näher beieinander assemblierten, während die nicht-agonistische Liganden eine größere Entfernung der ECD zeigten [290]. Da die Bindung von STAT und damit die Signaltransduktionswege vom Rezeptorkomplex und der Architektur der Assemblierung mit dem Zytokin abhängen, kann die Zellantwort in Abhängigkeit von der Ligandenaffinität und somit der Liganden-Rezeptor Kinetik maßgeschneidert moduliert werden [290, 294].

Um die Signaltransduktion von AIP^{VHH} SyCyR zu modifizieren, könnten die synthetischen Liganden optimiert werden. Eine systematische Untersuchung könnte topologische Unterschiede in der Dimerisierung von gp130 SyCyR im Zusammenhang mit der Dimerarchitektur und Signaltransduktion und -Funktion ermöglichen. Die P^{scFv}Fc Liganden weisen trotz größerer Abstände zwei Bindungsstellen für die Dimerisierung und Signalübertragung des gp130 SyCyR auf. Die P^{scFv} könnten durch eine Deletion in der Gelenkregion des Fc-Tags näher zusammengeführt werden oder unterschiedliche Linkerformate könnten eine aktive Rezeptorkonstellation begünstigen [295]. Des Weiteren könnte die flexible Gelenkregion des Fc-Tags ein Grund für eine ungünstige Rezeptorkonstellation sein. Die Formatierung des Antikörpers erfordert für die Rezeptoraktivierung zwei Aufgaben: (I) die Dimerisierung und (II) die Einstellung einer rigiden Rezeptorformation für die Signaltransduktion [296, 297]. Soll ein mAb weiterhin als dimerer Ligand verwendet werden, können Gelenkregionen anderer humaner IgG-Klassen in der Aktivierung untersucht werden. Dabei könnte die Gelenkregion des IgG3 mit der höchsten Flexibilität vermutlich die geringste Aktivierung hervorrufen, während die Hingeregion des IgG2 mit der höchsten rigiden Struktur eine veränderte Aktivierung zeigen könnte [298].

Obwohl AIP4^{VHH} eine biophysikalisch hohe Affinität zu Palivizumab aufwies (K_D: 3,14 nM), zeigte die Konstellation dieses AIP^{VHH} SyCyRs in Kombination mit verschiedenen P^{scFv}Fc Liganden keine zelluläre Aktivierung durch den JAK/STAT-Signalweg. In einer Studie wurde berichtet, dass ein agonistisches EPO-Peptid durch eine einzige chemische Modifikation in ein antagonistisches Peptid umgewandelt wurde [291, 292]. Die Kristallstrukturen beider Peptidliganden, die an EpoR gebunden waren, zeigten zwar dimere Komplexe, jedoch führte eine leichte Drehung des Rezeptors um etwa 15° dazu, dass der Antagonist den dimeren Rezeptorkomplex nicht aktivieren konnte [291, 292]. Die Bindung an EpoR und die dimere Konstellation konnten gezeigt werden, jedoch war die Rezeptorkonstellation nicht in der Lage, die Signaltransduktion zu initiieren. Möglicherweise kann AIP4^{VHH} durch eine ungünstige Rezeptorkonstellation trotz Bindung und Rekrutierung beider gp130 die Signaltransduktion von gp130 SyCyR nicht initiieren, was durch mikroskopische Kollokalisationsuntersuchungen geklärt werden könnte [299].

2.4. AIP^{VHH} AKTIVIEREN APOPTOSE MIT FAS SYCYR

Der Fas Rezeptor ist als der Todesrezeptor unter der TNFR-Superfamilie beschrieben und wird durch einen homotrimeren, membrangebundenen FasL aktiviert [10]. Innerhalb der TNFR-Superfamilie ist bekannt, dass dieser und andere Rezeptoren in einem *Cluster* von mehr als drei Rezeptoren eine Verstärkung der Apoptose induzieren [7]. Der Fas Rezeptor

initiiert über die intrazelluläre *death domain* (DD) nach Aktivierung durch das trimere FasL die apoptotische Kaskade, die eine katalytische Aktivierung der Pro-Caspase-8 auslöst. Eine Konformationsänderung durch die Aktivierung von FasL bildet einen Fas-FADD Komplex, der als *death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet wird [300]. Diese DISC führt zum *clustern*, indem weitere Rezeptoren zusammengeführt werden und die Pro-Caspase-8 in räumliche Nähe mit weiteren Pro-Caspasen-8 kommt. Durch dieses *clustern* wird die Apoptose in den Zellen schneller und effektiver induziert [301].

Das SyCyR System wurde von Mossner und Kollegen weiterentwickelt, indem höhere Strukturen in der Assemblierung anvisiert wurden [195]. Die VHH gegen GFP und mCherry wurden mit den Rezeptoren der TNFR-Superfamilie fusioniert, um die Funktionalität der SyCyR als trimeres System zu demonstrieren (**Abbildung Publikation 2**). In dieser Arbeit wurden die funktionellen AIP1-3^{VHH} um den Fas Rezeptor zur Regulation der Apoptose erweitert [198]. Eine höhergeordnete Rezeptoraktivierung in trimerer Form bzw. *Cluster*-Assemblierung sollte auf die Funktionalität der AIP^{VHH} untersucht werden, indem multimere Liganden erzeugt wurden. Die AIP1-3^{VHH}Fas SyCyR wurden in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert, um die zelluläre Proliferation und die Aktivierung der Caspase-3 zu analysieren. Zusätzlich wurde die Viabilität der Ba/F3-gp130 Zellen mit AIP1-3^{VHH} Fas nach 24-48 h durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD untersucht. Die Ba/F3-gp130 Zellen proliferierten mit 10 ng/mL HIL-6 um die Vitalität über diesen Zeitraum zu erhalten. Die dimeren P^{scFv}LHFc und tetrameren 2×P^{scFv}LHFc Liganden wurden entwickelt, um dimere bzw. tetramere AIP1-3^{VHH}Fas Rezeptoranordnungen zu induzieren. Der tetramere Ligand 2×P^{scFv}LHFc wurde durch eine Tandemanordnung von zwei P^{scFv} über einen Peptidlinker erreicht und mit einem IgG1-Fc Fragment fusioniert. Die *Cluster*-Assemblierung der AIP^{VHH}Fas SyCyR wurde durch Vernetzung von 2×P^{scFv}LHFc mit hFc-mAb in einem Molverhältnis von 1:6 induziert.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung von Fas SyCyR durch die synthetischen P^{scFv}LHFc Liganden zu einem Verlust der zellulären Proliferation und zu einer Aktivierung von Caspase-3 führte [198, 302]. Sowohl in früheren Arbeiten als auch in dieser Publikation führte bereits die Aktivierung von Fas SyCyR als Dimer zu einem Verlust der Proliferation nach 24 h. Die Färbung apoptotischer Vorgänge in Ba/F3-gp130 Zellen mit Annexin V und 7-AAD zeigte, dass die aktivierten Fas SyCyR über Dimere zwar Apoptose induzieren, jedoch in geringerem Ausmaß und zeitlich verzögert [195]. Eine Analyse der Ba/F3-gp130 Zellen nach 24 h zeigte eine schwache Induktion von Apoptose durch AIP1^{VHH}Fas, wobei mehr als 50% der Zellen apoptotisch waren. Eine dimere Aktivierung von Fas wird in einer

abgeschwächter Form beschrieben, während die Rekrutierung und autokatalytische Aktivierung von Pro-Caspase-8 durch die *Cluster*-Assemblierung im Vergleich mit der trimeren Variante verstärkt wird [301]. Während der DISC Bildung interagieren zwei vorassemblierte trimere Fas Rezeptoren, um die Konformationsänderung zu stabilisieren und damit die FADD Bindung zu ermöglichen [7]. Durch diese initiale dimere Anordnung summieren sich höher geordnete Oligomere [7]. Dennoch könnte eine dimere Anordnung für die Aktivierung der Pro-Caspase 8 ausreichen, die durch Dimerisierung autokatalytisch aktiviert werden kann [303]. Ein Indiz der dimeren Aktivierung zeigte Boschert und Kollegen. Dabei zeigte eine chimäre Fusion aus TNFR und Fas eine dimere Induktion von Apoptose, indem der Ligand mit einer oder zwei Rezeptorbindungsstellen die TNFR-Fas-Chimäre aktivierte [304]. Diese Hypothese konnte zum erstmals von Mossner und Kollegen mit dem Fas SyCyR System bestätigt werden, da die Rezeptoren nun gezielt mit einem synthetischen Dimer aktiviert werden konnten [195]. Die Aktivierung als Dimer im weiterentwickelten AIP^{VHH}Fas unterstützte diese Art der Konstellation [198].

Darüber hinaus wurden die AIP1^{VHH}Fas und AIP3^{VHH}Fas SyCyR effektiv durch die tetrameren Liganden in die Apoptose geführt. Im Gegensatz dazu wurde AIP2^{VHH}Fas weiterhin nicht durch den P^{scFv}LHFc Liganden aktiviert. Die Caspase3/7 Aktivität wurde nach 6 h untersucht und soll das Maß von Apoptose widerspiegeln [196]. Dabei wurde der AIP3^{VHH}Fas SyCyR bereits mit den niedrigsten Konzentrationen mit 2×P^{scFv}LHFc effektiv zur Caspase3/7 Aktivierung angeregt. Die Aktivität unterschied sich bereits ab einer Konzentration von 1 nM 2×P^{scFv}LHFc nicht von der *Cluster*-Assemblierung bei gleicher Konzentration. AIP1^{VHH}Fas wurde nur mit der *Cluster*-Assemblierung effektiv zur Apoptose angeregt.

Hiermit wurde gezeigt, dass die Effektivität der Apoptosestärke eine oligomere Rezeptoranordnung begünstigt, jedoch Fas das Potenzial hat als Dimer aktiviert zu werden. Um die genauere Geometrie der Fas SyCyR Aktivierung zu untersuchen, könnten Studien mit spatio-temporalen Dynamik angestrebt werden [300]. Damit könnte die Frage beantwortet werden, ob es sich tatsächlich um eine Dimeraktivierung oder um Spezies höherer Clusterordnung handelt. Die Rezeptoren könnten mit GFP erweitert werden, welche mit einem Nanobody (GFP^{VHH}) detektiert werden [290]. Zwei verschiedene Fluoreszenzmoleküle werden an jeweils einen Nanobody gebunden, so dass die Bewegung und Lokalisation der Rezeptorkomplexe über einen bestimmten Zeitraum untersucht werden kann [289]. Dies könnte zur grundlegenden Aufklärung der Fas Rezeptoraktivierung beitragen.

2.5. DIE FAS SYCYR-TECHNOLOGIE IN DER AUFLÄRUNG VON FAS SIGNALWEGEN

Eine niedrige Dosis eines agonistischen Fas Antikörpers induzierte bereits nach 2 h starke Blutungen in der Leber, die nach 8 h zum Tod der Mäuse mit massivem Leberschaden führten [305]. Ob die Hepatozyten aufgrund des Antikörpers apoptotisch waren oder ein indirekter Mechanismus zum Leberversagen führte, könnte mit der Fas SyCyR-Technologie über eine zelltyp-spezifische Expression gezielt untersucht werden [306].

Viele Studien konzentrieren sich nun auf den Einfluss von Fas bei Inflammation, Wachstum, Proliferation oder Differenzierung [302]. Wird FADD über eine starke Aktivität der PI3K-Signalkaskade unterdrückt, wird der DISC Komplex und damit die Apoptose verhindert [307]. Weitere Signalwege, wie MAPK und NF κ B sind aktiv, aber in ihrem Mechanismus unbekannt [308, 309]. Die Hauptakteure in der Induktion von Apoptose durch Fas sind durch die Aktivierung der Caspase-8-Kaskade gut beschrieben [196]. Allerdings ist die Zahl der Publikationen, die sich mit der Beteiligung des Fas Rezeptors an der Rolle der proinflammatorischen Expression von Zytokinen befassen, überschaubar [302].

Die Beteiligung von Fas fördert die proinflammatorische Aktivität von Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Hepatozyten und Keratinozyten. Dabei umfasst die Fas Aktivierung die Induktion der Zytokine und Chemokine IL-6, IL-8, CXCL1, RANTES, IL-1 β , TNF, MCP-1 und GM-CSF [302]. Weitere biologische Funktionen scheinen im Zusammenhang mit der Aktivierung und Maturation dendritischer Zellen, Zellmigration und Proliferation zu stehen. Die Funktion von Fas bei der Induktion von Apoptose in Tumorzellen wandelte sich im Laufe der Zeit zum Tumoraktivator, so dass die Rolle von Fas in der alleinigen Apoptoseaktivierung überdacht wurde [307].

Das *FLICE-like inhibitory protein* (c-FLIP) kann ebenfalls zur DD rekrutiert werden und blockiert die Aktivierung von Caspase-8 und damit die Induktion von Apoptose [308]. Es ist unbekannt, ob der Einfluss von c-FLIP nicht nur zwischen Leben und Tod unterscheidet, sondern auch an der alternativen Aktivierung verschiedener Signalwege involviert ist (**Abbildung 1**) [310]. Zusätzlich wurden die Signalmoleküle RIPK1, TRAF2, cIAP-1 und cIAP-2 im Fas Signalkomplex nachgewiesen [302]. Diese Signalmoleküle sind für die Induktion der Entzündung und Zellüberleben in der TNFR Signaltransduktion bekannt, jedoch ist die Funktion im Komplex des Fas Rezeptors unbekannt [302].

So kann mit dem SyCyR System der Einfluss des Todesrezeptors bei inflammatorischen Krankheitsbildern wie Arthritis, Dermatitis oder Krebs untersucht werden, indem durch Aktivierung von Fas SyCyR bestimmte Zelltypen selektiv angesprochen werden können [311]. Dies ist bisher nicht im Detail beschrieben, was unter anderem an der

Redundanz von FasL, FasL-interagierender *Decoy*-Rezeptoren, alternativen *splicing* Varianten von Fas und der Aktivierung weiterer Zelltypen liegen könnte [10, 312, 313]. Die Aktivierung von Fas SyCyR erfolgt spezifisch ohne Hintergrundaktivierung durch endogenes FasL aus anderen Zellpopulationen und ohne Aktivierung anderer Rezeptoren wie dem *decoy receptor 3*. Beispielsweise könnte man den gezielten Einfluss der Fas-induzierten JNK-Aktivierung als Signalkaskade in der Tumorprogression untersuchen, die im molekularen Detail noch unklar ist [309].

Eine Studie konnte zwar einen Zusammenhang zwischen löslichem FasL und der Entwicklung hepatischer Tumoren und erhöhter Inflammation herstellen, ohne jedoch den genauen Mechanismus zu identifizieren [314]. Es wurde über eine Beteiligung des NFκB-Signalweges spekuliert und diese Spekulation stellt eine Herausforderung dar, die über eine spezifische Fas SyCyR Regulation untersucht werden könnte. So können in einem *in vivo* Tumormodell die Tumorzellen über mCherry oder P^{scFv}Fc mit Fas aktiviert werden und damit die Frage beantwortet werden, ob Fas über die Induktion von Zytokinen und Chemokinen eine autokrine wachstumsfördernde Wirkung auf den Tumor haben kann. Weiterhin könnte der hypothetische Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NFκB und der Expression von Apoptose-inhibierenden Molekülen im Tumor wie c-FLIP, Bcl-xL und cIAP, untersucht werden [310]. Darüber hinaus können Faktoren für die Rekrutierung von *Tumor-Associated Macrophages* (TAMs) und *Myeloid-derived Suppressor Cells* (MDSC) über die Stimulation von Fas SyCyR auf transformierten Zellen untersucht werden [302].

2.6. DIE ANWENDUNG VON FAS SYCYR IN DER CAR-T-ZELLTHERAPIE

In vitro wurde bereits die Funktionalität des SyCyR Systems für verschiedene Rezeptorarten gezeigt [193-195, 315]. *In vivo* evaluierte eine hydrodynamische Injektion die Aktivität, Spezifität und Nontoxizität der gp130 SyCyR. In Zukunft werden CAR-T-Zelltherapien neue Tools benötigen, die mit aktivierenden oder supprimierenden Rezeptoren die Aktivität von CAR-T-Zellen regulieren können, da eine Behandlung mit schweren Nebenwirkungen verbunden sein kann [316]. Systemische akute Toxizitäten treten häufig in Form einer überschießenden Immunaktivierung auf, die sehr häufig zu einem *cytokine release syndrome* (CRS) führen kann [187]. Zwei Methoden adressieren die Regulation neuer CAR-T-Zelltechnologien durch die Verwendung von *OFF-switches* oder Suizidgenen zur Ausschaltung der CAR-Aktivität bei Zytokin-vermittelter Toxizität oder *off-target* Effekten [185]. Die Implementierung von Suizidgenen zur CAR-T-Zelldepletion durch Injektion von *small molecules* ist ein Ansatz zur Sicherheit und Verminderung der Toxizität und wird als iCasp9 zur Induktion von Apoptose eingesetzt [187]. Induzierbare Todesrezeptoren wie

iCasp9 oder Fas SyCyR könnten die Sicherheit der CAR-T-Zelltherapie in der Immuntherapie erhöhen [185].

Die *Proof-of-concept* Evaluierung der Apoptose durch das Fas SyCyR System erfolgte bisher ausschließlich im gentechnisch veränderten Ba/F3 Zellsystem [155, 195, 196]. Zum Nachweis der Funktion sollte der Fas SyCyR in weiteren Zellsystemen, wie z.B. Jurkat T-Zellen, getestet werden. Ferner könnte das SyCyR System mit Hilfe der LoxP Technologie unter einem CD4 Promoter T-Zell-spezifisch exprimiert werden, um eine *in vivo* Charakterisierung des SyCyR Systems zu ermöglichen [317]. Nicht nur die Aktivität der Rezeptoren, sondern auch die hintergrundfreie und spezifische Aktivierung könnte evaluiert werden. Weiterhin könnte die Toxizität von Teilkomponenten, wie synthetische Liganden oder VHH, im Mausmodell untersucht und die Übertragbarkeit auf eine therapeutische Anwendung gezeigt werden. Da das Ziel von Fas SyCyR in der CAR-T-Zelltherapie die Induktion von Apoptose sein könnte, könnten Vorarbeiten mit Mäusen, die Antikörper-vermittelte Apoptose induzieren als Vergleichsstudien zur T-Zelldepletion Aufschluss über die Effektivität geben [318]. Ferner sollte das Endergebnis bei der Induktion von Fas SyCyR untersucht werden, was zu kontroversen Ergebnissen führen könnte, die im weiteren Verlauf vertieft werden [307].

Der membranständige FasL ist entscheidend für die Regulation der Apoptose, während der lösliche FasL zwar an den Rezeptor bindet, aber ohne aktivierende Wirkung an proinflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt ist [10]. Im Allgemeinen ist die Signalregulation durch Fas an der Funktion zytotoxischer T-Zellen beteiligt und reguliert die T-Zellhomöostase. Ferner wurde für T-Zellen gezeigt, dass der membranständige FasL für die Fas-induzierte Apoptose notwendig ist, während die lösliche Variante keinen Einfluss auf den Zelltod hat [319]. Interessanterweise entwickelten Mäuse, die nur den löslichen FasL exprimierten, einen proinflammatorischen Phänotyp, der durch erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 und TNF gekennzeichnet war [314]. Diese Tiere starben schließlich an einer Autoimmunerkrankung und damit verbundener Tumorbildung in Leber und Milz [314]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Fas-induziertes IL-6 das Überleben von T-Zellen fördert, indem es die STAT3-abhängige Expression der Bcl-2 Familie erhöht [302, 320]. Die TCR-induzierte Proliferation von T-Zellen wurde mit der Aktivierung von Caspasen in Verbindung gebracht, die durch Caspaseninhibitoren blockiert wurde [321]. Die TCR-Stimulation und damit aktivierte T-Zellen zeigten eine erhöhte Expression von FasL [322]. Diese stimulierende Rolle von Fas bei der Aktivierung von T-Zellen deutet auf die Möglichkeit eines autokrinen

Loops hin. Dieser könnte die TCR-induzierte Fas-Regulation über einen nicht-apoptotischen Caspase-abhängigen Signalweg in der T-Zellproliferation regulieren [323].

Welchen Effekt letztlich der lösliche synthetische Ligand im *in vivo* Fas SyCyR Modell auslöst, bleibt ungeklärt. Die Depletion von CAR-T-Zellen über die Fas SyCyR-Technologie könnte im CRS Szenario angewendet werden. Entscheidend für den Erfolg von Fas SyCyR bei der Depletion von CAR-T-Zellen wäre eine effiziente und schnelle Apoptose und der Ausschluss der Fas-induzierten IL-6 Sekretion, die nicht nur die Apoptose der CAR-T-Zellen verhindern würde, sondern auch zum pathologischen CRS Bild beitragen könnte.

Zusammenfassend ermöglicht die SyCyR-Technologie eine maßgeschneiderte Aktivierung durch die Rekrutierung definierter Rezeptoren und Analyse redundanter Signalwege im Hinblick auf eine potenzielle therapeutische Anwendung. Das SyCyR System induziert die Signaltransduktion ohne Hintergrund, Toxizität oder Immunogenität der synthetischen Liganden. Das System ist regulierbar durch die Anwendung von löslichen VHH Inhibitoren, die gegen die synthetischen Liganden gerichtet sind und somit die Signaltransduktion inaktivieren.

2.7. KONSTITUTIV AKTIVE REZEPTOREN ÜBER EINE PPCL-INSERTION

Als Hormone des Immunsystems sind Zytokine an der Differenzierung, Viabilität und Zellwachstum beteiligt. Eine Familie von Typ-I Zytokinrezeptoren teilt sich den *common cytokine receptor γ -chain* (γ_c , CD132, IL-2R γ) und beherbergt die IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 [29]. Nach einer Bindung des Zytokins an den entsprechenden Rezeptor erfolgt die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle über den JAK/STAT-, Akt/PI3K- oder MAPK-Signalweg [27]. Das IL-7 bindet an den IL-7 Rezeptor (IL-7R α) und γ_c und reguliert die T- und B-Zell Homöostase sowie die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in lymphatische Vorläuferzellen (**Abbildung Publikation 4**). Eine exzessive Aktivierung des IL-7 Signalweges führt zur akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und kann durch somatische *gain-of-function* (GOF) Mutationen in IL-7R α verursacht werden [27]. Die Mehrzahl der konstitutiv aktivierenden Mutationen kodieren für ein zusätzliches Cystein in der Transmembrandomäne (TMD) oder in der Juxtamembrandomäne, was zu einer ligandenunabhängigen Homodimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken führt [324]. Eine dieser somatischen Mutationen, die in ALL resultiert, ist die Insertion PPCL in der TMD von IL-7R α [33, 35, 325].

In Publikation 4 wurde die funktionelle Übertragbarkeit der IL-7R α TMD mit der PPCL-Insertion auf Klasse I und II Zytokinrezeptoren untersucht [199]. Hierfür wurden jeweils die natürliche und synthetische Variante des signaltransduzierenden β -Rezeptors

gp130 aus der IL-6 Familie, des IL-23R aus der IL-12 Familie und IL-7R α als Teil der Klasse I Zytokinrezeptorfamilie mit der PPCL-Insertion modifiziert. Weiterhin wurde der Typ I Interferon α/β Rezeptor 2 (IFNAR2) als Vertreter der Klasse II der Zytokinrezeptoren als SyCyR mit der IL-7R α TMD inklusive der PPCL-Insertion ergänzt [4, 193, 197]. Die SyCyR-Technologie wurde als Phänokopie natürlicher Signalwege über Zytokinrezeptoren genutzt und mit synthetischen Liganden (GFP oder mCherry) spezifisch aktiviert.

Die natürliche IL-7 Signalweiterleitung basiert auf der Bindung von IL-7 an den IL-7R α und γc . Das SyCyR System wurde zunächst für eine Phänokopie der natürlichen IL-7 Signaltransduktion verwendet. Dazu wurde der extrazelluläre Teil von IL-7R α und γc durch einen mCherry VHH (V_C) bzw. GFP VHH (V_G) ersetzt. Anschließend wurden die SyCyR (V_CIL-7R α und V_G γc) retroviral in Ba/F3-Zellen transduziert und mittels FACS auf der Oberfläche detektiert. Die Ba/F3 Zellen wurden hinsichtlich ihrer Proliferation und Signaltransduktionswege untersucht. Das SyCyR System aktivierte spezifisch die jeweilige Signaltransduktion in den Zytokinrezeptoren der IL-6-, IL-23- und IFN Familie in vorherigen Studien, jedoch konnten die IL-7 SyCyR Varianten keine Proliferation oder Signaltransduktion über 2xmCherry (CC), 2xGFP (GG), oder GFP-mCherry (GC) induzieren [190, 193, 315]. Es wurden weder funktionelle synthetische V_CIL-7R α (CC) oder V_G γc (GG) Homodimere, noch V_CIL-7R α -V_G γc (GC) Heterodimere gebildet.

Die PPCL Mutation wurde in das V_CIL-7R α nach L243 in die TMD (c.819ins12, p.P243insPPCL) inseriert, um eine konstitutive IL-7 Signaltransduktion über Homodimere zu forcieren [35]. Die Signaltransduktionswege wurden nach Insertion der V_CIL-7R α PPCL SyCyR Variante hinsichtlich der Imitierung untersucht. V_CIL-7R α PPCL induzierte ein ligandenunabhängiges Wachstum über STAT5 und ERK1/2 Phosphorylierung, welches durch den dimeren CC Liganden zusätzlich verstärkt wurde. Da Ba/F3 Zellen kein γc besitzen, wurde die Aktivierung der STAT3, STAT5 und ERK1/2 Signaltransduktion über den homodimeren V_CIL-7R α PPCL Rezeptorkomplex vermittelt [199]. Die forcierte Homodimerisierung durch die Cysteinmutation wurde von Schochat und Kollegen durch eine Mutation zu Glycin (PPGL) aufgehoben [35]. Die gleiche unter nicht-reduzierenden Bedingungen vorherrschende monomere V_CIL-7R α PPGL Variante wurde weder konstitutiv noch durch die CC Liganden aktiviert. Somit konnte gezeigt werden, dass das Cystein der PPCL-Insertion die Homodimerisierung von IL-7R α forciert und somit die ligandenunabhängige Signaltransduktion induziert [199].

Zoellner und Kollegen transferierten die SyCyR-Technologie auf die Typ-I-Interferon- α/β -Rezeptoren 1 und 2 und phänokopierten über die spezifische Aktivierung mit den

synthetischen Liganden die IFN Signaltransduktion [197]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der synthetische IFNAR2 biologisch aktive Homodimere bilden kann [197, 326]. Vor diesem Hintergrund wurde die Funktionalität der IL-7R α TMD mit PPCL und PPGL im synthetischen IFNAR2 (V_GIFNAR2_{PPCL}, V_CIFNAR2_{PPCL}, V_GIFNAR2_{PPGL}, V_CIFNAR2_{PPGL}) hinsichtlich der IFN-Signaltransduktion über STAT1 und STAT2 Phosphorylierung untersucht [199]. Die PPCL-Insertion in V_GIFNAR2_{PPCL} und V_CIFNAR2_{PPCL} induzierte eine ligandenunabhängige STAT1 und STAT2 Phosphorylierung, während die PPGL Variante keine ligandenunabhängige Signaltransduktion vermittelte. Die Stimulation von V_GIFNAR2_{PPGL}, V_CIFNAR2_{PPGL} mit GG oder CC zeigte eine Aktivierung der IFN-typischen Signaltransduktionswege STAT1 und STAT2 und bestätigte damit die Funktionalität der synthetischen Rezeptorkomplexe mit PPGL Mutation [199]. Zwei weitere Kontrollvarianten (V_GIFNAR2_{PPSL} und V_CIFNAR2_{PPCL}+C261G) zeigten, dass die Disulfidbrücke zwischen zwei PPCL Motiven für die Dimerisierung der Rezeptoren und damit für die ligandenunabhängige Signaltransduktion verantwortlich ist [199].

SyCyR Systeme phänotypisierten die IL-23 Signaltransduktion und zeigten, dass der homodimere IL-23R Komplex ohne IL-12R β 1 biologisch aktiv ist [193]. Einige Studien postulierten eine homodimere IL-23R Aktivierung der IL-23 Signaltransduktion über diverse biologische Funktionsanalysen [193, 327]. Jedoch konnte der synthetische IL-23R spezifisch über einen synthetischen Liganden angesteuert werden und bestätigte vorherige Hypothesen, dass der IL-23R keinen weiteren Rezeptor benötigt um eine Signaltransduktion initiieren [193]. Die IL-7R α TMD mit der PPCL oder PPGL Insertion wurde in IL-23R und gp130 als natürliche und synthetische Klasse I Zytokinrezeptor Familie inseriert. Sowohl die natürlichen Chimären (gp130_{PPCL} und IL-23R_{PPCL}) als auch die synthetischen Varianten (V_Ggp130_{PPCL} und V_GIL-23R_{PPCL}) induzierten eine ligandenunabhängige STAT3 Phosphorylierung und eine damit verbundene zelluläre Ba/F3-Proliferation. Im Gegensatz dazu konnte eine Zellproliferation bei den PPGL-Rezeptorkomplexen nur nach Zugabe der natürlichen (HIL-6, HIL-23) oder synthetischen Liganden (GG) beobachtet werden. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass durch die Insertion der IL-7R α TMD mit PPCL natürliche und synthetische Klasse I Zytokinrezeptoren ligandenunabhängig über eine Disulfidbrücken-forcierte Homodimerisierung aktiviert werden können.

Ligandenunabhängige, konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren werden bei Patienten mit Krankheiten in Verbindung gebracht [27]. Diese Mutationen sind in der extrazellulären, transmembranen oder intrazellulären Domäne und können in der synthetischen Biologie zur Untersuchung von Pathologien genutzt werden [41]. Konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren

können in transgenen Mäusen zur Analyse von Erkrankungen eingesetzt werden, um Krankheiten zu analysieren und therapeutische Strategien zu entwickeln [328]. Somatische GOF Mutationen in IL-7R α bei T-ALL Patienten beherbergen zumeist eine Cysteininsertion (14 von 17 GOF), die konstitutiv aktive IL-7R α Varianten bildet und zu einer exzessiven Aktivierung des IL-7 Signalweges führt [33, 35, 325]. Interessanterweise existieren keine natürlich vorkommende konstitutiv aktive Varianten von γ_c [324].

Ein Beispiel für eine Cystein-vermittelte Rezeptorhomodimerisierung in der IL-7R α TMD ist die Insertion CPT (p.Thr244_Ile245insCysProThr), die unabhängig von IL-7 oder γ_c zu einer konstitutiven Hyperaktivierung führt [33]. Die Dimerisierung von IL-7R α durch die CPT Insertion konnte mit einer Substitution von Cystein vollständig aufgehoben und dabei die konstitutive Signaltransduktion unterbrochen werden. Dieses Beispiel wurde in der Forschung als Werkzeug eingesetzt (C7R: Chimäre aus CD34 und CPT-IL-7R α), indem die C7R Variante die Antitumoraktivität von CAR-T-Zellen in Xenograftmodellen mit Neuroblastomen und Glioblastomen erhöhte [329]. Darüber hinaus verbesserte die C7R Variante die Antitumoraktivität von CAR-T-Zellen in einem Mausmodell mit dreifach negativem Brustkrebs [330]. In einer klinischen Studie (NCT04664179) wurde die C7R Variante in Epstein-Barr Virus (EBV)-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit EBV-positivem Lymphom evaluiert [331]. Die C7R CAR-T-Zellen zeigten *in vitro* kein ligandenunabhängiges Wachstum oder Überleben, obwohl die konstitutiv aktive IL7R α Variante zu ALL führte. Die somatischen Mutationen wurden in T-Vorläuferzellen und nicht in reifen T-Zellen nachgewiesen, die in CAR-T-Zelltherapien eingesetzt werden [329, 332]. Dadurch könnten sich Unterschiede in der Wachstumskinetik ergeben, welche kritisch evaluiert werden sollten.

Die CPT-IL-7R α Variante wurde als Werkzeug in transgenen Mäusen zur Untersuchung der progressiven B-ALL eingesetzt [36]. In diesem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine CPT-forcierte IL-7 Rezeptorhomodimerisierung über eine STAT5- und PI3K/mTOR-Signalaktivierung zur B-ALL Entstehung beiträgt [36]. In Übereinstimmung mit früheren Studien induzierte die hier verwendete Insertion (p.P243insPPCL) Ba/F3-Zellen zum ligandenunabhängigen Wachstum ebenfalls über eine konstitutive STAT5 Phosphorylierung [35]. Transgene Mäuse mit der IL-7R α PPCL-Insertion in B-Progenitorzellen entwickelten B-ALL [333]. Indem konstitutiv aktive Rezeptoren in präklinischen Modellen untersucht wurden, konnte eine Korrelation zwischen den Cysteininsertionen und der Rolle des homodimeren IL-7R α bei Leukämieerkrankungen gezeigt werden. Darüber hinaus können in Zukunft Kombinationstherapien und andere

biologische Ereignisse, die durch diese Insertionen ausgelöst werden, untersucht werden, um Patienten mit ALL besser mit fundiertem Wissen helfen zu können [36, 331, 333].

2.8. EINSATZMÖGLICHKEITEN DER SYCYR_{PPCL}

Als *proof-of-concept* Modell konnte die aktivierende PPCL-TMD-Variante auf andere Zytokinrezeptoren übertragen werden, um somit eine konstitutive Signalantwort mit *boosting* Effekt zu erhalten. Diese Eigenschaft kann auf Rezeptorfamilien anderer Arten übertragen werden oder zur Funktionsuntersuchungen zur Bedeutung des Rezeptors genutzt werden [324, 334, 335]. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser SyCyR_{PPCL} sind vielfältig. Bahnbrechende Forschungsleistungen an unzähligen synthetischen Rezeptoren haben in den letzten drei Jahrzehnten vor allem in der Immuntherapie zur Behandlung von Krebs ihr Einsatzgebiet gefunden, weshalb das Repertoire an synthetischen Schaltkreisen für das eukaryotische System ständig wächst [185]. Die neuen Generationen der CAR-T-Zelltherapie entwickeln Strategien um die drei Hauptprobleme zu minimieren: (I) T-Zell Proliferation oder Erschöpfung nach wiederholter Stimulation, (II) Steigerung der Antitumoraktivität durch Zytotoxizität und (III) CRS. Die CAR Generation (G) 2 bis 3G enthalten eine zusätzliche Domäne zu CD3 ζ (CD28 und 4-1BB) um die Proliferation und Zytotoxizität zu erhöhen [185]. 4G CARs exprimieren nach der Aktivierung konstitutiv Zytokine (IL-12, IL-7, IL-15, IL-18 und IL-23), um sich selbst und die Wirtsimmunzellen für die Antitumorantwort zu verstärken [185]. Darüber hinaus konzentriert sich die Entwicklung von 5G CAR auf die Steigerung der Antitumoraktivität durch eine zusätzliche ICD von IL-2R β , die die STAT3/5-Signaltransduktion aktiviert [185]. Die IL-23R_{PPCL} Varianten könnten nach Aktivierung von 4G CAR anstelle oder mit der Zytokinsekretion exprimiert werden und somit die proliferative Kapazität durch die Sekretion von IL-12 und IL-23 zu ergänzen [185, 336].

Die IL-7R α _{PPCL} SyCyR Variante findet ihre Anwendung in der Stimulation und Proliferation von CAR-T-Zellen sobald diese erschöpft sind. Die C7R-Variante hat bereits das Potenzial gezeigt, die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen gegen Neuroblastome und Glioblastome zu erhöhen [329]. Immunstimulierende Zytokine, wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 oder IFN- α/β unterstützen die Differenzierung, Expansion und Persistenz von CAR-T-Zellen [185, 337]. Nach der Aktivierung der CAR-T-Zellen könnte die IL-7R α _{PPCL} SyCyR Variante exprimiert werden, um eine zusätzliche Stimulation zu induzieren [338]. Analog zu 5G CAR könnte die SyCyR_{PPCL} auf den IL-2R β übertragen werden [339]. Offen bleibt die Frage, welchen Effekt die IFNAR2 SyCyR auf die Aktivität von CAR-T-Zellen haben könnten, da wenig darüber bekannt ist [340]. Von Interesse wird sein, ob der gleiche Ansatz

zur Steigerung der T-Zellaktivität auf die CAR-NK-Therapie übertragen werden kann, um die kurzlebigen NK-Zellen persistenter und effektiver zu machen [341].

IL-6 spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion des CRS nach einer CAR-T-Zellinfusion [89, 342]. Nach der Aktivierung der CAR-T-Zellen durch die Targetzellen kommt es häufig zum heftigen Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen, wobei vor allem IL-6 massiv erhöht ist. Tocilizumab ist daher seit 2018 für die Behandlung der Nebenwirkungen von CRS bei der CAR-T-Zelltherapie zugelassen [316]. Die Behandlung mit Tocilizumab beeinträchtigt die Wirksamkeit der CAR-T-Zellen nicht, was darauf hindeutet, dass die Funktion der CAR-T-Zellen ohne IL-6 Signaltransduktion verbleibt [343]. Um die IL-6 Menge zu reduzieren, wurden CAR-T-Zellen *in vivo* mit einem *Decoy*-Rezeptor gegen IL-6 getestet [344]. Die Zytotoxizität blieb *in vivo* erhalten [344]. Es bleibt offen, ob diese CAR-T-Zellstrategie CRS verhindern kann [344]. Ob eine IL-6 vermittelte Signaltransduktion jedoch relevant für die Zytotoxizität, Proliferation und Persistenz von CAR-T-Zellen ist unklar [344, 345]. Die SyCyR Varianten gp130^{PPCL} bzw. AIP^{VHH}gp130 könnten in der CAR-T-Zelltherapie auf die Wirkung der gp130-Signaltransduktion in T-Zellen untersucht werden.

Die Verwendung von natürlich vorkommenden Cysteininsertionen ist ein nützliches Werkzeug für die Entwicklung von GOF Rezeptoren. Der Transfer der PPCL TMD von IL-7R α induzierte eine ligandenunabhängige konstitutive Signaltransduktion in natürlichen und synthetischen Rezeptoren als Vertreter der Klasse I und II Zytokinrezeptoren. Synthetische Zytokinrezeptoren könnten als therapeutische Strategie nützlich sein, z.B. zur Verbesserung der CAR-T-Zelltherapie. Konstitutiv aktive Zytokinrezeptoren sollten jedoch eine zusätzliche Kontrolle über die Expression besitzen um die konstitutive Aktivierung bei Bedarf auszuschalten. Unter der Kontrolle von ON- und OFF-switch CARs könnte die Aktivität der konstitutiv aktiven Zytokinrezeptoren reguliert werden [91, 189].

LITERATURVERZEICHNIS

1. Roscher, W.H., 1845-1923, *Ausführliches Lexikon der griechischen und römischen Mythologie*. 2012-06-13 20:29:51 ed. Leipzig : B. G. Teubner. Vol. Bd.1:Abt.1. 1884.
2. Kerényi, K., *Mythologie der Griechen, Götter, Menschen und Heroen - Teil 1 und 2 in einem Band*. Vol. 14. 2013.
3. Meng, F. and T. Ellis, *The second decade of synthetic biology: 2010–2020*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 5174.
4. Spangler, J.B., I. Moraga, J.L. Mendoza, and K.C. Garcia, *Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering*. Annual Review of Immunology, 2015. **33**: p. 139-67.
5. Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Quaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, and C.A. Akdis, *Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **127**(3): p. 701-721.e70.
6. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschoop, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(1): p. 19-26.
7. Vanamee, É.S. and D.L. Faustman, *The benefits of clustering in TNF receptor superfamily signaling*. Frontiers in Immunology, 2023. **14**.
8. Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, ..., D.P. Cerretti, *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
9. Powell, W.C., B. Fingleton, C.L. Wilson, M. Boothby, and L.M. Matrisian, *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Current Biology, 1999. **9**(24): p. 1441-7.
10. Dostert, C., M. Grusdat, E. Letellier, and D. Brenner, *The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond*. Physiological Reviews, 2019. **99**(1): p. 115-160.
11. Manohar, S.M., *At the Crossroads of TNF α Signaling and Cancer*. Current Molecular Pharmacology, 2023.
12. Faustman, D. and M. Davis, *TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(6): p. 482-493.
13. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
14. Vercammen, D., G. Brouckaert, G. Denecker, M. Van de Craen, W. Declercq, W. Fiers, and P. Vandenabeele, *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(5): p. 919-30.
15. Israël, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harbor Perspectives, 2010. **2**(3): p. a000158.
16. Ermolaeva, M.A., M.-C. Michallet, N. Papadopoulou, O. Utermöhlen, K. Kranidioti, G. Kollias, J. Tschoop, and M. Pasparakis, *Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses*. Nature Immunology, 2008. **9**(9): p. 1037-1046.
17. Varfolomeev, E., J.W. Blankenship, S.M. Wayson, A.V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J.N. Dynek, L.O. Elliott, H.J. Wallweber, J.A. Flygare, W.J. Fairbrother, K. Deshayes, V.M. Dixit, and D. Vucic, *IAP antagonists induce*

- autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis*. Cell, 2007. **131**(4): p. 669-81.
18. Brenner, D., H. Blaser, and T.W. Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(6): p. 362-374.
 19. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 745-756.
 20. Atmaca, N. and H.T. Atmaca, *The correlation of TNF alpha levels with acute phase proteins in acute Toxoplasma gondii infection in mice*. Experimental Parasitology, 2022. **239**: p. 108311.
 21. Kawaguchi, M., Y. Mitsuhashi, and S. Kondo, *Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis*. British Journal of Dermatology, 2005. **152**(5): p. 915-9.
 22. Gomez, M.I., S.H. Sokol, A.B. Muir, G. Soong, J. Bastien, and A.S. Prince, *Bacterial Induction of TNF- α Converting Enzyme Expression and IL-6 Receptor α Shedding Regulates Airway Inflammatory Signaling I*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(3): p. 1930-1936.
 23. Taki, F., Y. Kondoh, K. Matsumoto, K. Takagi, T. Satake, H. Taniguchi, and M. Matsuzaki, *Tumor necrosis factor in sputa of patients with bronchial asthma on exacerbation*. Japanese Journal of Allergology, 1991. **40**(6): p. 643-6.
 24. Croft, M., C.A. Benedict, and C.F. Ware, *Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies*. Nature Reviews Drug Discovery, 2013. **12**(2): p. 147-68.
 25. Huizinga, T.W.J., Y. Torii, and R. Muniz, *Adalimumab Biosimilars in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review of the Evidence for Biosimilarity*. Rheumatology and Therapy, 2021. **8**(1): p. 41-61.
 26. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(2): p. 144-154.
 27. Barata, J.T., S.K. Durum, and B. Seddon, *Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease*. Nature Immunology, 2019. **20**(12): p. 1584-1593.
 28. González-García, S., M. García-Peydró, J. Alcain, and M.L. Toribio, *Notch1 and IL-7 Receptor Signalling in Early T-cell Development and Leukaemia*. Notch Regulation of the Immune System, 2012: p. 47-73.
 29. Winer, H., G.O.L. Rodrigues, J.A. Hixon, F.B. Aiello, T.C. Hsu, B.T. Wachter, W. Li, and S.K. Durum, *IL-7: Comprehensive review*. Cytokine, 2022. **160**: p. 156049.
 30. Todd, J.A., N.M. Walker, J.D. Cooper, D.J. Smyth, K. Downes, V. Plagnol, R. Bailey, S. Nejentsev, S.F. Field, and F. Payne, *Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes*. Nature genetics, 2007. **39**(7): p. 857-864.
 31. Lundström, W., S. Highfill, S.T. Walsh, S. Beq, E. Morse, I. Kockum, L. Alfredsson, T. Olsson, J. Hillert, and C.L. Mackall, *Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(19): p. E1761-E1770.
 32. Hartgring, S.A., C.R. Willis, D. Alcorn, L.J. Nelson, J.W. Bijlsma, F.P. Lafeber, and J.A. van Roon, *Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators*. Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(9): p. 2716-2725.
 33. Zenatti, P.P., D. Ribeiro, W. Li, L. Zuurbier, M.C. Silva, M. Paganin, J. Tritapoe, J.A. Hixon, A.B. Silveira, and B.A. Cardoso, *Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nature genetics, 2011. **43**(10): p. 932-939.

34. Oliveira, M.L., P. Akkapeddi, D. Ribeiro, A. Melão, and J.T. Barata, *IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update*. Advances in biological regulation, 2019. **71**: p. 88-96.
35. Shochat, C., N. Tal, O.R. Bandapalli, C. Palmi, I. Ganmore, G. te Kronnie, G. Cario, G. Cazzaniga, A.E. Kulozik, and M. Stanulla, *Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias*. Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(5): p. 901-908.
36. Almeida, A.R., J.L. Neto, A. Cachucho, M. Euzébio, X. Meng, R. Kim, M.B. Fernandes, B. Raposo, M.L. Oliveira, and D. Ribeiro, *Interleukin-7 receptor α mutational activation can initiate precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 7268.
37. Garbers, C., H.M. Hermanns, F. Schaper, G. Müller-Newen, J. Grötzinger, S. Rose-John, and J. Scheller, *Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2012. **23**(3): p. 85-97.
38. Vignali, D.A.A. and V.K. Kuchroo, *IL-12 family cytokines: immunological playmakers*. Nature Immunology, 2012. **13**(8): p. 722-728.
39. Hildenbrand, K., I. Aschenbrenner, F.C. Franke, O. Devergne, and M.J. Feige, *Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines*. Trends in Biochemical Sciences, 2022. **47**(11): p. 936-949.
40. Bloch, Y., J. Felix, R. Merceron, M. Provost, R.A. Symakani, R. De Backer, E. Lambert, A.R. Mehdipour, and S.N. Savvides, *Structures of complete extracellular receptor assemblies mediated by IL-12 and IL-23*. Nature Structural & Molecular Biology, 2024.
41. Floss, D., M. Schönberg, M. Franke, F. Horstmeier, E. Engelowski, A. Schneider, E. Rosenfeldt, and J. Scheller, *IL-6/IL-12 cytokine receptor shuffling of extra-and intracellular domains reveals canonical STAT activation via synthetic IL-35 and IL-39 signaling*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 15172.
42. Caveney, N.A., C.R. Glassman, K.M. Jude, N. Tsutsumi, and K.C. Garcia, *Structure of the IL-27 quaternary receptor signaling complex*. Elife, 2022. **11**: p. e78463.
43. Floss, D.M., T. Klöcker, J. Schröder, L. Lamertz, S. Mrotzek, B. Strobl, H. Hermanns, and J. Scheller, *Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases*. Molecular Biology of the Cell, 2016. **27**(14): p. 2301-16.
44. Neurath, M.F., *Strategies for targeting cytokines in inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2024.
45. Elhag, D.A., M. Kumar, M. Saadaoui, A.K. Akobeng, F. Al-Mudahka, M. Elawad, and S. Al Khodor, *Inflammatory Bowel Disease Treatments and Predictive Biomarkers of Therapeutic Response*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(13).
46. Kishimoto, T., S. Akira, and T. Taga, *Interleukin-6 and Its Receptor: A Paradigm for Cytokines*. Science, 1992. **258**(5082): p. 593-597.
47. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018. **10**(2).
48. Giraldez, M.D., D. Carneros, C. Garbers, S. Rose-John, and M. Bustos, *New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2021. **18**(11): p. 787-803.
49. Hu, X., J. li, M. Fu, X. Zhao, and W. Wang, *The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021. **6**(1): p. 402.
50. Rose-John, S., B.J. Jenkins, C. Garbers, J.M. Moll, and J. Scheller, *Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects*. Nature Reviews Immunology, 2023. **23**(10): p. 666-681.

51. Murakami, M., D. Kamimura, and T. Hirano, *Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 812-831.
52. Garbers, C. and J. Lokau, *Cytokines of the interleukin-6 family as emerging targets in inflammatory bowel disease*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2024. **28**(1-2): p. 57-65.
53. McFarland-Mancini, M.M., H.M. Funk, A.M. Paluch, M. Zhou, P.V. Giridhar, C.A. Mercer, S.C. Kozma, and A.F. Drew, *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor*. The Journal of Immunology, 2010. **184**(12): p. 7219-28.
54. Schmidt-Arras, D., E. Galun, and S. Rose-John, *The two facets of gp130 signalling in liver tumorigenesis*. Seminars in Immunopathology, 2021. **43**(4): p. 609-624.
55. Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Köhler, *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-342.
56. Calabrese, L.H. and S. Rose-John, *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease*. Nature Reviews Rheumatology, 2014. **10**(12): p. 720-727.
57. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy*. Journal of Hepatology, 2016. **64**(6): p. 1403-15.
58. Fontes, J.A., N.R. Rose, and D. Čiháková, *The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 62-8.
59. Metcalfe, R.D., T.L. Putoczki, and M.D. Griffin, *Structural understanding of interleukin 6 family cytokine signaling and targeted therapies: focus on interleukin 11*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**: p. 540177.
60. Jones, S.A. and B.J. Jenkins, *Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer*. Nature Reviews Immunology, 2018. **18**(12): p. 773-789.
61. Heink, S., N. Yogev, C. Garbers, M. Herwerth, L. Aly, C. Gasperi, V. Husterer, A.L. Croxford, K. Möller-Hackbarth, and H.S. Bartsch, *Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells*. Nature immunology, 2017. **18**(1): p. 74-85.
62. Böttcher, J.P., O. Schanz, C. Garbers, A. Zaremba, S. Hegenbarth, C. Kurts, M. Beyer, J.L. Schultze, W. Kastenmüller, and S. Rose-John, *IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8⁺ T cell function*. Cell reports, 2014. **8**(5): p. 1318-1327.
63. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
64. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga, and T. Kishimoto, *IL-6-Induced Homodimerization of gp130 and Associated Activation of a Tyrosine Kinase*. Science, 1993. **260**(5115): p. 1808-1810.
65. Fagerberg, L., B.M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, ..., M. Uhlén, *Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(2): p. 397-406.
66. Dams-Kozłowska, H., K. Gryśka, E. Kwiatkowska-Borowczyk, D. Izycki, S. Rose-John, and A. Mackiewicz, *A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine*. BMC Biotechnology, 2012. **12**: p. 1-11.
67. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.-J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger, and S. Rose-John, *A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nature Biotechnology, 1997. **15**(2): p. 142-145.

68. Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John, *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration*. Trends in Immunology, 2011. **32**(8): p. 380-7.
69. Jones, J.C., S. Rustagi, and P.J. Dempsey, *ADAM Proteases and Gastrointestinal Function*. Annual Review of Physiology, 2016. **78**: p. 243-76.
70. Heib, M., S. Rose-John, and D. Adam, *Chapter Three - Necroptosis, ADAM proteases and intestinal (dys)function*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, J.K.E. Spetz and L. Galluzzi, Editors. 2020, Academic Press. p. 83-152.
71. Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, ..., M.F. Neurath, *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nature Medicine, 2000. **6**(5): p. 583-8.
72. Blaydon, D.C., P. Biancheri, W.L. Di, V. Plagnol, R.M. Cabral, M.A. Brooke, D.A. van Heel, F. Ruschendorf, M. Toynbee, A. Walne, E.A. O'Toole, J.E. Martin, K. Lindley, T. Vulliamy, D.J. Abrams, T.T. MacDonald, J.I. Harper, and D.P. Kelsell, *Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion*. The New England Journal of Medicine, 2011. **365**(16): p. 1502-8.
73. Allinson, T.M., E.T. Parkin, A.J. Turner, and N.M. Hooper, *ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases*. Journal of Neuroscience Research, 2003. **74**(3): p. 342-52.
74. Lokau, J., M. Agthe, and C. Garbers, *Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation*. Mediators of Inflammation, 2016. **2016**: p. 1785021.
75. Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto, *Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection*. Journal of Immunology 1992. **148**(7): p. 2175-2180.
76. Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama, and K. Tanikawa, *Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6*. Gut, 1995. **36**(1): p. 45-9.
77. Diaz-Torne, C., M.D.A. Ortiz, P. Moya, M.V. Hernandez, D. Reina, I. Castellvi, J.J. De Agustin, D. Fuente, H. Corominas, R. Sanmarti, C. Zamora, E. Cantó, and S. Vidal, *The combination of IL-6 and its soluble receptor is associated with the response of rheumatoid arthritis patients to tocilizumab*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2018. **47**(6): p. 757-764.
78. Scambia, G., U. Testa, P.B. Panici, R. Martucci, E. Foti, M. Petrini, M. Amoroso, V. Masciullo, C. Peschle, and S. Mancuso, *Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors*. International Journal of Cancer, 1994. **57**(3): p. 318-323.
79. Leisman, D.E., L. Ronner, R. Pinotti, M.D. Taylor, P. Sinha, C.S. Calfee, A.V. Hirayama, F. Mastroiani, C.J. Turtle, M.O. Harhay, M. Legrand, and C.S. Deutschman, *Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes*. The Lancet Respiratory Medicine, 2020. **8**(12): p. 1233-1244.
80. Gustot, T., A. Lemmers, E. Louis, C. Nicaise, E. Quertinmont, J. Belaiche, S. Roland, A. Van Gossum, J. Devière, and D. Franchimont, *Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(4): p. 488-95.
81. Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G.D. Yancopoulos, T. Taga, and T. Kishimoto, *Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1120-6.

82. Diamant, M., K. Rieneck, N. Mechti, X.G. Zhang, M. Svenson, K. Bendtzen, and B. Klein, *Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130*. FEBS Lett, 1997. **412**(2): p. 379-84.
83. Müller, S.A., M.D. Shmueli, X. Feng, J. Tüshaus, N. Schumacher, R. Clark, B.E. Smith, A. Chi, S. Rose-John, M.E. Kennedy, and S.F. Lichtenthaler, *The Alzheimer's disease-linked protease BACE1 modulates neuronal IL-6 signaling through shedding of the receptor gp130*. Molecular Neurodegeneration, 2023. **18**(1): p. 13.
84. Rodríguez-Hernández, M.Á., D. Carneros, M. Núñez-Núñez, R. Coca, R. Baena, G.M. López-Ruiz, M.E. Cano-Serrano, A. Martínez-Tellería, A. Fuentes-López, J.M. Praena-Fernandez, C. Garbers, J. Hernández-Quero, F. García, S. Rose-John, and M. Bustos, *Identification of IL-6 Signalling Components as Predictors of Severity and Outcome in COVID-19*. Frontiers in Immunology, 2022. **13**.
85. Ferreira, R.C., D.F. Freitag, A.J. Cutler, J.M. Howson, D.B. Rainbow, D.J. Smyth, S. Kaptoge, P. Clarke, C. Boreham, R.M. Coulson, M.L. Pekalski, W.M. Chen, S. Onengut-Gumuscu, S.S. Rich, A.S. Butterworth, A. Malarstig, J. Danesh, and J.A. Todd, *Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases*. PLOS Genetics, 2013. **9**(4): p. e1003444.
86. Aparicio-Siegmund, S., Y. Garbers, C.M. Flynn, G.H. Waetzig, I. Gouni-Berthold, W. Krone, H.K. Berthold, M. Laudes, S. Rose-John, and C. Garbers, *The IL-6-neutralizing sIL-6R-sgp130 buffer system is disturbed in patients with type 2 diabetes*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2019.
87. Ziegler, L., A. Gajulapuri, P. Frumento, A. Bonomi, H. Wallén, U. de Faire, S. Rose-John, and B. Gigante, *Interleukin 6 trans-signalling and risk of future cardiovascular events*. Cardiovascular Research, 2019. **115**(1): p. 213-221.
88. Schuett, H., R. Oestreich, G.H. Waetzig, W. Annema, M. Luchtefeld, A. Hillmer, U. Bavendiek, J. von Felden, D. Divchev, and T. Kempf, *Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012. **32**(2): p. 281-290.
89. Johnson, D.E., R.A. O'Keefe, and J.R. Grandis, *Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**(4): p. 234-248.
90. Singh, J.A., *Filgotinib, a JAK1 Inhibitor, for Treatment-Resistant Rheumatoid Arthritis*. Journal of the American Medical Association, 2019. **322**(4): p. 309-311.
91. Mestermann, K., T. Giavridis, J. Weber, J. Rydzek, S. Frenz, T. Nerreter, A. Mades, M. Sadelain, H. Einsele, and M. Hudecek, *The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells*. Science Translational Medicine, 2019. **11**(499): p. eaau5907.
92. Sandborn, W.J., L. Peyrin-Biroulet, A.I. Sharara, C. Su, I. Modesto, R. Mundayat, L.M. Gunay, L. Salese, and B.E. Sands, *Efficacy and Safety of Tofacitinib in Ulcerative Colitis Based on Prior Tumor Necrosis Factor Inhibitor Failure Status*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2022. **20**(3): p. 591-601.e8.
93. Dogra, S., S. Shah, A. Sharma, S. Chhabra, and T. Narang, *Emerging Role of Baricitinib in Dermatology Practice: All We Need to Know!* Indian Dermatology Online Journal, 2023. **14**(2): p. 153-162.
94. Albuquerque, A.M., I. Eckert, L. Tramujas, G. Butler-Laporte, E.G. McDonald, J.M. Brophy, and T.C. Lee, *Effect of tocilizumab, sarilumab, and baricitinib on mortality among patients hospitalized for COVID-19 treated with corticosteroids: a systematic review and meta-analysis*. Clinical Microbiology and Infection, 2023. **29**(1): p. 13-21.
95. McConnell, M.J., N. Kawaguchi, R. Kondo, A. Sonzogni, L. Licini, C. Valle, P.A. Bonaffini, S. Sironi, M.G. Alessio, and G. Previtali, *Liver injury in COVID-19 and IL-*

- 6 *trans-signaling-induced endotheliopathy*. *Journal of Hepatology*, 2021. **75**(3): p. 647-658.
96. Choy, E.H., F. De Benedetti, T. Takeuchi, M. Hashizume, M.R. John, and T. Kishimoto, *Translating IL-6 biology into effective treatments*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020. **16**(6): p. 335-345.
 97. Elmariah, S.B., J.S. Smith, and J.F. Merola, *JAK in the [Black] Box: A Dermatology Perspective on Systemic JAK Inhibitor Safety*. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2022. **23**(4): p. 427-431.
 98. van Rhee, F., R.S. Wong, N. Munshi, J.F. Rossi, X.Y. Ke, A. Fosså, D. Simpson, M. Capra, ..., C. Casper, *Siltuximab for multicentric Castleman's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *The Lancet Oncology*, 2014. **15**(9): p. 966-74.
 99. Weinblatt, M.E., P. Mease, E. Mysler, T. Takeuchi, E. Drescher, A. Berman, J. Xing, M. Zilberstein, S. Banerjee, and P. Emery, *The efficacy and safety of subcutaneous clazakizumab in patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results from a multinational, phase IIb, randomized, double-blind, placebo/active-controlled, dose-ranging study*. *Arthritis & Rheumatology*, 2015. **67**(10): p. 2591-600.
 100. Mease, P.J., A.B. Gottlieb, A. Berman, E. Drescher, J. Xing, R. Wong, and S. Banerjee, *The Efficacy and Safety of Clazakizumab, an Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody, in a Phase IIb Study of Adults With Active Psoriatic Arthritis*. *Arthritis & Rheumatology*, 2016. **68**(9): p. 2163-73.
 101. Nickerson, P.W., G.A. Böhmig, S. Chadban, D. Kumar, R.B. Mannon, T. van Gelder, J.C. Lee, S. Adler, E. Chong, and A. Djamali, *Clazakizumab for the treatment of chronic active antibody-mediated rejection (AMR) in kidney transplant recipients: Phase 3 IMAGINE study rationale and design*. *Trials*, 2022. **23**(1): p. 1042.
 102. Smolen, J.S., E. Feist, S. Fatenejad, S.A. Grishin, E.V. Korneva, E.L. Nasonov, M.Y. Samsonov, and R.M. Fleischmann, *Olokizumab versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis*. *The New England Journal of Medicine*, 2022. **387**(8): p. 715-726.
 103. Ghosn, L., A. Chaimani, T. Evrenoglou, M. Davidson, C. Graña, C. Schmucker, C. Bollig, N. Henschke, ..., I. Boutron, *Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review*. *Cochrane Reviews*, 2021. **3**(3): p. Cd013881.
 104. Klein, B., Z.Y. Lu, J.P. Gaillard, J.L. Harousseau, and R. Bataille, *Inhibiting IL-6 in human multiple myeloma*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1992. **182**: p. 237-44.
 105. Lu, Z.Y., H. Brailly, J.F. Rossi, J. Wijdenes, R. Bataille, and B. Klein, *Overall interleukin-6 production exceeds 7 mg/day in multiple myeloma complicated by sepsis*. *Cytokine*, 1993. **5**(6): p. 578-82.
 106. Garbers, C., S. Heink, T. Korn, and S. Rose-John, *Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018. **17**(6): p. 395-412.
 107. Mateos, M.V., N.J. Bahlis, A. Spencer, R. Kaedbey, P. Rodríguez-Otero, S. Harrison, C. Wong, G. Goodman, R. Nakamura, V. Choeurng, J. Cooper, and S. Trudel, *Tocilizumab Pre-Treatment Significantly Reduces the Incidence of Cytokine Release Syndrome in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (Rrmm) Who Receive Cevostamab*. *Hemasphere*, 2023
 108. Rafique, A., J. Martin, M. Blome, T. Huang, A. Ouyang, and N. Papadopoulos, *Evaluation of the binding kinetics and functional bioassay activity of sarilumab and tocilizumab to the human il-6 receptor (il-6r) alpha*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2013. **72**(Suppl 3): p. A797-A797.

109. Raimondo, M.G., M. Biggioggero, C. Crotti, A. Becciolini, and E.G. Favalli, *Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis*. Drug Design, Development and Therapy, 2017. **11**: p. 1593-1603.
110. Harada, H., M. Kondo, A. Maeyama, T. Fukuda, S. Ikemura, E. Shono, T. Tsuru, Y. Inoue, S. Yoshizawa, H. Niuro, and Y. Nakashima, *Effectiveness and safety of sarilumab in patients with rheumatoid arthritis: A multicenter, retrospective, inverse probability of treatment-weighted analysis based on the FRAB-registry*. Clinical Rheumatology, 2024.
111. Morel, J., A. Constantin, G. Baron, E. Dernis, R.M. Flipo, S. Rist, B. Combe, J.E. Gottenberg, T. Schaefferbeke, and M. Soubrier, *Risk factors of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in the French Registry REGATE*. Rheumatology, 2017. **56**(10): p. 1746-1754.
112. Genovese, M.C., A. Rubbert-Roth, J.S. Smolen, J. Kremer, M. Khraishi, J. Gómez-Reino, A. Sebba, R. Pilson, S. Williams, and R. Van Vollenhoven, *Longterm safety and efficacy of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: a cumulative analysis of up to 4.6 years of exposure*. The Journal of Rheumatology, 2013. **40**(6): p. 768-780.
113. Ito, H., M. Takazoe, Y. Fukuda, T. Hibi, K. Kusugami, A. Andoh, T. Matsumoto, T. Yamamura, J. Azuma, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Shimoyama, and T. Kishimoto, *A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 989-996; discussion 947.
114. Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G.Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, and M. Karin, *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 103-13.
115. Kuhn, K.A., N.A. Manieri, T.C. Liu, and T.S. Stappenbeck, *IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114195.
116. Monemi, S., E. Berber, K. Sarsour, J. Wang, K. Lampl, K. Bharucha, and A. Pethoe-Schramm, *Incidence of Gastrointestinal Perforations in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Tocilizumab from Clinical Trial, Postmarketing, and Real-World Data Sources*. Rheumatology Therapy, 2016. **3**(2): p. 337-352.
117. Flaig, T., A. Douros, E. Bronder, A. Klimpel, R. Kreutz, and E. Garbe, *Tocilizumab-induced pancreatitis: case report and review of data from the FDA Adverse Event Reporting System*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2016. **41**(6): p. 718-721.
118. Jostock, T., J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M.F. Neurath, and S. Rose-John, *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(1): p. 160-7.
119. Hoge, J., I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O.M. Steinmetz, D.R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John, and H.W. Mittrücker, *IL-6 controls the innate immune response against Listeria monocytogenes via classical IL-6 signaling*. Journal of Immunology, 2013. **190**(2): p. 703-11.
120. Sodenkamp, J., G.H. Waetzig, J. Scheller, D. Seegert, J. Grötzinger, S. Rose-John, S. Ehlers, and C. Hölscher, *Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis*. Immunobiology, 2012. **217**(10): p. 996-1004.
121. Matthews, V.B., T.L. Allen, S. Risis, M.H. Chan, D.C. Henstridge, N. Watson, L.A. Zaffino, J.R. Babb, J. Boon, P.J. Meikle, J.B. Jowett, M.J. Watt, J.O. Jansson, C.R. Bruce, and M.A. Febbraio, *Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance*. Diabetologia, 2010. **53**(11): p. 2431-41.

122. Kraakman, M.J., T.L. Allen, M. Whitham, P. Iliades, H.L. Kammoun, E. Estevez, G.I. Lancaster, and M.A. Febbraio, *Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2013. **15 Suppl 3**: p. 170-5.
123. Mitsuyama, K., S. Matsumoto, S. Rose-John, A. Suzuki, T. Hara, N. Tomiyasu, K. Handa, O. Tsuruta, H. Funabashi, J. Scheller, A. Toyonaga, and M. Sata, *STAT3 activation via interleukin 6 trans-signalling contributes to ileitis in SAMPI/Yit mice*. Gut, 2006. **55**(9): p. 1263-9.
124. Zhang, H., P. Neuhöfer, L. Song, B. Rabe, M. Lesina, M.U. Kurkowski, M. Treiber, T. Wartmann, S. Regnér, H. Thorlacius, D. Saur, G. Weirich, A. Yoshimura, W. Halangk, J.P. Mizgerd, R.M. Schmid, S. Rose-John, and H. Algül, *IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality*. Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(3): p. 1019-31.
125. George, M.J., N.H. Jasmin, V.T. Cummings, A. Richard-Loendt, F. Launchbury, K. Woollard, T. Turner-Stokes, A.I. Garcia Diaz, M. Lythgoe, D.J. Stuckey, A.D. Hingorani, and D.W. Gilroy, *Selective Interleukin-6 Trans-Signaling Blockade Is More Effective Than Panantagonism in Reperfused Myocardial Infarction*. Basic to Translational Science, 2021. **6**(5): p. 431-443.
126. Reeh, H., N. Rudolph, U. Billing, H. Christen, S. Streif, E. Bullinger, M. Schliemann-Bullinger, R. Findeisen, F. Schaper, H.J. Huber, and A. Dittrich, *Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling*. Cell Communication and Signaling, 2019. **17**(1): p. 46.
127. Richards, P.J., M.A. Nowell, S. Horiuchi, R.M. McLoughlin, C.A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, and A.S. Williams, *Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis*. Arthritis & Rheumatology, 2006. **54**(5): p. 1662-1672.
128. Brooks, G.D., L. McLeod, S. Alhayyani, A. Miller, P.A. Russell, W. Ferlin, S. Rose-John, S. Ruwanpura, and B.J. Jenkins, *IL6 Trans-signaling Promotes KRAS-Driven Lung Carcinogenesis*. Cancer Research, 2016. **76**(4): p. 866-76.
129. Kraakman, M.J., H.L. Kammoun, T.L. Allen, V. Deswaerte, D.C. Henstridge, E. Estevez, V.B. Matthews, B. Neill, ..., M.A. Febbraio, *Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance*. Cell Metabolism, 2015. **21**(3): p. 403-16.
130. Luig, M., M.A. Kluger, B. Goerke, M. Meyer, A. Nosko, I. Yan, J. Scheller, H.W. Mittrücker, S. Rose-John, R.A. Stahl, U. Panzer, and O.M. Steinmetz, *Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN*. Journal of the American Society of Nephrology, 2015. **26**(7): p. 1597-607.
131. Becker, C., M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John, and M.F. Neurath, *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 491-501.
132. Schreiber, S., K. Aden, J.P. Bernardes, C. Conrad, F. Tran, H. Höper, V. Volk, N. Mishra, ..., P. Rosenstiel, *Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterology, 2021. **160**(7): p. 2354-2366.e11.
133. Hanioka, Y., K. Shimizu, K. Yamagami, S. Yao, R. Nakamura, T. Nakamura, and H. Goto, *Exacerbation of Ulcerative Colitis with Tocilizumab: A Report of Two Cases, One with Takayasu Arteritis and the Other with Relapsing Polychondritis*. Internal Medicine, 2021. **60**(10): p. 1615-1620.

134. Danese, S., S. Vermeire, P. Hellstern, R. Panaccione, G. Rogler, G. Fraser, A. Kohn, P. Desreumaux, R.W. Leong, G.M. Comer, F. Cataldi, A. Banerjee, M.K. Maguire, C. Li, N. Rath, J. Beebe, and S. Schreiber, *Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II)*. Gut, 2019. **68**(1): p. 40-48.
135. Zhang, S., B. Chen, B. Wang, H. Chen, Y. Li, Q. Cao, J. Zhong, M.J. Shieh, ..., M. Chen, *Effect of Induction Therapy With Olamkicept vs Placebo on Clinical Response in Patients With Active Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial*. Journal of American Medical Association, 2023. **329**(9): p. 725-734.
136. Li, Z., B.-F. Krippendorff, S. Sharma, A.C. Walz, T. Lavé, and D.K. Shah, *Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments*. Monoclonal Antibodies, 2016. **8**(1): p. 113-119.
137. Sommer, J., C. Garbers, J. Wolf, A. Trad, J.M. Moll, M. Sack, R. Fischer, J. Grötzinger, G.H. Waetzig, D.M. Floss, and J. Scheller, *Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor sgp130-E10*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(32): p. 22140-50.
138. Heise, D., A. Derrac Soria, S. Hansen, C. Dambietz, M. Akbarzadeh, A.F. Berg, G.H. Waetzig, S.A. Jones, R. Dvorsky, M.R. Ahmadian, J. Scheller, and J.M. Moll, *Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion*. Science Signaling, 2021. **14**(696): p. eabc3480.
139. Scheller, J., B. Schuster, C. Hölscher, T. Yoshimoto, and S. Rose-John, *No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **326**(4): p. 724-728.
140. Fung, K.Y., C. Louis, R.D. Metcalfe, C.C. Kosasih, I.P. Wicks, M.D.W. Griffin, and T.L. Putoczki, *Emerging roles for IL-11 in inflammatory diseases*. Cytokine, 2022. **149**: p. 155750.
141. Schwerd, T., F. Krause, S.R. Twigg, D. Aschenbrenner, Y.-H. Chen, U. Borgmeyer, M. Müller, S. Manrique, N. Schumacher, and S.A. Wall, *A variant in IL6ST with a selective IL-11 signaling defect in human and mouse*. Bone Research, 2020. **8**(1): p. 24.
142. Putoczki, T.L., S. Thiem, A. Loving, R.A. Busuttil, N.J. Wilson, P.K. Ziegler, P.M. Nguyen, A. Preaudet, R. Farid, and K.M. Edwards, *Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically*. Cancer Cell, 2013. **24**(2): p. 257-271.
143. Rebouissou, S., M. Amessou, G. Couchy, K. Poussin, S. Imbeaud, C. Pilati, T. Izard, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, and J. Zucman-Rossi, *Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours*. Nature, 2009. **457**(7226): p. 200-204.
144. Cook, S.A. and S. Schafer, *Hiding in plain sight: interleukin-11 emerges as a master regulator of fibrosis, tissue integrity, and stromal inflammation*. Annual Review of Medicine, 2020. **71**: p. 263-276.
145. Hanavadi, S., T.A. Martin, G. Watkins, R.E. Mansel, and W.G. Jiang, *Expression of interleukin 11 and its receptor and their prognostic value in human breast cancer*. Annals of Surgical Oncology, 2006. **13**: p. 802-808.
146. Johnstone, C.N., A. Chand, T.L. Putoczki, and M. Ernst, *Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 489-498.
147. Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Möller-Hackbarth, G.H. Waetzig, J. Grötzinger, G. Müller-Newen, S.

- Rose-John, J. Scheller, and C. Garbers, *Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling*. Cell Reports, 2016. **14**(7): p. 1761-1773.
148. Lokau, J., B. Kespohl, S. Kirschke, and C. Garbers, *The role of proteolysis in interleukin-11 signaling*. Biochimica et Biophysica Acta, 2022. **1869**(1): p. 119135.
149. Berg, A.F., J. Ettich, H.T. Weitz, M. Krusche, D.M. Floss, J. Scheller, and J.M. Moll, *Exclusive inhibition of IL-6 trans-signaling by soluble gp130(FlyR)Fc*. Cytokine X, 2021. **3**(4): p. 100058.
150. Tenhumberg, S., G.H. Waetzig, A. Chalaris, B. Rabe, D. Seegert, J. Scheller, S. Rose-John, and J. Grötzinger, *Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(40): p. 27200-7.
151. Lokau, J., Y. Garbers, J. Grötzinger, and C. Garbers, *A single aromatic residue in sgp130Fc/olamkicept allows the discrimination between interleukin-6 and interleukin-11 trans-signaling*. iScience, 2021. **24**(11): p. 103309.
152. Adams, R., R.J. Burnley, C.R. Valenzano, O. Qureshi, C. Doyle, S. Lumb, M. del Carmen Lopez, R. Griffin, ..., A. Ettorre, *Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 37716.
153. Boulanger, M.J., D.-c. Chow, E.E. Brevnova, and K.C. Garcia, *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2101-2104.
154. Tanaka, M., M. Kishimura, S. Ozaki, F. Osakada, H. Hashimoto, M. Okubo, M. Murakami, and K. Nakao, *Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(1): p. 137-144.
155. Ettich, J., J. Werner, H.T. Weitz, E. Mueller, R. Schwarzer, P.A. Lang, J. Scheller, and J.M. Moll, *A hybrid soluble gp130/spike-nanobody fusion protein simultaneously blocks interleukin-6 trans-signaling and cellular infection with SARS-CoV-2*. Journal of Virology, 2022. **96**(4): p. e01622-21.
156. Gesiorowski, A., J. Ettich, J. Werner, C. Wittich, S. Pieper, G. Padrini, K. Behnke, D.M. Floss, P.A. Lang, and J.M. Moll, *Bispecific soluble cytokine receptor-nanobody fusions inhibit Interleukin (IL-) 6 trans-signaling and IL-12/23 or tumor necrosis factor (TNF) signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2023. **299**(11).
157. Wrapp, D., D. De Vlieger, K.S. Corbett, G.M. Torres, N. Wang, W. Van Breedam, K. Roose, L. van Schie, M. Hoffmann, S. Pöhlmann, B.S. Graham, N. Callewaert, B. Schepens, X. Saelens, and J.S. McLellan, *Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1004-1015.e15.
158. Coppieters, K., T. Dreier, K. Silence, H.D. Haard, M. Lauwereys, P. Casteels, E. Beirnaert, H. Jonckheere, C.V.D. Wiele, and L. Staelens, *Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(6): p. 1856-1866.
159. Desmyter, A., S. Spinelli, C. Boutton, H. de Haard, G. Denecker, C. Cambillau, and H. Rommelaere, *Neutralization of human interleukin 23 by multivalent nanobodies explained by the structure of cytokine-nanobody complex*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**: p. 277457.
160. Gorbalenya, A.E., S.C. Baker, R.S. Baric, R.J. de Groot, C. Drosten, A.A. Gulyaeva, B.L. Haagmans, C. Lauber, A.M. Leontovich, B.W. Neuman, D. Penzar, S. Perlman, L.L.M. Poon, D.V. Samborskiy, I.A. Sidorov, I. Sola, J. Ziebuhr, and V. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, *The*

- species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2*. Nature Microbiology, 2020. **5**(4): p. 536-544.
161. Wang Ning, W.N., L.S. Li ShiYue, Y.X. Yang XingLou, H.H. Huang HuiMin, Z.Y. Zhang YuJi, G.H. Guo Hua, L.C. Luo ChuMing, M. Miller, Z.G. Zhu GuangJian, and A. Chmura, *Serological evidence of bat SARS-related Coronavirus infection in humans, China*. Virologica Sinica 2018. **33**(1): **104–107**.
 162. Li, M.-Y., L. Li, Y. Zhang, and X.-S. Wang, *Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues*. Infectious Diseases of Poverty, 2020. **9**(02): p. 23-29.
 163. Santos, J.N.V., V.A. Mendonça, A.C. Fernandes, L.B. Maia, N. Henschke, M.B. de Souza, V.K. da Silva Lage, M.X. Oliveira, A. de Fátima Silva, A.C. Rodrigues Lacerda, A. Sartorio, A. Rapin, V.C. de Oliveira, and R. Taiar, *Recent Advance Analysis of Recovery in Hospitalized People with COVID-19: A Systematic Review*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022. **19**(21).
 164. England, J.T., A. Abdulla, C.M. Biggs, A.Y. Lee, K.A. Hay, R.L. Hoiland, C.L. Wellington, M. Sekhon, S. Jamal, and K. Shojania, *Weathering the COVID-19 storm: lessons from hematologic cytokine syndromes*. Blood Reviews, 2021. **45**: p. 100707.
 165. Yang, L., X. Xie, Z. Tu, J. Fu, D. Xu, and Y. Zhou, *The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021. **6**(1): p. 255.
 166. Shang, J., G. Ye, K. Shi, Y. Wan, C. Luo, H. Aihara, Q. Geng, A. Auerbach, and F. Li, *Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2*. Nature, 2020. **581**(7807): p. 221-224.
 167. Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, and H. Leong-Poi, *Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 112-116.
 168. Hirano, T. and M. Murakami, *COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome*. Immunity, 2020. **52**(5): p. 731-733.
 169. Forrester, S.J., G.W. Booz, C.D. Sigmund, T.M. Coffman, T. Kawai, V. Rizzo, R. Scalia, and S. Eguchi, *Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology*. Physiological Reviews, 2018. **98**(3): p. 1627-1738.
 170. Patra, T., K. Meyer, L. Geerling, T.S. Isbell, D.F. Hoft, J. Brien, A.K. Pinto, R.B. Ray, and R. Ray, *SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells*. PLoS Pathogens, 2020. **16**(12): p. e1009128.
 171. Kuba, K., Y. Imai, S. Rao, H. Gao, F. Guo, B. Guan, Y. Huan, P. Yang, Y. Zhang, and W. Deng, *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury*. Nature Medicine, 2005. **11**(8): p. 875-879.
 172. De Wit, E., N. Van Doremalen, D. Falzarano, and V.J. Munster, *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. Nature Reviews Microbiology, 2016. **14**(8): p. 523-534.
 173. Luo, X.H., Y. Zhu, J. Mao, and R.C. Du, *T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19*. Scandinavian Journal of Immunology, 2021. **93**(3): p. e12989.
 174. Zhou, X., G. Ye, Y. Lv, Y. Guo, X. Pan, Y. Li, G. Shen, Y. He, and P. Lei, *IL-6 drives T cell death to participate in lymphopenia in COVID-19*. International Immunopharmacology, 2022. **111**: p. 109132.
 175. Diao, B., C. Wang, Y. Tan, X. Chen, Y. Liu, L. Ning, L. Chen, M. Li, Y. Liu, and G. Wang, *Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. Frontiers in Immunology, 2020. **11** - 2020.
 176. Ferrigno, I., L. Verzellesi, M. Ottone, M. Bonacini, A. Rossi, G. Besutti, E. Bonelli, R. Colla, ..., S. Croci, *CCL18, CHI3L1, ANG2, IL-6 systemic levels are associated with*

- the extent of lung damage and radiomic features in SARS-CoV-2 infection.* Inflammation Research, 2024.
177. Huang, Q., Y. Le, S. Li, and Y. Bian, *Signaling pathways and potential therapeutic targets in acute respiratory distress syndrome (ARDS).* Respiratory Research, 2024. **25**(1): p. 30.
 178. Chen, L.Y.C. and T.T.T. Quach, *COVID-19 cytokine storm syndrome: a threshold concept.* Lancet Microbe, 2021. **2**(2): p. e49-e50.
 179. Horby, P., W.S. Lim, J.R. Emberson, M. Mafham, J.L. Bell, L. Linsell, N. Staplin, C. Brightling, ..., M.J. Landray, *Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19.* The New England Journal of Medicine, 2021. **384**(8): p. 693-704.
 180. McAuley, D. and R.-C.W. Committee, *Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19.* New England Journal of Medicine, 2021.
 181. Horby, P.W., G. Pessoa-Amorim, L. Peto, C.E. Brightling, R. Sarkar, K. Thomas, V. Jeebun, A. Ashish, R. Tully, and D. Chadwick, *Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): preliminary results of a randomised, controlled, open-label, platform trial.* The Lancet, 2021. **397**(10285): p. 16371645.
 182. Guaraldi, G., M. Meschiari, A. Cozzi-Lepri, J. Milic, R. Tonelli, M. Menozzi, E. Franceschini, G. Cuomo, G. Orlando, and V. Borghi, *Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study.* The Lancet Rheumatology, 2020. **2**(8): p. e474-e484.
 183. Rosas, I.O., N. Brău, M. Waters, R.C. Go, A. Malhotra, B.D. Hunter, S. Bhagani, D. Skiest, S. Savic, and I.S. Douglas, *Tocilizumab in patients hospitalised with COVID-19 pneumonia: Efficacy, safety, viral clearance, and antibody response from a randomised controlled trial (COVACTA).* EClinicalMedicine, 2022. **47**.
 184. Neumann, A.U., M. Goekkaya, K. Dorgham, C. Traidl-Hoffmann, and G. Gorochoy, *Tocilizumab in COVID-19 therapy: who benefits, and how?* The Lancet, 2021. **398**(10297): p. 299-300.
 185. Teng, F., T. Cui, L. Zhou, Q. Gao, Q. Zhou, and W. Li, *Programmable synthetic receptors: the next-generation of cell and gene therapies.* Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024. **9**(1): p. 7.
 186. Manhas, J., H.I. Edelstein, J.N. Leonard, and L. Morsut, *The evolution of synthetic receptor systems.* Nature Chemical Biology, 2022. **18**(3): p. 244-255.
 187. Hong, M., J.D. Clubb, and Y.Y. Chen, *Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy.* Cancer Cell, 2020. **38**(4): p. 473-488.
 188. Xiang, Y., N. Dalchau, and B. Wang, *Scaling up genetic circuit design for cellular computing: advances and prospects.* Natural Computing, 2018. **17**(4): p. 833-853.
 189. Jan, M., I. Scarfò, R.C. Larson, A. Walker, A. Schmidts, A.A. Guirguis, J.A. Gasser, M. Słabicki, A.A. Bouffard, and A.P. Castano, *Reversible ON-and OFF-switch chimeric antigen receptors controlled by lenalidomide.* Science Translational Medicine, 2021. **13**(575).
 190. Mossner, S., H.T. Phan, S. Triller, J.M. Moll, U. Conrad, and J. Scheller, *Multimerization strategies for efficient production and purification of highly active synthetic cytokine receptor ligands.* PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0230804.
 191. Roybal, K.T., J.Z. Williams, L. Morsut, L.J. Rupp, I. Kolinko, J.H. Choe, W.J. Walker, K.A. McNally, and W.A. Lim, *Engineering T cells with customized therapeutic response programs using synthetic notch receptors.* Cell, 2016. **167**(2): p. 419-432. e16.
 192. Fridy, P.C., Y. Li, S. Keegan, M.K. Thompson, I. Nudelman, J.F. Scheid, M. Oeffinger, M.C. Nussenzweig, D. Fenyö, B.T. Chait, and M.P. Rout, *A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires.* Nature Methods, 2014. **11**(12): p. 1253-1260.

193. Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M. Floß, P.A. Lang, and J. Scheller, *Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 2034.
194. Mossner, S., M. Kuchner, N.F. Modares, B. Knebel, H. Al-Hasani, D.M. Floss, and J. Scheller, *Synthetic interleukin 22 (IL-22) signaling reveals biological activity of homodimeric IL-10 receptor 2 and functional cross-talk with the IL-6 receptor gp130*. Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(35): p. 12378-12397.
195. Mossner, S., D.M. Floss, and J. Scheller, *Pro-and anti-apoptotic fate decisions induced by di-and trimeric synthetic cytokine receptors*. Iscience, 2021. **24**(5).
196. Minafra, A.R., P. Rafii, S. Mossner, F. Bazgir, D.M. Floss, J.M. Moll, and J. Scheller, *Synthetic receptor platform to identify loss-of-function single nucleotide variants and designed mutants in the death receptor Fas/CD95*. Journal of Biological Chemistry, 2023. **299**(8).
197. Zoellner, N., N. Coesfeld, H.C. Xu, P.A. Lang, D.M. Floss, and J. Scheller, *Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling*. Frontiers in Microbiology, 2022. **13**: p. 947169.
198. Ettich, J., C. Wittich, J.M. Moll, K. Behnke, D.M. Floss, J. Reiners, A. Christmann, P.A. Lang, S.H. Smits, and H. Kolmar, *Respiratory syncytial virus–approved mAb Palivizumab as ligand for anti-idiotypic nanobody-based synthetic cytokine receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2023. **299**(11).
199. Baumgärtner, L.A.F., J. Ettich, H. Balles, D.J. Lapp, S. Mossner, C. Bassenge, M. Ouzin, H. Hanenberg, J. Scheller, and D.M. Floss, *Unpaired cysteine insertions favor transmembrane dimerization and induce ligand-independent constitutive cytokine receptor signaling*. Biological Chemistry, 2024.
200. Kim, J.Y.J., Z. Sang, Y. Xiang, Z. Shen, and Y. Shi, *Nanobodies: Robust miniprotein binders in biomedicine*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2023. **195**: p. 114726.
201. Khan, A.N., S. Asija, J. Pendhari, and R. Purwar, *CAR-T cell therapy in hematological malignancies: Where are we now and where are we heading for?* European Journal of Haematology, 2024. **112**(1): p. 6-18.
202. Stripecke, R., M. del Carmen Villacres, D. Skelton, N. Satake, S. Halene, and D. Kohn, *Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy*. Gene Therapy, 1999. **6**(7): p. 1305-1312.
203. Kua, K.P. and S.W.H. Lee, *Systematic review of the safety and efficacy of palivizumab among infants and young children with cystic fibrosis*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2017. **37**(6): p. 755-769.
204. Sorrentino, M. and T. Powers, *Effectiveness of palivizumab: evaluation of outcomes from the 1998 to 1999 respiratory syncytial virus season*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2000. **19**(11).
205. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nature Immunology, 2015. **16**(5): p. 448-457.
206. Boyce, E.G., E.L. Rogan, D. Vyas, N. Prasad, and Y. Mai, *Sarilumab: Review of a Second IL-6 Receptor Antagonist Indicated for the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. The Annals of Pharmacotherapy, 2018. **52**(8): p. 780-791.
207. Park, E.-J. and C.-W. Lee, *Soluble receptors in cancer: mechanisms, clinical significance, and therapeutic strategies*. Experimental & Molecular Medicine, 2024. **56**(1): p. 100-109.
208. Wolf, J., G.H. Waetzig, A. Chalaris, T.M. Reinheimer, H. Wege, S. Rose-John, and C. Garbers, *Different Soluble Forms of the Interleukin-6 Family Signal Transducer gp130 Fine-tune the Blockade of Interleukin-6 Trans-signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(31): p. 16186-96.

209. Zhang, J.G., Y. Zhang, C.M. Owczarek, L.D. Ward, R.L. Moritz, R.J. Simpson, K. Yasukawa, and N.A. Nicola, *Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(17): p. 10798-805.
210. Ishiwatari-Ogata, C., M. Kyuuma, H. Ogata, M. Yamakawa, K. Iwata, M. Ochi, M. Hori, N. Miyata, and Y. Fujii, *Ozoralizumab, a Humanized Anti-TNF α NANOBODY® Compound, Exhibits Efficacy Not Only at the Onset of Arthritis in a Human TNF Transgenic Mouse but Also During Secondary Failure of Administration of an Anti-TNF α IgG*. Frontiers in Immunology, 2022. **13**: p. 853008.
211. Georgy, J., Y. Arlt, J.M. Moll, M. Ouzin, H.T. Weitz, L. Gremer, D. Willbold, J. Grötzinger, F. Thives-Kurenbach, J. Scheller, and D.M. Floss, *Tryptophan (W) at position 37 of murine IL-12/IL-23 p40 is mandatory for binding to IL-12R β 1 and subsequent signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2021. **297**(5): p. 101295.
212. Balic, J.J., C. Garbers, S. Rose-John, L. Yu, and B.J. Jenkins, *Interleukin-11-driven gastric tumorigenesis is independent of trans-signalling*. Cytokine, 2017. **92**: p. 118-123.
213. Agthe, M., Y. Garbers, T. Putoczki, and C. Garbers, *Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice*. Placenta, 2017. **57**: p. 13-16.
214. Van Zaanen, H.C., H.M. Lokhorst, L.A. Aarden, H.J. Rensink, S.O. Warnaar, and M.H. Van Oers, *Blocking interleukin-6 activity with chimeric anti-IL6 monoclonal antibodies in multiple myeloma: effects on soluble IL6 receptor and soluble gp130*. Leukemia & Lymphoma, 1998. **31**(5-6): p. 551-8.
215. Metcalfe, R.D., E. Hanssen, K.Y. Fung, K. Aizel, C.C. Kosasih, C.O. Zlatić, L. Doughty, C.J. Morton, A.P. Leis, M.W. Parker, P.R. Gooley, T.L. Putoczki, and M.D.W. Griffin, *Structures of the interleukin 11 signalling complex reveal gp130 dynamics and the inhibitory mechanism of a cytokine variant*. Nature Communications, 2023. **14**(1): p. 7543.
216. Li, H. and J. Nicholas, *Identification of amino acid residues of gp130 signal transducer and gp80 alpha receptor subunit that are involved in ligand binding and signaling by human herpesvirus 8-encoded interleukin-6*. Journal of Virology, 2002. **76**(11): p. 5627-36.
217. Gardner, S., Y. Jin, P.K. Fyfe, T.B. Voisin, J.S. Bellón, E. Pohler, J. Piehler, I. Moraga, and D. Bubeck, *Structural insights into IL-11-mediated signalling and human IL6ST variant-associated immunodeficiency*. Nature Communications, 2024. **15**(1): p. 2071.
218. Mori, C., S. Nagatoishi, R. Matsunaga, D. Kuroda, M. Nakakido, and K. Tsumoto, *Biophysical insight into protein-protein interactions in the Interleukin-11/Interleukin-11Ra/glycoprotein 130 signaling complex*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023. **682**: p. 174-179.
219. Chen, B., S. Zhang, B. Wang, H. Chen, Y. Li, Q. Cao, J. Zhong, M. Xie, Z. Ran, T. Tang, M. Yang, T. Guo, B. Xu, Z. Cai, S. Schreiber, and M. Chen, *Efficacy and safety of the IL-6 trans-signalling inhibitor olamkicept: a phase 2 randomized, placebo-controlled trial in moderately to severely active Ulcerative Colitis*. Journal of Crohn's and Colitis, 2021. **15**(Supplement_1): p. S041-S042.
220. Rathore, A.S. and S. Narnaware, *Purification of Therapeutic Antibodies by Protein A Affinity Chromatography*. Methods in Molecular Biology, 2022. **2313**: p. 169-177.
221. Schett, G., D. Elewaut, I.B. McInnes, J.-M. Dayer, and M.F. Neurath, *How Cytokine Networks Fuel Inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy*. Nature Medicine, 2013. **19**(7): p. 822-824.

222. Gout, T., A.J. Ostör, and M.K. Nisar, *Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review*. Clinical Rheumatology, 2011. **30**(11): p. 1471-4.
223. Tanaka, Y., M. Kawanishi, M. Nakanishi, H. Yamasaki, and T. Takeuchi, *Efficacy and safety of anti-TNF multivalent NANOBODY® compound 'ozoralizumab' without methotrexate co-administration in patients with active rheumatoid arthritis: A 52-week result of phase III, randomised, open-label trial (NATSUZORA trial)*. Modern Rheumatology, 2023. **33**(5): p. 875-882.
224. Felten, R., P. Mertz, E. Sebbag, M. Scherlinger, and L. Arnaud, *Novel therapeutic strategies for autoimmune and inflammatory rheumatic diseases*. Drug Discovery Today, 2023. **28**(7): p. 103612.
225. Zhao, Q., *Bispecific Antibodies for Autoimmune and Inflammatory Diseases: Clinical Progress to Date*. BioDrugs, 2020. **34**(2): p. 111-119.
226. Danese, S., R. Panaccione, B.G. Feagan, A. Afzali, D.T. Rubin, B.E. Sands, W. Reinisch, J. Panés, ..., T. Ritter, *Efficacy and safety of 48 weeks of guselkumab for patients with Crohn's disease: maintenance results from the phase 2, randomised, double-blind GALAXI-1 trial*. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2024. **9**(2): p. 133-146.
227. D'Haens, G., M. Dubinsky, T. Kobayashi, P.M. Irving, S. Howaldt, J. Pokrotnieks, K. Krueger, J. Laskowski, X. Li, T. Lissos, J. Milata, N. Morris, V. Arora, C. Milch, W. Sandborn, and B.E. Sands, *Mirikizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis*. New England Journal of Medicine, 2023. **388**(26): p. 2444-2455.
228. Vermeire, S., M. Noman, G. Van Assche, F. Baert, G. D'Haens, and P. Rutgeerts, *Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(9): p. 1226-31.
229. Finzel, S., S. Kraus, C.P. Figueiredo, A. Regensburger, R. Kocijan, J. Rech, and G. Schett, *Comparison of the effects of tocilizumab monotherapy and adalimumab in combination with methotrexate on bone erosion repair in rheumatoid arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2019. **78**(9): p. 1186-1191.
230. Privitera, G., D. Pugliese, S. Onali, V. Petito, F. Scaldaferri, A. Gasbarrini, S. Danese, and A. Armuzzi, *Combination therapy in inflammatory bowel disease – from traditional immunosuppressors towards the new paradigm of dual targeted therapy*. Autoimmunity Reviews, 2021. **20**(6): p. 102832.
231. Kwapisz, L., L.E. Raffals, D.H. Bruining, D.S. Pardi, W.J. Tremaine, S.V. Kane, K.A. Papadakis, N. Coelho-Prabhu, J.B. Kiesel, V. Heron, W.A. Faubion, and E.V. Loftus, Jr., *Combination Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Experience From a Tertiary Care Center*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2021. **19**(3): p. 616-617.
232. Feng, Z., G. Kang, J. Wang, X. Gao, X. Wang, Y. Ye, L. Liu, J. Zhao, X. Liu, and H. Huang, *Breaking through the therapeutic ceiling of inflammatory bowel disease: dual-targeted therapies*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023. **158**: p. 114174.
233. Brinkmann, U. and R.E. Kontermann, *Bispecific antibodies*. Science, 2021. **372**(6545): p. 916-917.
234. Namakanova, O.A., E.A. Gorshkova, R.V. Zvartsev, S.A. Nedospasov, M.S. Drutskaya, and E.O. Gubernatorova, *Therapeutic Potential of Combining IL-6 and TNF Blockade in a Mouse Model of Allergic Asthma*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(7).
235. Kim, Y., H. Yi, H. Jung, Y.A. Rim, N. Park, J. Kim, S.M. Jung, S.H. Park, Y.W. Park, and J.H. Ju, *A Dual Target-directed Agent against Interleukin-6 Receptor and Tumor Necrosis Factor α ameliorates experimental arthritis*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 20150.

236. Biesemann, N., D. Margerie, C. Asbrand, M. Rehberg, V. Savova, I. Agueusop, D. Klemmer, D. Ding-Pfennigdorff, U. Schwahn, M. Dudek, K. Heyninck, E. De Tavernier, S. Cornelis, M. Kohlmann, F.O. Nestle, and M. Herrmann, *Additive efficacy of a bispecific anti-TNF/IL-6 nanobody compound in translational models of rheumatoid arthritis*. Science Translational Medicine, 2023. **15**(681): p. eabq4419.
237. Valin, A., M.J. Del Rey, C. Municio, A. Usategui, M. Romero, J. Fernández-Felipe, J.D. Cañete, F.J. Blanco, Y. Ruano, G. Criado, and J.L. Pablos, *IL6/sIL6R regulates TNF α -inflammatory response in synovial fibroblasts through modulation of transcriptional and post-transcriptional mechanisms*. BMC Molecular and Cell Biology, 2020. **21**(1): p. 74.
238. Schett, G., Y. Tanaka, and J.D. Isaacs, *Why remission is not enough: underlying disease mechanisms in RA that prevent cure*. Nature Reviews Rheumatology, 2021. **17**(3): p. 135-144.
239. Smolen, J.S., D. Aletaha, A. Barton, G.R. Burmester, P. Emery, G.S. Firestein, A. Kavanaugh, I.B. McInnes, D.H. Solomon, V. Strand, and K. Yamamoto, *Rheumatoid arthritis*. Nature Reviews Disease Primers, 2018. **4**(1): p. 18001.
240. Ji, L., T. Li, H. Chen, Y. Yang, E. Lu, J. Liu, W. Qiao, and H. Chen, *The crucial regulatory role of type I interferon in inflammatory diseases*. Cell & Bioscience, 2023. **13**(1): p. 230.
241. Wirtz, S., S. Finotto, S. Kanzler, A.W. Lohse, M. Blessing, H.A. Lehr, P.R. Galle, and M.F. Neurath, *Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells that respond to bacterial antigens*. Journal of Immunology, 1999. **162**(4): p. 1884-8.
242. Ito, H. and C.G. Fathman, *CD45RB^{high} CD4⁺ T cells from IFN-gamma knockout mice do not induce wasting disease*. Journal of Autoimmunity, 1997. **10**(5): p. 455-9.
243. Hommes, D.W., T.L. Mikhajlova, S. Stoinov, D. Stimac, B. Vucelic, J. Lonovics, M. Zákuciová, G. D'Haens, G. Van Assche, S. Ba, S. Lee, and T. Pearce, *Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease*. Gut, 2006. **55**(8): p. 1131-7.
244. Beigel, F., M. Friedrich, C. Probst, K. Sotlar, B. Göke, J. Diegelmann, and S. Brand, *Oncostatin M mediates STAT3-dependent intestinal epithelial restitution via increased cell proliferation, decreased apoptosis and upregulation of SERPIN family members*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93498.
245. Sanchez, A.L., C.M. Langdon, M. Akhtar, J. Lu, C.D. Richards, P. Bercik, and D.M. McKay, *Adenoviral transfer of the murine oncostatin M gene suppresses dextran-sodium sulfate-induced colitis*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2003. **23**(4): p. 193-201.
246. Jostins, L., S. Ripke, R.K. Weersma, R.H. Duerr, D.P. McGovern, K.Y. Hui, J.C. Lee, L. Philip Schumm, ..., I.B.D.G.C. The International, *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-124.
247. West, N.R., A.N. Hegazy, B.M.J. Owens, S.J. Bullers, B. Linggi, S. Buonocore, M. Coccia, D. Görtz, ..., F. Powrie, *Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease*. Nature Medicine, 2017. **23**(5): p. 579-589.
248. Guo, J., R. Zhang, Y. Zhao, and J. Wang, *MiRNA-29c-3p Promotes Intestinal Inflammation via Targeting Leukemia Inhibitory Factor in Ulcerative Colitis*. Journal of Inflammation Research, 2021. **14**: p. 2031-2043.
249. Guimbaud, R., V. Abitbol, V. Bertrand, G. Quartier, L. Chauvelot-Moachon, J. Giroud, D. Couturier, and D.C. Chaussade, *Leukemia inhibitory factor involvement in*

- human ulcerative colitis and its potential role in malignant course*. European Cytokine Network, 1998. **9**(4): p. 607-12.
250. Vecchiarelli, H.A., R.J. Aukema, C. Hume, V. Chiang, M. Morena, C.M. Keenan, A.S. Nastase, F.S. Lee, Q.J. Pittman, K.A. Sharkey, and M.N. Hill, *Genetic Variants of Fatty Acid Amide Hydrolase Modulate Acute Inflammatory Responses to Colitis in Adult Male Mice*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021. **15**: p. 764706.
 251. Wang, J., C.Y. Chang, X. Yang, F. Zhou, J. Liu, Z. Feng, and W. Hu, *Leukemia inhibitory factor, a double-edged sword with therapeutic implications in human diseases*. *Molecular Therapy*, 2023. **31**(2): p. 331-343.
 252. Tebbutt, N.C., A.S. Giraud, M. Inglese, B. Jenkins, P. Waring, F.J. Clay, S. Malki, B.M. Alderman, D. Grail, F. Hollande, J.K. Heath, and M. Ernst, *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. *Nature Medicine*, 2002. **8**(10): p. 1089-97.
 253. Wu, X., Y. Cao, H. Xiao, C. Li, and J. Lin, *Bazedoxifene as a Novel GP130 Inhibitor for Pancreatic Cancer Therapy*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016. **15**(11): p. 2609-2619.
 254. Ernst, M., M. Najdovska, D. Grail, T. Lundgren-May, M. Buchert, H. Tye, V.B. Matthews, J. Armes, P.S. Bhathal, N.R. Hughes, E.G. Marcusson, J.G. Karras, S. Na, J.D. Sedgwick, P.J. Hertzog, and B.J. Jenkins, *STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**(5): p. 1727-38.
 255. Jackson, C.B., L.M. Judd, T.R. Menheniott, I. Kronborg, C. Dow, N.D. Yeomans, A. Boussioutas, L. Robb, and A.S. Giraud, *Augmented gp130-mediated cytokine signalling accompanies human gastric cancer progression*. *The Journal of Pathology*, 2007. **213**(2): p. 140-51.
 256. Smillie, C.S., M. Biton, J. Ordovas-Montanes, K.M. Sullivan, G. Burgin, D.B. Graham, R.H. Herbst, N. Rogel, ..., A. Regev, *Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis*. *Cell*, 2019. **178**(3): p. 714-730.e22.
 257. Gibson, D.L., M. Montero, M.J. Ropeleski, K.S. Bergstrom, C. Ma, S. Ghosh, H. Merkens, J. Huang, L.E. Månsson, H.P. Sham, K.M. McNagny, and B.A. Vallance, *Interleukin-11 reduces TLR4-induced colitis in TLR2-deficient mice and restores intestinal STAT3 signaling*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1277-88.
 258. Lim, W.W., B. Ng, A. Widjaja, C. Xie, L. Su, N. Ko, S.Y. Lim, X.Y. Kwek, S. Lim, S.A. Cook, and S. Schafer, *Transgenic interleukin 11 expression causes cross-tissue fibro-inflammation and an inflammatory bowel phenotype in mice*. *PLoS One*, 2020. **15**(1): p. e0227505.
 259. Silacci, M., W. Lembke, R. Woods, I. Attinger-Toller, N. Baenziger-Tobler, S. Batey, R. Santimaria, U. von der Bey, S. Koenig-Friedrich, W. Zha, B. Schlereth, M. Locher, J. Bertschinger, and D. Grabulovski, *Discovery and characterization of COVA322, a clinical-stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases*. *Monoclonal Antibodies*, 2016. **8**(1): p. 141-9.
 260. Mabry, R., K.E. Lewis, M. Moore, P.A. McKernan, T.R. Bukowski, K. Bontadelli, T. Brender, S. Okada, ..., M. Snavely, *Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23*. *Protein Engineering Design & Selection*, 2010. **23**(3): p. 115-27.
 261. Wang, J., G. Kang, H. Lu, A. De Marco, H. Yuan, Z. Feng, M. Gao, X. Wang, H. Wang, and X. Zhang, *Novel bispecific nanobody mitigates experimental intestinal inflammation in mice by targeting TNF- α and IL-23p19 bioactivities*. *Clinical and Translational Medicine*, 2024. **14**(3): p. e1636.
 262. Mease, P.J., M.C. Genovese, M.E. Weinblatt, P.M. Peloso, K. Chen, A.A. Othman, Y. Li, H.T. Mansikka, A. Khatrri, N. Wishart, and J. Liu, *Phase II Study of ABT-122, a*

- Tumor Necrosis Factor– and Interleukin-17A–Targeted Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Patients With Psoriatic Arthritis With an Inadequate Response to Methotrexate.* Arthritis & Rheumatology, 2018. **70**(11): p. 1778-1789.
263. Genovese, M.C., M.E. Weinblatt, J.A. Aelion, H.T. Mansikka, P.M. Peloso, K. Chen, Y. Li, A.A. Othman, A. Khatri, N.S. Khan, and R.J. Padley, *ABT-122, a Bispecific Dual Variable Domain Immunoglobulin Targeting Tumor Necrosis Factor and Interleukin-17A, in Patients With Rheumatoid Arthritis With an Inadequate Response to Methotrexate.* Arthritis & Rheumatology, 2018. **70**(11): p. 1710-1720.
 264. Coperchini, F., L. Chiovato, and M. Rotondi, *Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All But All for One!* Frontiers in Immunology, 2021. **12**: p. 668507.
 265. Middleton, E.A., X.Y. He, F. Denorme, R.A. Campbell, D. Ng, S.P. Salvatore, M. Mostyka, A. Baxter-Stoltzfus, ..., C.C. Yost, *Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome.* Blood, 2020. **136**(10): p. 1169-1179.
 266. Du, F., B. Liu, and S. Zhang, *COVID-19: the role of excessive cytokine release and potential ACE2 down-regulation in promoting hypercoagulable state associated with severe illness.* Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2021. **51**(2): p. 313-329.
 267. Chen, L.Y.C., C.M. Biggs, S. Jamal, S. Stukas, C.L. Wellington, and M.S. Sekhon, *Soluble interleukin-6 receptor in the COVID-19 cytokine storm syndrome.* Cell Rep Med, 2021. **2**(5): p. 100269.
 268. Teuwen, L.A., V. Geldhof, A. Pasut, and P. Carmeliet, *COVID-19: the vasculature unleashed.* Nature Reviews Immunology, 2020. **20**(7): p. 389-391.
 269. Kang, S., T. Tanaka, H. Inoue, C. Ono, S. Hashimoto, Y. Kioi, H. Matsumoto, H. Matsuura, T. Matsubara, K. Shimizu, H. Ogura, Y. Matsuura, and T. Kishimoto, *IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome.* Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 2020. **117**(36): p. 22351-22356.
 270. Werner, J., R.M. Kronberg, P. Stachura, P.N. Ostermann, L. Müller, H. Schaal, S. Bhatia, J.N. Kather, A. Borkhardt, A.A. Pandya, K.S. Lang, and P.A. Lang, *Deep Transfer Learning Approach for Automatic Recognition of Drug Toxicity and Inhibition of SARS-CoV-2.* Viruses, 2021. **13**(4).
 271. Kyriakidis, N.C., A. López-Cortés, E.V. González, A.B. Grimaldos, and E.O. Prado, *SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates.* NPJ Vaccines, 2021. **6**(1): p. 28.
 272. Naidoo, D.B. and A.A. Chuturgoon, *The Potential of Nanobodies for COVID-19 Diagnostics and Therapeutics.* Molecular Diagnosis & Therapy, 2023. **27**(2): p. 193-226.
 273. Peng, J., M. Fu, H. Mei, H. Zheng, G. Liang, X. She, Q. Wang, and W. Liu, *Efficacy and secondary infection risk of tocilizumab, sarilumab and anakinra in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis.* Reviews in Medical Virology, 2022. **32**(3): p. e2295.
 274. Abidi, E., W.S. El Nekidy, E. Alefishat, N. Rahman, G.A. Petroianu, R. El-Lababidi, and J. Mallat, *Tocilizumab and COVID-19: Timing of Administration and Efficacy.* Frontiers in Pharmacology, 2022. **13**: p. 825749.
 275. Rodríguez-Hernández, M., M. Baena-Bustos, D. Carneros, C. Zurita-Palomo, P. Muñoz-Pinillos, J. Millán, F.J. Padillo, C. Smerdou, C. von Kobbe, S. Rose-John, and M. Bustos, *Targeting IL-6 trans-signalling by sgp130Fc attenuates severity in SARS-CoV-2 -infected mice and reduces endotheliopathy.* EBioMedicine, 2024. **103**: p. 105132.

276. Siemieniuk, R.A., J.J. Bartoszko, J.P. Díaz Martinez, E. Kum, A. Qasim, D. Zeraatkar, A. Izcovich, S. Mangala, ..., R. Brignardello-Petersen, *Antibody and cellular therapies for treatment of covid-19: a living systematic review and network meta-analysis*. British Medical Journal, 2021. **374**: p. n2231.
277. Gupta, S., W. Wang, S.S. Hayek, L. Chan, K.S. Mathews, M.L. Melamed, S.K. Brenner, A. Leonberg-Yoo, ..., D.E. Leaf, *Association Between Early Treatment With Tocilizumab and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19*. JAMA Internal Medicine, 2021. **181**(1): p. 41-51.
278. Lang, V.R., M. Englbrecht, J. Rech, H. Nüsslein, K. Manger, F. Schuch, H.P. Tony, M. Fleck, B. Manger, G. Schett, and J. Zwerina, *Risk of infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(5): p. 852-7.
279. Li, J., X. Liao, Y. Zhou, L. Wang, H. Yang, W. Zhang, Z. Zhang, and Y. Kang, *Association between glucocorticoids treatment and viral clearance delay in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis*. BMC Infectious Diseases, 2021. **21**(1): p. 1063.
280. Ye, Z.W., S. Yuan, J.F. Chan, A.J. Zhang, C.Y. Yu, C.P. Ong, D. Yang, C.C. Chan, K. Tang, J. Cao, V.K. Poon, C.C. Chan, J.P. Cai, H. Chu, K.Y. Yuen, and D.Y. Jin, *Beneficial effect of combinational methylprednisolone and remdesivir in hamster model of SARS-CoV-2 infection*. Emerging Microbes & Infections, 2021. **10**(1): p. 291-304.
281. Bockmann, J.H., M. Dandri, S. Lüth, N. Pannicke, and A.W. Lohse, *Combined glucocorticoid and antiviral therapy of hepatitis B virus-related liver failure*. World Journal of Gastroenterology, 2015. **21**(7): p. 2214-9.
282. Moseley, C.E., R.G. Webster, and J.R. Aldridge, *Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice*. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2010. **4**(5): p. 307-11.
283. Ansari, A.M., A.K. Ahmed, A.E. Matsangos, F. Lay, L.J. Born, G. Marti, J.W. Harmon, and Z. Sun, *Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments*. Stem Cell Reviews and Reports, 2016. **12**(5): p. 553-559.
284. Lipták, N., Z. Bösze, and L. Hiripi, *GFP transgenic animals in biomedical research: a review of potential disadvantages*. Physiological Research, 2019. **68**(4): p. 525-530.
285. Gambotto, A., G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz, T. Tüting, P.D. Robbins, and A.B. DeLeo, *Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope*. Gene Therapy, 2000. **7**(23): p. 2036-2040.
286. Shemiakina, I., G.V. Ermakova, P.J. Cranfill, M.A. Baird, R.A. Evans, E.A. Souslova, D.B. Staroverov, A.Y. Gorokhovatsky, E.V. Putintseva, T.V. Gorodnicheva, T.V. Chepurnykh, L. Strukova, S. Lukyanov, A.G. Zaisky, M.W. Davidson, D.M. Chudakov, and D. Shcherbo, *A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity*. Nature Communications, 2012. **3**: p. 1204.
287. Yanar, S., M. Sarihan, M. Kasap, G. Akpınar, K. Teke, and B. Yaprak Bayrak, *GFP Transfection Alters Protein Expression Patterns in Prostate Cancer Cells: A Proteomic Study*. Journal of Fluorescence, 2024.
288. Rossotti, M.A., K. Bélanger, K.A. Henry, and J. Tanha, *Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies*. The FEBS Journal, 2022. **289**(14): p. 4304-4327.
289. Martinez-Fabregas, J., S. Wilmes, L. Wang, M. Hafer, E. Pohler, J. Lokau, C. Garbers, A. Cozzani, P.K. Fyfe, J. Piehler, M. Kazemian, S. Mitra, and I. Moraga, *Kinetics of*

- cytokine receptor trafficking determine signaling and functional selectivity*. Elife, 2019. **8**.
290. Moraga, I., G. Wernig, S. Wilmes, V. Gryshkova, C.P. Richter, W.-J. Hong, R. Sinha, F. Guo, H. Fabionar, and T.S. Wehrman, *Tuning cytokine receptor signaling by re-orienting dimer geometry with surrogate ligands*. Cell, 2015. **160**(6): p. 1196-1208.
 291. Livnah, O., D.L. Johnson, E.A. Stura, F.X. Farrell, F.P. Barbone, Y. You, K.D. Liu, M.A. Goldsmith, W. He, and C.D. Krause, *An antagonist peptide–EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation*. Nature Structural Biology, 1998. **5**(11): p. 993-1004.
 292. Livnah, O., E.A. Stura, D.L. Johnson, S.A. Middleton, L.S. Mulcahy, N.C. Wrighton, W.J. Dower, L.K. Jolliffe, and I.A. Wilson, *Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å*. Science, 1996. **273**(5274): p. 464-471.
 293. Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, ..., D. Hassabis, *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
 294. Mitra, S., A.M. Ring, S. Amarnath, J.B. Spangler, P. Li, W. Ju, S. Fischer, J. Oh, R. Spolski, and K. Weiskopf, *Interleukin-2 activity can be fine tuned with engineered receptor signaling clamps*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 826-838.
 295. Zhu, I., R. Liu, J.M. Garcia, A. Hyrenius-Wittsten, D.I. Piraner, J. Alavi, D.V. Israni, B. Liu, A.S. Khalil, and K.T. Roybal, *Modular design of synthetic receptors for programmed gene regulation in cell therapies*. Cell, 2022. **185**(8): p. 1431-1443.e16.
 296. Autissier, P., J. Liautard, J. Brochier, and J.P. Gaillard, *Activation of the gp130 signaling pathway by monoclonal antibodies directed against the gp130 molecule*. European Journal of Immunology, 1997. **27**(3): p. 794-797.
 297. Müller-Newen, G., A. Küster, J. Wijdenes, F. Schaper, and P.C. Heinrich, *Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(7): p. 4579-86.
 298. Liu, X., Y. Zhao, H. Shi, Y. Zhang, X. Yin, M. Liu, H. Zhang, Y. He, B. Lu, and T. Jin, *Human immunoglobulin G hinge regulates agonistic anti-CD40 immunostimulatory and antitumour activities through biophysical flexibility*. Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 4206.
 299. Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt, *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-9.
 300. Frazzette, N., A.C. Cruz, X. Wu, J.A. Hammer, J. Lippincott-Schwartz, R.M. Siegel, and P. Sengupta, *Super-resolution imaging of Fas/CD95 reorganization induced by membrane-bound Fas ligand reveals nanoscale clustering upstream of FADD recruitment*. Cells, 2022. **11**(12): p. 1908.
 301. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2015. **7**(4).
 302. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Fas and TRAIL ‘death receptors’ as initiators of inflammation: Implications for cancer*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2015. **39**: p. 26-34.
 303. Shen, C., J. Pei, X. Guo, L. Zhou, Q. Li, and J. Quan, *Structural basis for dimerization of the death effector domain of the F122A mutant of Caspase-8*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 16723.
 304. Boschert, V., A. Krippner-Heidenreich, M. Branschädel, J. Tepperink, A. Aird, and P. Scheurich, *Single chain TNF derivatives with individually mutated receptor binding*

- sites reveal differential stoichiometry of ligand receptor complex formation for TNFR1 and TNFR2. *Cellular Signalling*, 2010. **22**(7): p. 1088-1096.
305. Kakinuma, C., K. Takagaki, T. Yatomi, N. Nakamura, S. Nagata, A. Uemura, and Y. Shibutani, *Acute Toxicity of an Anti-Fas Antibody in Mice*. *Toxicologic Pathology*, 1999. **27**(4): p. 412-420.
 306. Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, and S. Nagata, *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. *Nature*, 1993. **364**(6440): p. 806-809.
 307. Le Gallo, M., A. Poissonnier, P. Blanco, and P. Legembre, *CD95/Fas, non-apoptotic signaling pathways, and kinases*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**: p. 1216.
 308. Lavrik, I.N., A. Golks, D. Riess, M. Bentele, R. Eils, and P.H. Krammer, *Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(18): p. 13664-13671.
 309. Chen, L., S.-M. Park, A.V. Tumanov, A. Hau, K. Sawada, C. Feig, J.R. Turner, Y.-X. Fu, I.L. Romero, and E. Lengyel, *CD95 promotes tumour growth*. *Nature*, 2010. **465**(7297): p. 492-496.
 310. Kreuz, S., D. Siegmund, J.-J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Häcker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, and P. Scheurich, *NFκB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP*. *The Journal of Cell Biology*, 2004. **166**(3): p. 369-380.
 311. Palao, G., B. Santiago, M.a. Galindo, J.n. Rullas, J. Alcamí, J.C. Ramirez, and J.L. Pablos, *Fas activation of a proinflammatory program in rheumatoid synoviocytes and its regulation by FLIP and caspase 8 signaling*. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 2006. **54**(5): p. 1473-1481.
 312. Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J.P. Shapiro, M.J. Brauer, M.C. Kiefer, P.J. Barr, and J.D. Mountz, *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule*. *Science*, 1994. **263**(5154): p. 1759-1762.
 313. Jenkins, M., M. Keir, and J.M. McCune, *A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(11): p. 7988-7993.
 314. O'Reilly, L.A., L. Tai, L. Lee, E.A. Kruse, S. Grabow, W.D. Fairlie, N.M. Haynes, D.M. Tarlinton, J.-G. Zhang, and G.T. Belz, *Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis*. *Nature*, 2009. **461**(7264): p. 659-663.
 315. Zoellner, N., N. Coesfeld, F.H. De Vos, J. Denter, H.C. Xu, E. Zimmer, B. Knebel, H. Al-Hasani, S. Mossner, and P.A. Lang, *Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling*. *Frontiers in Microbiology*, 2022. **13**: p. 947169.
 316. Kotch, C., D. Barrett, and D.T. Teachey, *Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome*. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2019. **15**(8): p. 813-822.
 317. McLellan, M.A., N.A. Rosenthal, and A.R. Pinto, *Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations*. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2017. **7**(1): p. 1-12.
 318. Laky, K. and A.M. Kruisbeek, *In Vivo Depletion of T Lymphocytes*. *Current Protocols in Immunology*, 2016. **113**(1): p. 4.1.1-4.1.9.
 319. Devel, L., N. Guedeney, S. Bregant, A. Chowdhury, M. Jean, and P. Legembre, *Role of metalloproteases in the CD95 signaling pathways*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **13**: p. 1074099.
 320. Teague, T.K., P. Marrack, J.W. Kappler, and A.T. Vella, *IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis*. *Journal of Immunology* 1997. **158**(12): p. 5791-5796.

321. Alam, A., L.Y. Cohen, S. Aouad, and R.P. Sékaly, *Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(12): p. 1879-90.
322. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-1456.
323. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Non-apoptotic Fas signaling*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003. **14**(1): p. 53-66.
324. Floss, D.M. and J. Scheller, *Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2019. **47**: p. 1-20.
325. Zhang, J., L. Ding, L. Holmfeldt, G. Wu, S.L. Heatley, D. Payne-Turner, J. Easton, X. Chen, J. Wang, and M. Rusch, *The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2012. **481**(7380): p. 157-163.
326. Pattyn, E., X. Van Ostade, L. Schauvliege, A. Verhee, M. Kalai, J. Vandekerckhove, and J. Tavernier, *Dimerization of the interferon type I receptor IFNAR2–2 is sufficient for induction of interferon effector genes but not for full antiviral activity*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(49): p. 34838-34845.
327. Hummel, T.M., T. Ackfeld, M. Schönberg, G. Ciupka, F. Schulz, A. Oberdoerster, J. Grötzinger, J. Scheller, and D.M. Floss, *Synthetic deletion of the interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation*. Molecular and Cellular Biology, 2017. **37**(17): p. e00014-17.
328. Kellar, K.A., M.V. Lorenzi, C.P. Ho, D. You, M.-L. Wen, R.P. Ryseck, S. Oppenheimer, B.E. Fink, G.D. Vite, and B.R. Rowley, *Constitutively active receptor tyrosine kinases as oncogenes in preclinical models for cancer therapeutics*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(6): p. 1571-1576.
329. Shum, T., B. Omer, H. Tashiro, R.L. Kruse, D.L. Wagner, K. Parikh, Z. Yi, T. Sauer, D. Liu, and R. Parihar, *Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells*. Cancer Discovery, 2017. **7**(11): p. 1238-1247.
330. Zhao, Z., Y. Li, W. Liu, and X. Li, *Engineered IL-7 receptor enhances the therapeutic effect of AXL-CAR-T cells on triple-negative breast cancer*. BioMed Research International, 2020. **2020**.
331. Sharma, S., T. Sauer, B.A. Omer, T. Shum, L.A. Rollins, and C.M. Rooney, *Constitutive Interleukin-7 Cytokine Signaling Enhances the Persistence of Epstein–Barr Virus-Specific T-Cells*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(21): p. 15806.
332. Belver, L. and A. Ferrando, *The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia*. Nature Reviews Cancer, 2016. **16**(8): p. 494-507.
333. Thomas, K.R., E.J. Allenspach, N.D. Camp, M.N. Wray-Dutra, S. Khim, A. Zielinska-Kwiatkowska, A.E. Timms, J.P. Loftus, H.D. Liggitt, and K. Georgopoulos, *Activated interleukin-7 receptor signaling drives B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice*. Leukemia, 2022. **36**(1): p. 42-57.
334. Scherger, A.K., M. Al-Maarri, H.C. Maurer, M. Schick, S. Maurer, R. Öllinger, I. Gonzalez-Menendez, M. Martella, M. Thaler, and K. Pechloff, *Activated gp130 signaling selectively targets B cell differentiation to induce mature lymphoma and plasmacytoma*. JCI Insight, 2019. **4**(15).
335. Schmidt-Arras, D., *Cell-autonomous hepatocyte-specific GPI30 signaling is sufficient to trigger a robust innate immune response in mice*. Journal of Hepatology, 2020.
336. Kerkar, S.P., R.S. Goldszmid, P. Muranski, D. Chinnasamy, Z. Yu, R.N. Reger, A.J. Leonardi, R.A. Morgan, E. Wang, and F.M. Marincola, *IL-12 triggers a programmatic*

- change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(12): p. 4746-4757.
337. Hervás-Stubbs, S., U. Mancheno, J.-I. Riezu-Boj, A. Larraga, M.C. Ochoa, D. Alignedani, C. Alfaro, A. Morales-Kastresana, I. Gonzalez, and E. Larrea, *CD8 T cell priming in the presence of IFN- α renders CTLs with improved responsiveness to homeostatic cytokines and recall antigens: important traits for adoptive T cell therapy*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(7): p. 3299-3310.
 338. Sukumaran, S., N. Watanabe, P. Bajgain, K. Raja, S. Mohammed, W.E. Fisher, M.K. Brenner, A.M. Leen, and J.F. Vera, *Enhancing the potency and specificity of engineered T cells for cancer treatment*. Cancer Discovery, 2018. **8**(8): p. 972-987.
 339. Sockolosky, J.T., E. Trotta, G. Parisi, L. Picton, L.L. Su, A.C. Le, A. Chhabra, S.L. Silveria, B.M. George, and I.C. King, *Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes*. Science, 2018. **359**(6379): p. 1037-1042.
 340. Etxeberria, I., I. Olivera, E. Bolaños, A. Cirella, Á. Teijeira, P. Berraondo, and I. Melero, *Engineering bionic T cells: signal 1, signal 2, signal 3, reprogramming and the removal of inhibitory mechanisms*. Cellular & Molecular Immunology, 2020. **17**(6): p. 576-586.
 341. Wang, W., Y. Liu, Z. He, L. Li, S. Liu, M. Jiang, B. Zhao, M. Deng, W. Wang, and X. Mi, *Breakthrough of solid tumor treatment: CAR-NK immunotherapy*. Cell Death Discovery, 2024. **10**(1): p. 40.
 342. Lee, D.W., R. Gardner, D.L. Porter, C.U. Louis, N. Ahmed, M. Jensen, S.A. Grupp, and C.L. Mackall, *Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome*. Blood, 2014. **124**(2): p. 188-195.
 343. Mueller, K.T., E. Waldron, S.A. Grupp, J.E. Levine, T.W. Laetsch, M.A. Pulsipher, M.W. Boyer, K.J. August, J. Hamilton, and R. Awasthi, *Clinical pharmacology of tisagenlecleucel in B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Clinical Cancer Research, 2018. **24**(24): p. 6175-6184.
 344. Tan, A.H., N. Vinanica, and D. Campana, *Chimeric antigen receptor-T cells with cytokine neutralizing capacity*. Blood Advances, 2020. **4**(7): p. 1419-1431.
 345. Zhang, H., X. Lv, Q. Kong, and Y. Tan, *IL-6/IFN- γ double knockdown CAR-T cells reduce the release of multiple cytokines from PBMCs in vitro*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2022. **18**(1): p. 1-14.

DANKSAGUNG

Es gibt eine Handvoll Menschen, die mich auf meinem Weg begleitet haben und bei denen ich mich bedanken möchte.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Jürgen Scheller: Vielen Dank für deine Unterstützung und Motivation und die Möglichkeit, an so vielen abwechslungsreichen Themen zu arbeiten. Deine kritische Natur und deine ironischen Bemerkungen haben nicht nur den wissenschaftlichen Alltag spannender, sondern auch die Zeit der Pandemie erträglicher gemacht (hust).

Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

An dieser Stelle möchte ich mich bei unseren Betreuern, Dr. Doreen M. Floss, Dr. Kristina Vogel und Dr. Jens Moll für die Zeit, die konstruktiven Diskussionen, die unermüdliche Hilfe und die Einarbeitung in die Technologie und Methodik bedanken. Von euch kann man sich mehr als eine Scheibe abschneiden.

Petra, für uns bist und bleibst du die Mutti! Danke für die lustigen Eskapaden. Carmen, unsere Blume des Instituts, danke für dein offenes Ohr und deine ewig währende Heiterkeit. Den Mitgliedern des Instituts AG Scheller danke ich dafür, dass wir so viel mehr aus unserer Arbeit gemacht haben und daraus so viele Freundschaften entstanden sind.

Annika, trotz der besonderen Umstände (der Mops, der dir das Bein brach oder das Schiff, das mich zerstörte) haben wir uns in der kurzen Zeit so intensiv kennen gelernt, dass es schon fast gruselig ist. Dennoch wuchsen wir umso enger zusammen. Danke, dass du so bist wie du bist! Und danke für die Krautwickel, meine Retterin in der Not!

Hendrik, wir haben uns so viel erzählt und sind mit so vielen Tränen und Wutausbrüchen durch das Labor geschlendert, ich fasse es nicht, dass die Jahre so schnell von dannen gezogen sind. Es fühlt sich an wie gestern, als ich zu dir sagte, wir sitzen nun für drei Jahre aufeinander. Und auf einmal sind wir fertig, unglaublich! Aber das Beste kommt zum Schluss, US und A!

Der größte Dank gilt meiner Familie und Julian für eure Unterstützung, für das Ertragen meiner Launen und dafür, dass ihr für mich da wart, auch wenn der Weg nach Hause weit ist. Ich bin so glücklich, euch alle in meinem Leben zu haben. Danke, dass ihr so seid wie ihr seid! Ich bin gespannt, wohin uns unsere Reise führen wird.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht und es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche von mir unternommen.

Düsseldorf, den 01.08.2024

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.