

**Von FLT3 über ENG bis OX40:
Optimierung von anti-Tumor-Antikörpern durch
verbesserte Rekrutierung immunologischer
Effektorzellen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der

EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Martin Hofmann

aus Stuttgart

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

14.10.2013

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

Prof. Dr. Gundram Jung

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Prof. Dr. Michael Bachmann

*I trust, my lords and gentlemen, that from what I have
said
You may have obtained the impression,
[...]
that we no longer find ourselves lost in a boundless sea,
but we have already caught a distinct glimpse of the land
which we hope, nay, we expect,
will yield rich treasures for biology and therapeutics.*

Paul Ehrlich (1854-1915)

Zusammenfassung

Chimärisierte und humanisierte monoklonale Antikörper der zweiten Generation haben die Therapie und Prognose einiger maligner Erkrankungen bereits stark verbessert. In vielen Fällen (insbesondere bei soliden Tumoren) ist ihre therapeutische Aktivität aber begrenzt. Erste präklinische und klinische Studien mit Molekülen der dritten Generation zeigen eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit. Diese dritte Generation therapeutischer Antikörper definiert sich durch gentechnisch verbesserte Effektormechanismen, welche durch Modifikationen des Fc-Teils eines Antikörpers oder durch die Generierung bispezifischer Moleküle erreicht wird. Als Tumorzell-lyisierende Effektorpopulationen kommen dabei neben den klassischen Fc γ -Rezeptor-tragenden Zellen des angeborenen Immunsystems auch T-Zellen in Betracht.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung, Generierung und Optimierung therapeutischer Antikörpermoleküle der dritten Generation zur verbesserten Rekrutierung immunologischer Effektoren, wobei drei unterschiedliche Strategien verfolgt wurden:

Die Fc-Optimierung des anti-FLT3-Antikörpers 4G8SDIEM resultiert in einer erhöhten Potenz der Rekrutierung und Aktivierung Fc γ -Rezeptor-tragender Effektorzellen. Mit der abgeschlossenen präklinischen Charakterisierung dieses Antikörpers, welcher gegen die Rezeptortyrosinkinase FLT3 gerichtet ist, konnte die Basis für eine klinische Applikation bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie im Stadium der minimalen Resterkrankung geschaffen werden. Dabei fand sich, zusätzlich zu der bereits bekannten Expression von FLT3 auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, das FLT3-Antigen auf blastären Zellen aller untersuchter AML-Patienten, wobei durch Quantifizierung der Antigendichte eine Überexpression von FLT3 auf AML-Blasten gegenüber normalen Zellen gezeigt werden konnte. In umfangreichen *in vitro*-Versuchen konnten weiterhin, neben einer potenten 4G8SDIEM-vermittelten zellulären Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen, keine Hinweise auf ausgeprägte Toxizität gegenüber normalen Zellen gefunden werden.

Alternativen zu Fc-optimierten Antikörpern mit potentiell höherer Potenz bezüglich der Vermittlung von Effektorfunktionen konnten in weiteren Untersuchungen in Form bispezifischer Ig γ -basierter Moleküle zur Aktivierung CD16-exprimierender Effektoren identifiziert werden. Der direkte Vergleich von zwei Fc-optimierten α Endoglin-Antikörpern mit deren bispezifischen und gleichzeitig CD16-stimulierenden Ig γ -Derivaten definierte dabei das erkannte Endoglin-Epitop als den relevanten Parameter für die biologische Aktivität der einzelnen Molekülformate.

Neben den Fc γ -Rezeptor-exprimierenden Immunzellen stellen T-Zellen die potentesten Effektoren immuntherapeutischer Ansätze dar. In diesem Kontext stellt OX40, das aktivierende Signale auf Effektor-T-Zellen und potentielle inhibitorische Signale gegenüber regulatorischen T-Zellen vermitteln kann, ein wichtiges Ziel immunstimulatorischer Antikörper oder deren Derivate dar. Im Zuge von Strategien zur optimierten Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen wurden agonistische OX40-Antikörper generiert, welche die Proliferation dieser Zellen deutlich verstärken. Damit sind Moleküle generiert, die nach weiterer Charakterisierung potentiell zur Immunstimulation eingesetzt werden können.

Abstract

Chimeric and humanized monoclonal second generation antibodies have already significantly improved the therapy and prognosis of some malignant diseases. In many cases, however, therapeutic activity is limited. Early preclinical and clinical studies using third generation antibodies are yielding promising results. The third generation of therapeutic antibodies is defined by improved effector function, which is achieved by modifications of the Fc-part of an antibody or alternatively by the generation of bispecific molecules. In addition to the classical Fc γ -receptor-bearing cells of the innate immune system T cells can be utilized as potent effector cells. This work describes the characterization, generation and optimization of therapeutic antibody molecules of the third generation for improved recruitment and activation of immunological effectors. To this end three different strategies have been employed: The Fc-optimization of the antibody 4G8SDIEM resulted in an enhanced capability to recruit and activate Fc γ -receptor bearing effector cells. The completed preclinical characterization of this antibody, directed against the receptor tyrosine kinase FLT3, provide a basis for the clinical application in patients with acute myeloid leukemia at the stage of minimal residual disease. In addition to the well-known expression of FLT3 on hematopoietic stem and progenitor cells, the FLT3 antigen was detectable on blasts of all investigated AML patients. In most cases expression of FLT3 by AML blasts was higher than that by normal cells as measured by the quantification of antigen density. No evidence of significant toxicity against normal cells could be demonstrated, whereas a potent 4G8SDIEM-mediated cellular cytotoxicity against malignant cells was detected in extensive *in vitro* experiments.

In further studies alternatives to Fc-engineered antibodies were evaluated in the form bispecific Ig γ -based molecules which activate CD16-expressing effector cells. These molecules exhibited comparable or even higher potency with respect to the mediation of effector functions. A direct comparison of two Fc-optimized α Endoglin-antibodies with their respective bispecific and CD16 stimulating Ig γ derivatives defined the epitope of the Endoglin molecule recognized by the respective antibody as the relevant parameter for the biological activity of the different molecular formats. In addition to the Fc γ -receptor-expressing immune cells T cells are potent effectors for immunotherapeutic approaches. In this context, OX40, which delivers activating signals to effector T cells and potential inhibitory signals to regulatory T cells, represents an important target of immunostimulatory antibodies or derivatives thereof. Thus, agonistic OX40 antibodies were generated, which significantly enhance the proliferation of these cells. After further characterization these molecules may be used as immune stimulators.

Eigene Publikationen

Publikationen

- Otz T, Grosse-Hovest L, Hofmann M, Rammensee HG, Jung G.
A bispecific single-chain antibody that mediates target cell-restricted, supra-agonistic CD28 stimulation and killing of lymphoma cells
Leukemia 2009 Jan 23(1), 71-7
- Grosse-Hovest L, Buehring HJ, Hofmann M, Aulwurm S, Jung G. *Anti-FLT3 antibodies and methods of using the same*
Patent Publication number: EP 2 516 468
- Hofmann M, Große-Hovest L, Nübling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, Bühring HJ, Schwartz K, Haen SP, Schilbach K, Rammensee HG, Salih HR, Jung G.
Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia.
Leukemia 2012 Jun 26(6): 1228-37
- Nalivaiko K, Hofmann M, Krammer P, Rammensee HG, Große-Hovest L, Jung G.
A bispecific CD20 X CD95 antibody kills activated human B cells and suppresses antibody production in vitro more effectively than the monospecific CD20 antibody Rituximab
In Vorbereitung
- Durben M, Schmiedel D, Hofmann M, Nübling T, Pyz E, Bühring HJ, Rammensee HG, Salih HR, Große-Hovest L, Jung G
Selection and characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of myeloid leukemia
In Vorbereitung

Poster

- Salih HR, Baessler T, Hofmann M, Grosse-Hovest L, Bamberg M, Aulwurm S, Buehring HJ, Kanz L, Jung G.
Generation, Functional Characterization and Clinical Application of a Novel Fc-Optimized Anti-FLT3 Antibody for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia.
American Society of Hematology Meeting 2010
- Salih HR, Bässler T, Hofmann M, Große-Hovest L, Bamberg M, Aulwurm S, Bühring HJ, Kanz L, Jung G.
A novel Fc-optimized anti-FLT3 antibody for the treatment of AML.
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Meeting 2011
- Seidel UJE, Grosse-Hovest L, Schlegel P, Handgretinger R, Jung G, Aulwurm S, Hofmann M, Pyz E, Rammensee HG, Lang P. *Monitoring of ADCC with Fc-optimized CD19 antibody in post-transplant MRD treatment of paediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia.*
European Congress of Immunology 2012
- Schumacher CE, Nuebling T, Hofmann M, Schmiedel BJ, Kanz L, Jung G, Salih HR. *The role of OX40 and its ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, function and modulation of NK cell anti-leukemia reactivity.*
American Society of Hematology Meeting 2012
- Nuebling T, Schumacher CE, Hofmann M, Schmiedel BJ, Kanz L, Jung G, Salih HR.
Role of OX40 and its ligand in NK cell mediated immune surveillance of leukemia.
Forschungskolloquium UKT (Fortüne) 2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Krebs | 1 |
| 1.1.1 | Tumorimmunologie | 2 |
| 1.1.2 | Immuntherapie von Tumorerkrankungen | 4 |
| 1.2 | Antikörper | 7 |
| 1.2.1 | Struktur von Antikörpern | 8 |
| 1.2.2 | Wirkmechanismen von Ig γ -Antikörpern | 10 |
| 1.3 | Therapeutische Ig γ -Antikörper | 12 |
| 1.3.1 | Fc-optimierte Ig γ -Antikörper der dritten Generation | 14 |
| 1.3.2 | Die FLT3-spezifischen Fc-optimierten Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM | 15 |
| 1.3.3 | Fc γ R-Aktivierung durch bispezifische Antikörper | 19 |
| 1.3.4 | Bispezifische Antikörpermoleküle mit Spezifitäten für Endog- lin und CD16 zur anti-angiogenetischen Tumorthherapie | 20 |
| 1.3.5 | Manipulation der T-Zellaktivität durch Antikörper | 24 |
| 1.3.6 | OX40 als kostimulierendes T-Zell-Antigen | 26 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 28 |
| 2 | Material und Methoden | 29 |
| 2.1 | Material | 29 |
| 2.1.1 | Geräte | 29 |
| 2.1.2 | Glas- und Plastikwaren | 30 |
| 2.1.3 | Chemikalien und Reagenzien | 31 |
| 2.1.4 | Gebrauchsfertige Kits | 33 |
| 2.1.5 | Oligonukleotide | 33 |
| 2.1.6 | Software | 34 |
| 2.1.7 | Puffer und Medien | 35 |
| 2.1.8 | Bakterienstämme | 39 |
| 2.1.9 | Plasmide | 39 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.1.10 | Antikörper | 40 |
| 2.1.11 | Zelllinien | 43 |
| 2.1.12 | Primäre humane Zellen | 44 |
| 2.1.13 | Mäuse | 44 |
| 2.2 | Methoden eukaryotischer Zellkultur | 45 |
| 2.2.1 | Passagieren und Ernten von Zellen | 45 |
| 2.2.2 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 45 |
| 2.2.3 | Subklonierung von Zelllinien | 45 |
| 2.2.4 | Kryokonservierung von Zellen | 45 |
| 2.2.5 | Kultivierung antikörperproduzierender Zellen | 46 |
| 2.2.6 | Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) | 46 |
| 2.2.7 | Zellseparation mittels magnetischer Partikel | 47 |
| 2.2.8 | Transfektion eukaryotischer Zellen | 47 |
| 2.3 | Molekularbiologische Methoden | 48 |
| 2.3.1 | Plasmid-Päparation | 48 |
| 2.3.2 | Extension von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenre- aktion | 48 |
| 2.3.3 | Reinigung der Nukleinsäuren | 49 |
| 2.3.4 | Behandlung der Nukleinsäuren | 50 |
| 2.4 | Generierung von Hybridomen | 53 |
| 2.4.1 | Immunisierung von Mäusen | 53 |
| 2.4.2 | Zellfusion | 53 |
| 2.4.3 | Testung von Hybridomüberständen und Subklonierung | 54 |
| 2.5 | Chromatographische Verfahren | 55 |
| 2.5.1 | Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A | 55 |
| 2.5.2 | Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an KappaSelect | 55 |
| 2.5.3 | Dialyse proteinhaltiger Lösungen | 55 |
| 2.6 | Analytische Methoden | 57 |
| 2.6.1 | Analytische Gelfiltration | 57 |
| 2.6.2 | Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese | 57 |
| 2.6.3 | Durchflusszytometrie | 57 |
| 2.7 | Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern | 60 |
| 2.7.1 | ⁵¹ Cr-Freisetzungstest | 60 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.7.2 | Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Zelllyse | 60 |
| 2.7.3 | Messung der Proliferation mittels $^3\text{[H]}$ -methyl-Thymidin-Inkorporationsexperimenten | 61 |
| 3 | Ergebnisse | 63 |
| 3.1 | Fc-optimierte αFLT3 -Antikörper zur Therapie akuter myeloischer Leukämien | 63 |
| 3.1.1 | Bindung der chimärisierten Antikörper 4G8 und BV10 an FLT3 | 63 |
| 3.1.2 | Antikörper-vermittelte Lyse FLT3-positiver NALM-16-Zellen . | 65 |
| 3.1.3 | Expression von FLT3 auf leukämischen Blasten | 67 |
| 3.1.4 | 4G8SDIEM-vermittelte Lyse primärer AML-Blasten | 71 |
| 3.1.5 | Durchflusszytometrische Quantifizierung Antikörper-vermittelter Lyse von AML-Blasten | 73 |
| 3.1.6 | Expression von FLT3 auf dendritischen Zellen | 78 |
| 3.1.7 | FLT3-Expression auf Zellen des normalen Knochenmarks und Untersuchungen zur Stammzelltoxizität von 4G8SDIEM . . . | 80 |
| 3.1.8 | Weitere Therapie-relevante Parameter | 84 |
| 3.1.9 | Serumkinetik von 4G8SDIEM <i>in vivo</i> | 87 |
| 3.2 | Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16 | 89 |
| 3.2.1 | Klonierung, Expression und Aufreinigung der Moleküle | 90 |
| 3.2.2 | Proteinbiochemische Analyse der Moleküle | 91 |
| 3.2.3 | Disulfid-Stabilisierung des C-terminalen 3G8-scF _V | 94 |
| 3.2.4 | Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle an Endoglin und CD16 | 99 |
| 3.2.5 | Charakterisierung der ADCC-Vermittlung durch bispezifische ENGxCD16-Moleküle | 103 |
| 3.3 | Generierung monoklonaler, agonistischer αOX40 -Antikörper | 108 |
| 3.3.1 | Generierung monoklonaler αOX40 -Antikörper | 108 |
| 3.3.2 | Bindung der αOX40 -Antikörper des Ig γ -Isotyps | 111 |
| 3.3.3 | Expression von OX40 auf aktivierten T-Zellen | 112 |
| 3.3.4 | Agonistische Effekte der generierten αOX40 -Antikörper | 113 |
| 4 | Diskussion | 115 |
| 4.1 | Der SDIEM-optimierte αFLT3 -Antikörper 4G8SDIEM | 115 |
| 4.2 | Bispezifische Ig γ 1-Derivate mit Spezifitäten für Endoglin und CD16 . | 124 |
| 4.3 | Die Generierung von agonistischen αOX40 -Antikörpern | 129 |

| | | |
|----------|---------------------------------|------------|
| 4.4 | Ausblick | 131 |
| 5 | Danksagung | 133 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 134 |
| 7 | Appendix | 155 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 155 |
| 7.2 | Curriculum vitae | 157 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Schematische Struktur eines Ig γ 1-Antikörpers | 8 |
| 3.1 | Titration der chimären Antikörper 4G8 und BV10 auf NALM-16 | 64 |
| 3.2 | Einfluss von FLT3L auf die Bindung von BV10SDIEM und 4G8SDIEM | 64 |
| 3.3 | 4G8SDIEM- und BV10SDIEM-vermittelte zelluläre Zytotoxizität gegenüber NALM-16-Zellen | 65 |
| 3.4 | Expression von FLT3 und CD19 auf NALM-16-Zellen | 66 |
| 3.5 | Vergleich der 4G7SDIEM- und 4G8SDIEM-vermittelten Lyse von NALM-16-Zellen | 67 |
| 3.6 | FLT3-Expression auf AML-Blasten verschiedener Spender | 69 |
| 3.7 | 4G8SDIEM-vermittelte Lyse primärer AML-Blasten durch allogene PBMC | 71 |
| 3.8 | 4G8SDIEM-vermittelte Lyse von AML-Blasten durch autologe PBMC | 72 |
| 3.9 | Lyse autologer AML-Blasten <i>ex vivo</i> | 74 |
| 3.10 | Immunophänotyp der AML #27 nach 4G8SDIEM-Inkubation | 75 |
| 3.11 | Lyse autologer AML-Blasten | 77 |
| 3.12 | FLT3-Expression auf dendritischen Zellen | 78 |
| 3.13 | Toxizität von 4G8SDIEM gegenüber autologen dendritischen Zellen | 79 |
| 3.15 | FLT3-Expression auf Zellen des gesunden Knochenmarks | 80 |
| 3.14 | Durchflusszytometrische Strategie zur Selektion der Zellpopulationen gesunden Knochenmarks | 81 |
| 3.16 | Durchflusszytometrische Analyse der Toxizität von 4G8SDIEM gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des gesunden Knochenmarks | 82 |
| 3.17 | Einfluss von 4G8SDIEM auf die Kolonienbildung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen des gesunden Knochenmarks | 83 |
| 3.18 | 4G8SDIEM-induzierte Proliferation von AML-Blasten | 84 |
| 3.19 | 4G8SDIEM-induzierter Antigenshift von FLT3 | 85 |
| 3.20 | Sorafenib-induzierter Antigenshift von FLT3 | 86 |
| 3.21 | 4G8SDIEM-Konzentration im Serum des Patienten AML#2 | 87 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.22 | Übersicht über die generierten Derivate der ENGxCD16-Antikörper | 89 |
| 3.23 | Analytische Gelchromatographie der NK8-Konstrukte | 92 |
| 3.24 | Analytische Gelchromatographie der NK23-Konstrukte | 93 |
| 3.25 | Analytische Gelchromatographie der disulfidstabilisierten NK8-Konstrukte | 95 |
| 3.26 | Analytische Gelchromatographie der disulfid-stabilisierten NK23-Konstrukte | 96 |
| 3.27 | SDS-PAGE-Analyse der Konstrukte | 97 |
| 3.28 | Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle | 100 |
| 3.29 | Durchflusszytometrische Analyse der Temperaturstabilität der bispezifischen Moleküle | 101 |
| 3.30 | ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro23-Familie | 103 |
| 3.31 | ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro8-Familie | 105 |
| 3.32 | ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro8-Familie | 106 |
| 3.33 | OX40-Expression der transfizierten Sp2/0-Ag14 und CHO-Zellen | 108 |
| 3.34 | Ergebnis der Fusionen 8 und 9 | 109 |
| 3.35 | Analyse der Bindung der M-OX-Antikörper an OX40 | 111 |
| 3.36 | OX40-Expression auf CD3-stimulierten T-Zellen | 112 |
| 3.37 | Agonismus der generierten α OX40-Antikörper | 114 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 1.1 | Charakteristika der humanen $Fc\gamma R$ -Klassen | 11 |
| 1.2 | FAB-Klassifizierung der AML | 16 |
| 2.13 | Konjugierte monoklonale Antikörper | 40 |
| 2.14 | Konjugierte polyklonale Antikörper | 40 |
| 2.15 | Unkonjugierte Antikörper | 41 |
| 2.16 | Unkonjugierte Isotypkontroll-Antikörper | 42 |
| 2.17 | Zelllinien | 43 |
| 2.18 | Verwendete Mausstämme | 44 |
| 3.1 | Charakteristika der untersuchten AML-Proben | 68 |
| 3.2 | Generierte $\alpha OX40$ -Hybridome | 110 |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Krebs

Krebs bezeichnet eine Vielzahl von Erkrankungen, die jeden Teil des Körpers betreffen können. Alle Krebserkrankungen weisen als Gemeinsamkeit eine unkontrollierte Teilung und somit Anreicherung entarteter, maligner Zellen, auf. Alle malignen Zellen weisen genetische Defekte auf, die einerseits die Unabhängigkeit der Zelle von exogenen Wachstumsfaktoren, andererseits Resistenz gegenüber inhibitorischen Signalen gewährleisten, sowie die unbegrenzte Teilung der Zelle ermöglichen (zusammengefasst in [Hanahan und Weinberg, 2000] und [Hanahan und Weinberg, 2011]). Diese Zellen bilden einen Tumor, der sich schließlich zumeist nicht auf das ursprünglich betroffene Organ beschränkt. Vermehrt infiltrieren maligne Zellen im Verlauf der Krankheit angrenzende Gewebe oder bilden durch Metastasierung (d.h. sich vom Primärtumor lösende Einzelzellen) an anderen Stellen im Körper neue Tumoren.

Im Jahr 2008 sind weltweit 7,6 Millionen Menschen an Krebserkrankungen gestorben, was 13% aller Todesfälle entspricht. Innerhalb Europas bilden Krebserkrankungen mit 20% aller Todesfälle nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Diese Zahlen sind trotz Fortschritten in Grundlagen- und Wirkstoffforschung weiter steigend.

Die traditionellen Säulen der Tumorthherapie werden von Resektion, Chemo- und Strahlentherapie gebildet. Wesentliche Limitation dieser Therapieformen ist (neben z.T. inoperablen Tumoren) eine fehlende Selektivität gegenüber den entarteten Zellen. So wirken sowohl Strahlen- als auch Chemotherapie auf maligne, wie jedoch auch auf normale Zellen des Organismus, was die teils beträchtlichen Nebenwirkungen begründet.

Als eine weitere Säule der Tumorthherapie etabliert sich derzeit die Immuntherapie, d.h. die gezielte Aktivierung und Nutzung immunologischer Effektormechanismen zur Eliminierung der malignen Zellen. Erhoffen lassen sich von solchen zielgerichteten Strategien eine bessere Verträglichkeit durch die höhere Tumorspezifität und -selektivität und somit auch effizientere Therapien.

1.1.1 Tumorimmunologie

Die mit ersten Beobachtungen, die eine Interaktion des Immunsystems mit Tumorerkrankungen implizierten, wurden vor über 100 Jahren gemacht. Damals berichtete der Onkologe William Coley über die Injektion abgetöteter Bakterien (Coley's Toxin) in inoperable Tumoren. Dabei konnte bei einem Teil der so behandelten Patienten eine Regression des Tumors beobachtet werden [Coley, 1910].

Ungefähr zur gleichen Zeit begann Paul Ehrlich mit seinen immunologischen Forschungen. Ehrlich postulierte 1908 in einer Vorlesung zum ersten Mal die Kontrolle und Eliminierung tumorigener Zellen durch die „Schutzvorrichtungen des Organismus“ [Ehrlich, 1908]. Er war überzeugt, dass im Organismus ständig entartete Zellen entstehen.

Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung bzw. bei der Eliminierung von Tumoren blieb jedoch für die nächsten 40 Jahre weitestgehend unbeachtet. Erst durch die Verwendung von Inzuchtmäusen für Tumortransplantationsexperimente konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem durchaus in der Lage ist, maligne Zellen von normalen Zellen zu unterscheiden. So konnten Mäuse mit syngenen Tumoren erfolgreich immunisiert werden, was zur Abstoßung des daraufhin transplantierten Tumors führte. Diese Experimente implizierten gleichzeitig die Existenz von Tumor-Antigenen ([BALDWIN, 1955a; BALDWIN, 1955b]; zusammengefasst und erweitert in [Old und Boyse, 1964]). Diese Entwicklungen wurden sowohl von Lewis Thomas als auch von Frank Macfarlane Burnet verfolgt und ließen sie erneut über eine immunologische Kontrolle entarteter Zellen spekulieren. Burnet formulierte schließlich 1970 das Konzept der Immunüberwachung (*engl.: immunosurveillance*). Darin argumentiert er mit der evolutionären Notwendigkeit eines Kontrollsystems zur Eliminierung von mutations-tragenden und somit potentiell gefährlichen Zellen, und kommt zu dem Schluss, dass das Immunsystem bzw. Lymphozyten diese Aufgabe übernehmen [Burnet, 1970].

Die experimentelle Testung dieser Hypothese erfolgte daraufhin in unterschiedlichen Mausstämmen, u.a. in der 1966 erstmals beschriebenen *nude*-Maus [Flanagan, 1966], die keinen Thymus ausbildet [Pantelouris, 1968] und dementsprechend T-Zell-defizient ist. Allerdings lieferten die meisten dieser Versuche keine Hinweise auf eine erhöhte Tumorsuszeptibilität der verwendeten immunsupprimierten oder immundefizienten Mäuse [Stutman, 1974; Outzen et al., 1975]. Die Hypothese der *immunosurveillance* geriet aufgrund dieser Ergebnisse (und dem fehlenden Wissen über den Immundefekt der *nude*-Maus) in Zweifel und wurde lange Zeit nicht weiter verfolgt.

Die Entdeckung und Charakterisierung natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), zuerst in der Maus [Kiessling et al., 1975b; Kiessling et al., 1975a; Herberman und Holden, 1978] und kurz darauf im humanen System [Pross und Jondal, 1975], stellte einen ersten Schritt zur Renaissance der *immunosurveillance*-Theorie dar. NK-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, spontan und ohne vorherige Stimulation, die Lyse verschiedener Tumorzellen zu induzieren.

Welche immunologische Zellpopulationen bei der Überwachung und Eliminierung von Mikrotumoren eine Rolle spielen, konnte erst mit der Verfügbarkeit von Inzuchtmäusen mit definiert-deletierten Genen untersucht werden. So konnte nun gezeigt werden, dass RAG-2-defiziente (RAG-2^{-/-}) Mäuse [Shinkai et al.,

1992], die keine T- und B-Zellen besitzen, eine stark erhöhte Tumorsuszeptibilität aufwiesen [Shankaran et al., 2001]. Durch die zusätzliche Deletion des STAT1-Gens (STAT1^{-/-}), bzw. des IFN γ -Rezeptors konnte überdies auch die Notwendigkeit von Interferonen (IFN- α , IFN- β und IFN- γ) für eine effektive Kontrolle und Eliminierung entarteter Zellen nachgewiesen werden [Shankaran et al., 2001].

Insgesamt konnte durch diese Experimente die *immunosurveillance*-Theorie von Burnet und Thomas bestätigt werden, welche daraufhin weiter verfeinert wurde [Dunn et al., 2002]. Diese Theorie impliziert weiterhin, dass die Eigenschaft maligner Zellen, der Immunüberwachung zu entgehen (*engl.: immune escape*), eine essentielle Voraussetzung für die Entstehung von Tumoren ist. Die Tumorentstehung ist demnach (auch aufgrund der genetischen Instabilität maligner Zellen) ein evolutionärer Prozess. Im Allgemeinen werden dabei Varianten selektioniert, die eine geringe Immunogenität (*engl.: immune escape*), bzw. eine Resistenz gegenüber der Eliminierung durch das Immunsystem aufweisen, und/oder eine effektive Immunantwort gegenüber malignen Zellen aktiv unterdrücken. Grundsätzlich können Tumoren der Immunüberwachung durch eine verminderte Expression von Tumor-Antigenen und einer erhöhten Resistenz gegenüber zytotoxischen Effektormechanismen des Immunsystems entgehen. So zeigen verschiedene Tumoren eine verminderte Expression von MHC-Molekülen [Travers et al., 1982], bzw. Mutationen in Proteinen, die an der Prozessierung von Peptiden beteiligt sind (zusammengefasst in [Restifo et al., 1993; Marincola et al., 2000]). Dies resultiert in einer Verminderung präsentierter Peptid:MHC-Komplexe. Auch können Interferon- γ -vermittelte Signalwege gestört sein, bzw. anti-apoptotische Moleküle verstärkt exprimiert werden. Zusätzlich zu diesen „tarnenden“ Veränderungen maligner Zellen, sind Tumoren auch in der Lage, aktiv die Immunantwort zu unterdrücken. Dabei können Zell-Zell-vermittelte und somit in unmittelbarer Umgebung wirkende Mechanismen von löslichen Mediatoren unterschieden werden. Beispielsweise inhibiert die Expression von PD-L1 (*engl.: programmed cell death 1 ligand 1*), sowie FasL die T-Zellaktivität bzw. induziert die Apoptose dieser Zellen [Iwai et al., 2002; Dong et al., 2002; Hahne et al., 1996]. Zusätzlich kann eine NK-Zell-vermittelte Lyse durch die Expression von HLA-E oder HLA-G auf den Zellen des Tumors verhindert werden. Gleichzeitig schafft die Expression von löslichen Molekülen wie TGF- β , IL-10, und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ein immunsupprimierendes Milieu [Uyttenhove et al., 2003]. In dieser Umgebung kann die Aktivierung von T-Zellen zu Anergie oder Toleranz gegenüber dem erkannten (Tumor-)Antigen führen. Auch können diese Faktoren in der Induktion von regulatorischen Zellen resultieren, welche ihrerseits wiederum inhibitorisch wirken. Mittlerweile konnten einige dieser supprimierend-agierenden Zellpopulationen des Immunsystems identifiziert und (zumindest teilweise) charakterisiert werden. Darunter finden sich unreife dendritische Zellen (*engl.: immature dendritic cells*, iDC), myeloische Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells*, MDSC), sowie auch regulatorische T-Zellen (Treg), wobei die Interaktion dieser Zellen untereinander, sowie deren inhibitorische Funktionen noch meist unklar sind. Es konnte jedoch mittlerweile die direkte Korrelation von klinischer Prognose mit der Anzahl und Art von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (*engl.: tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) in verschiedenen Studien gezeigt werden. Dabei

zeigte das Verhältnis zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellen den stärksten Einfluss auf die Prognose. Untersucht wurden dabei Brustkrebs- [Ladoire et al., 2008], Lungenkrebs- [Petersen et al., 2006], Leberkrebs- [Gao et al., 2007], sowie Ovarialkarzinom- [Curiel et al., 2004; Sato et al., 2005; Leffers et al., 2009] Patienten (Zusammenfassung in [Senovilla et al., 2012]).

Diese wechselseitigen Beziehungen zwischen Immunsystem und Tumor, einerseits durch Selektion und damit Etablierung schwach-immunogener Varianten, andererseits durch die Etablierung eines immunsuppressiven Milieus, wird mittlerweile mit dem Begriff des *immunoediting* versehen [Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004a; Dunn et al., 2004b; Schreiber et al., 2011].

Zusammengefasst ist demnach eine Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor vorhanden und in etablierten Tumoren zu dessen Gunsten verändert. Die Aufgabe einer erfolgreichen Immuntherapie ist es somit, in diese Beziehung einzugreifen und maligne Zellen als Ziele für immunologische Effektormechanismen zu markieren, bzw. die immunsuppressive Wirkung des Tumors zu brechen.

1.1.2 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Lange Zeit war die Immuntherapie von Tumorerkrankungen durch die größtenteils unspezifische Aktivierung von Immunzellen geprägt. Wurden vor über 100 Jahren noch krude Bakterienlösungen appliziert [Coley, 1910], folgten Ende des 20. Jahrhunderts die ersten klinischen Studien mit verschiedenen Zytokinen. So beschrieben Grimm und Rosenberg im Jahr 1982 Interleukin-2- (IL-2) aktivierte Leukozyten (LAK-Zellen, *engl.: lymphokine-activated killer cells*) und deren Fähigkeit, die Lyse von Tumorzellen *in vitro* zu induzieren [Grimm et al., 1982; Rosenberg et al., 1982]. In den untersuchten Mausmodellen konnten damit zum Teil beachtliche Erfolge erzielt werden [Rosenberg et al., 1985b]. Rosenberg unternahm gleichzeitig Versuche, bei denen Krebspatienten sowohl systemisch hohe Dosen IL-2 appliziert, wie auch autologe *in vitro* aktivierte LAK-Zellen infundiert wurden [Rosenberg et al., 1985a]. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass der menschliche Organismus nur einen Bruchteil der im Mausmodell eingesetzten Dosierungen von IL-2 toleriert. Diese Dosislimitation beeinträchtigte auch die erzielten klinischen Erfolge. Ähnliche Rückschläge wurden auch bei den klinischen Erprobungen anderer Zytokine erlitten. Heute werden Zytokine wie IL-2, IFN, TNF somit klinisch zumeist in niedrigen Dosierungen, bzw. lokal-appliziert eingesetzt. Ausnahmen stellen dabei die Behandlung von metastasierenden Melanomen und Nierenzellkarzinomen dar. Hier ist die (kurzzeitige und wiederholte) Behandlung mit hohen Dosierungen von systemisch-appliziertem IL-2 von der FDA (*engl.: food and drug administration*) seit 1998 zugelassen. Im Falle von metastasierendem Melanom zeigten jedoch nur ca. 16% aller behandelten Patienten ein Ansprechen auf die Behandlung [Atkins et al., 1999].

Gezieltere Ansätze zur Eliminierung maligner Zellen stellen verschiedene Vakzinierungen dar. Anstoß für diese Therapieformen war die Definition und Charakterisierung von Tumorantigenen. Die Assoziation von Antigenen wie dem *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM) [Herlyn et al., 1979], dem *melanoma-associated*

chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP, später auch als CSPG4 bezeichnet) [Harper et al., 1982] oder auch dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) [Gusterson et al., 1985] mit verschiedenen Tumorerkrankungen wurde initial durch die Generierung monoklonaler Antikörper nachgewiesen.

1991 konnte mit MZ2-E (später als *melanoma associated antigen 1*, MAGEA1 bezeichnet) das erste von malignen Zellen exprimierte Antigen identifiziert werden, welches auf HLA-A1-präsentierte Peptide liefert, die wiederum von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können [van der Bruggen P. et al., 1991]. Wie sich später zeigte, wird dieses Protein neben Melanomzellen nur von Zellen des Hodens exprimiert und zählt somit zu den *cancer/testis*-Antigenen. Mittlerweile werden Tumor-Antigene in die Kategorien der Tumor-assoziierten, der *cancer/testis*- und der Tumor-spezifischen Antigene eingeteilt, wobei die Grenzen zwischen den beiden Letzteren verschwimmen. Im Gegensatz zu Tumor-spezifischen Antigenen, die ausschließlich von malignen Zellen (z.B. durch Mutationen der genetischen Sequenz) exprimiert werden, können Tumor-assoziierte Antigene auch auf normalen Zellen nachgewiesen werden, wobei die Expression auf malignen Zellen jedoch in der Regel deutlich stärker ist.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen, sowie vom Wissen über molekulare Grundlagen immunologischer Mechanismen wurden eine Reihe neuer Strategien zur Zerstörung maligner Zellen und Tumoren mit Hilfe des Immunsystems erarbeitet. Die derzeit Wichtigsten werden im Folgenden kurz erläutert.

Aktive Vakzinierung

Als aktive Vakzinierung wird, im Gegensatz zur passiven Vakzinierung durch den Transfer von Antikörpern, die Induktion einer adaptiven Immunantwort durch die Applikation von Tumor-Antigenen bezeichnet. Durch die Einbringung von Tumor-Antigenen fernab der eigentlichen Läsion und unter Verwendung von Adjuvantien soll so eine adaptive Immunantwort induziert werden.

Wurden in frühen klinischen Studien noch Zellysate autologer oder allogener Tumorzellen zur aktiven Vakzinierung appliziert [Sondak und Sosman, 2003], werden heutzutage rekombinant hergestellte Proteine oder synthetische Klasse-I- und Klasse-II-Peptide von Tumor-Antigenen in Kombination mit Adjuvantien eingesetzt. Diese Peptide werden in die Haut appliziert und sollen dort von dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und auf den entsprechenden MHC-Molekülen präsentiert werden. Allerdings ist in diesem Falle anzumerken, dass die Präsentation von Peptiden abhängig vom MHC-Haplotyp des Patienten ist, was die Anwendung eines Therapeutikums auf alle Patienten ausschließt. Durch die Beigabe von Adjuvantien wird eine Aktivierung der DC und somit eine effiziente Kostimulation der Peptid-spezifischen T-Zellen erreicht. Solche Peptid-Cocktails befinden sich derzeit in der klinischen Evaluierung und konnten teilweise schon erste positive Resultate liefern [Walter et al., 2012].

Neben der Injektion von Peptiden kann auch durch die Applikation nackter DNA oder RNA, kodierend für die entsprechenden Tumor-Antigene, eine adaptive Immunantwort induziert werden. Diese Nukleinsäuren werden von Zellen des Patienten aufgenommen und induzieren somit die Expression des Tumor-Antigens in diesen Zellen, was zur Präsentation von Peptiden des Antigens auf MHC-Molekülen und somit zur T-Zell-Aktivierung führen kann. Die Verwendung von mRNA-Molekülen

ermöglicht dabei den Verzicht auf eventuell problematische virale Promotoren. Gleichzeitig weisen mRNA-Moleküle durch die Aktivierung des *toll-like receptor-7* (TLR-7) intrinsische immunstimulatorische Eigenschaften auf. Auch die Strategie der Nukleinsäure-basierten Vakzinierung wird derzeit in klinischen Studien getestet.

Zelltransfer

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (Knochenmarkstransplantation, KMT) wurde ursprünglich entwickelt, um das zerstörte hämatopoetische System von Leukämiepatienten nach hoch-dosierter Chemotherapie zu rekonstituieren. Dabei kann es zu der Ausbildung einer *graft versus leukemia*-Reaktion (GvL) kommen. Dies bezeichnet eine Immunreaktion der Spenderzellen gegen die malignen Zellen des Empfängers. Dieser Effekt wird im Zuge haplo-identischer KMT, wobei die Spender Eltern oder Kinder des Patienten darstellen, ausgenutzt und provoziert. Die Entstehung einer GvL-Reaktion ist jedoch zumeist mit einer *graft versus host*-Reaktion verbunden, welche ihrerseits ein hohes Risiko für den Patienten darstellt.

Die Infusion von Spender-Lymphozyten nach der KMT (*donor lymphocyte infusion*, DLI) kann ebenfalls eine GvL-Reaktion auslösen, bzw. das Fehlen reifer Lymphozyten (auch als Effektoren immuntherapeutischer Ansätze) kompensieren [Luznik und Fuchs, 2002].

Als Alternative zur Vakzinierung mit Peptiden oder Nukleinsäuren können auch Patienten-eigene T-Zellen isoliert werden, welche dann *in vitro* mit den entsprechenden Antigenen aktiviert und expandiert werden. Diese Effektorpopulation wird dann reinfundiert, um eine anti-Tumor-Reaktion auszulösen und zu verstärken.

Aufbauend auf diesem Verfahren wurden CAR- (*chimeric antigen receptor*)-tragende T-Zellen entwickelt. Dabei wird DNA kodierend für einen Membran-ständigen Rezeptor, der aus Tumor-Antigen-spezifischen Domänen eines Antikörpers und T-Zell-stimulierenden Signaldomänen besteht, in die isolierten T-Zellen des Patienten eingebracht, welche anschließend reinfundiert werden. Diese Zellen sind daraufhin in der Lage MHC-unabhängig Tumor-Antigene zu erkennen und darauf mit Proliferation, zytotoxischer Aktivität und der Sekretion von Zytokinen zu reagieren. Diese Art des adaptiven Zelltransfers wird derzeit in klinischen Studien getestet [Porter et al., 2011; Kochenderfer und Rosenberg, 2013].

Immuntherapie mit rekombinanten Antikörpern

Die bisher einzige etablierte Strategie der Immuntherapie von Tumorerkrankungen, mit Ausnahme der KMT und der DLI, stellt die Applikation therapeutischer Antikörper dar. Diese Moleküle, wie z.B. Rituximab und Trastuzumab, haben die Therapie und Prognose einzelner Krebserkrankungen zum Teil signifikant verbessert. Diese Arbeit setzt sich deshalb mit der Generierung, Charakterisierung und Optimierung therapeutischer Antikörper auseinander. Dementsprechend werden die grundlegenden Eigenschaften, sowie der derzeitige Stand der Wissenschaft und der klinischen Applikation im Folgenden genauer erläutert.

1.2 Antikörper

Die Entdeckung und Charakterisierung dieser Proteine begann um 1890 mit Beobachtungen von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato [Behring und Kitasato, 1965]. Diese impften Kaninchen mit abgetöteten *Corynebacterium diphtheria* Kulturen, dem Erreger der Diphtherie. Es wurde gezeigt, dass das von den Bakterien produzierte Toxin durch zellfreies Blutserum der immunisierten Tiere neutralisiert wurde. Weiterhin führte der Transfer von Serum eines immunisierten Kaninchens in mit *C. diphtheria* infizierte Mäuse zu deren Überleben. Diese Arbeit erwies sich als der Grundstein der passiven Immunisierung und gipfelte in der industriellen Herstellung eines Diphtherie-Antiserums durch die Farbwerke Hoechst AG, bzw. später durch die Behringwerke GmbH Bremen und Marburg.

Im Jahr 1891 konnten Guido Tizzoni und Guiseppina Cattani ein globuläres Protein aus Serum extrahieren, welches das Tetanus-Toxin neutralisierte. Sie prägten daraufhin den Begriff des „Antitoxins“. Neun Jahre später veröffentlichte Paul Ehrlich seine Seitenkettentheorie, die zum ersten Mal die Bildung von löslichen „Antikörpern“ zur Neutralisierung von Toxinen postuliert. Ehrlich beschreibt dabei die Bindung zwischen Toxin und Antikörper als spezifisch wie zwischen Schlüssel und Schloss [Ehrlich, 1900].

Während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Antikörper gegen (Glyko-)Proteine, als auch gegen Kohlenhydrate gebildet werden können [Heidelberger und Avery, 1923]. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen beruht, so postulierte John R. Marrack 1934, auf hydrophilen Wechselwirkungen, sowie polaren Bindungen [Marrack, 1934]. Mit den Jahren wurden die Analyse- und Separationsmethoden verfeinert und es gelang Tiselius und Kabat 1938 mittels Elektrophorese das Serum von Kaninchen aufzutrennen und zu analysieren. Dabei zeigte das Serum von naiven Tieren vier Fraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität. Die erste Fraktion bestand aus Albuminen, gefolgt von den Fraktionen der α -, β -, und γ -Globuline. Wurden Kaninchen mit Ovalbumin hyperimmunisiert, so zeigte die elektrophoretische Auftrennung des Serums eine stark vergrößerte γ -Fraktion. Die Ovalbumin-spezifischen Antikörper konnten durch Bindung an das Antigen absorbiert werden, so dass sich ein elektrophoretisches Muster ähnlich dem von naiven Tieren zeigte. Kabat und Tiselius prägten somit den Begriff der „Gammaimmunglobuline“ ($Ig\gamma$) [Tiselius und Kabat, 1938; Tiselius und Kabat, 1939].

Mittels der von Svedberg eingeführten Ultrazentrifugation konnte das Molekulargewicht der Gammaimmunglobuline auf ca. 150 kDa bestimmt werden [Svedberg und Rinde, 1924]. Allerdings konnten Tiselius und Kabat auch in einer anderen Fraktion Antikörper nachweisen. Diese Immunglobuline waren mit einem Molekulargewicht von ca. 900 kDa deutlich größer, als die Antikörper der Gamma-Fraktion. Ihrer Größe nach wurden diese Proteine als Makroimmunglobuline ($Ig\mu$) bezeichnet [Tiselius und Kabat, 1939].

1948 konnte schließlich Astrid Fagraeus die Produktion von Immunglobulinen den (unreifen) Plasmazellen zuordnen, die sie in der Milz von immunisierten Tieren fand [Fagraeus, 1948].

1.2.1 Struktur von Antikörpern

Die Struktur des $Ig\gamma$ -Moleküls wurde unabhängig von zwei Wissenschaftlern aufgeklärt. Rodney Porter arbeitete dabei mit $Ig\gamma$ aus Kaninchen und verschiedenen Enzymen, während Gerald Edelman humane Gammaimmunglobuline mittels chemischer Lösungsmittel und Reagenzien charakterisierte.

Nach dem Verdau von $Ig\gamma$ mittels Papain (in Gegenwart von Cystein) beschrieb Porter drei Fragmente, die alle ein Molekulargewicht von 50 kDa aufwiesen. Er konnte zeigen, dass zwei der Fragmente identisch waren und Antigen binden konnten. Er nannte diese Fragmente „*fragments of antigen-binding*“ oder Fab-Fragmente. Das dritte Fragment kristallisierte während der Lagerung, was ihm den Namen „*fragment crystallizable*“ oder Fc-Fragment einbrachte [PORTER, 1959; PORTER, 1963].

Gleichzeitig beschrieb Edelman die Behandlung von $Ig\gamma$ mittels denaturierender und reduzierender Reagenzien. Dabei erhielt er zwei Untereinheiten, die im gleichen Verhältnis vorlagen, allerdings Molekulargewichte von 25 kDa und 50 kDa aufwiesen. Die Polypeptidketten nannte er demnach leichte und schwere Kette [Edelman und POULIK, 1961; Edelman und Gally, 1962].

Beide veröffentlichten daraufhin ihre Modelle des $Ig\gamma$ -Moleküls [Edelman et al., 1968; PORTER, 1967a; PORTER, 1967b]. Der klassische Antikörper besteht demnach aus 4 Polypeptidketten, wovon jeweils zwei identisch sind. Die beiden schweren Ketten werden über zwei Disulfidbrücken zusammengehalten. Gleichzeitig ist jeweils eine leichte Kette über eine Disulfidbrücke an eine schwere Kette gebunden (Vgl. Abb.1.1). Die schweren und leichten Ketten lassen sich wiederum in Domänen un-

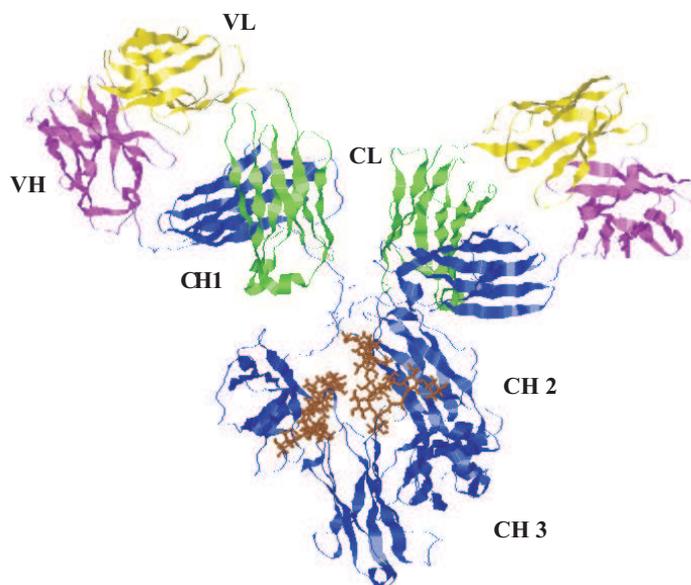


Abbildung 1.1: **Schematische Struktur eines intakten humanen $Ig\gamma 1_{\kappa}$ -Antikörpers.** Darstellung des .

Blau: Konstante Domänen der schweren Ketten; Grün: konstante Domänen der κ -Ketten; Gelb: Variable Domänen der κ -Ketten; Magenta: Variable Domänen der schweren Ketten; Orange: Zuckerreste im Fc-Teil. Modifiziert nach [Harris et al., 1998]

terteilen, die ein gemeinsames Faltungsmotiv aufweisen (Immunoglobulin-Faltung). Dieses Motiv ist charakterisiert durch 2 β -Faltblätter die gegeneinander durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert werden. Jede dieser Domänen besteht dabei aus ungefähr 110 Aminosäuren (Zusammenfassungen in [Williams und Barclay, 1988; Davies et al., 1990]).

1970 veröffentlichen Tai Wu und Elvin Kabat Vergleiche von Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten von Menschen und Mäusen. Demnach ist die schwere Kette eines $Ig\gamma$ -Moleküls aus einer N-terminalen, variablen (V_H) und drei weiteren, relativ konservierten (konstanten; C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) Domänen aufgebaut. Analog besteht die leichte Kette aus einer N-terminalen, variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne [Wu und Kabat, 1970]. Im Fall von $Ig\gamma$ sind die Domänen C_{H1} und C_{H2} über eine flexible *hinge*-Region verbunden.

Innerhalb jeder variablen Domäne konnten Wu und Kabat drei hypervariable Regionen (HV1-3, bzw. *engl.: complementarity determining region, CDR1-3*) bestimmen. Die sie umgebenden Regionen werden analog als *framework*-Regionen (FR1-4) bezeichnet, da sie die Konformation der Domäne bestimmen. So kommen die CDR an der Oberfläche der V-Domänen zum Liegen wo sie die Spezifität eines Antikörpers bestimmen. Die Antigenbindungsstelle (Paratop) bilden die zusammengefügten Domänen V_H und V_L , bzw. die Kombination der entsprechenden CDR.

Die enorme Sequenzvielfalt der variablen Domänen wird auf chromosomaler Ebene durch Kombination verschiedener Gensegmente (V_H : V,D,J; V_L : V,J), die ihrerseits wiederum multiple Kopien aufweisen, bewerkstelligt [Tonegawa et al., 1978; Brack et al., 1978; Kurosawa et al., 1981; Sakano et al., 1981]. Durch die zufällige Zusammenlagerung einzelner Gensegmente und der *de novo* Synthese von Sequenzabschnitten zwischen den verwendeten Segmenten (zusammengefasst in [Grawunder et al., 1998]), sowie der Kombination von V_H und V_L sind theoretisch 10^{11} unterschiedliche Spezifitäten möglich. Weiterhin kommt es während der Affinitätsreifung aktivierter B-Zellen zu Mutationen innerhalb der rekombinierten VDJ-Gene und somit zu einer weiteren Vergrößerung des Spezifitätenrepertoires [McKean et al., 1984].

Ausgehend von der Sequenz ihrer konstanten Domänen können humane Immunglobuline den fünf Isotypen $Ig\mu$, $Ig\delta$, $Ig\gamma$, $Ig\alpha$ und $Ig\epsilon$ zugeordnet werden. Diese unterscheiden sich, neben ihrer Struktur, auch hinsichtlich ihrer Verteilung im Körper. Im Blut finden sich hauptsächlich $Ig\gamma$ - und $Ig\mu$ -Moleküle. Dabei können $Ig\gamma$ -, im Gegensatz zu den pentameren $Ig\mu$ -Molekülen auch durch Diffusion das Blutgefäßsystem verlassen und angrenzendes Gewebe penetrieren. Weiterhin ist die biologische Serumhalbwertszeit der $Ig\gamma$ -Moleküle, verglichen mit den übrigen Isotypen, deutlich höher. Diese Eigenschaften machen den $Ig\gamma$ -Isotyp zum bevorzugten Isotyp therapeutischer Antikörper. Weiterhin weisen $Ig\gamma$ -Moleküle spezielle Wirkmechanismen auf, die im Folgenden erläutert werden.

1.2.2 Wirkmechanismen von Ig γ -Antikörpern

Natürlicherweise haben Antikörper die Aufgabe, den Organismus vor Pathogenen, wie Viren und Bakterien, durch deren Markierung und Neutralisierung, sowie der gleichzeitigen Aktivierung immunologischer Effektorzellen zu schützen. Grundsätzlich lassen sich dabei direkte und indirekte Wirkmechanismen unterscheiden. Diese Wirkungsweisen lassen sich in vielerlei Hinsicht therapeutisch nutzen.

Direkte Mechanismen bezeichnen hierbei die Wirkung des Antikörpers allein durch die Bindung des Antigens, sind damit unabhängig vom Fc-Teil und Isotyp des Antikörpers und können auch durch Antikörperderivate, wie F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente, vermittelt werden. Dabei kann zum einen eine Blockierung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen (durch neutralisierende und antagonistische Antikörper) erfolgen, was z.B. die Stimulation von Zellen durch Wachstumsfaktoren unterbinden kann. Andererseits kann die Bindung von Antikörpern an einen Rezeptor auch agonistisch, also stimulierend, wirken. Dies wird z.B. bei der Aktivierung von Apoptose-vermittelnden Rezeptoren, sowie bei der Aktivierung von Immunzellen durch agonistische Antikörper ausgenutzt.

Im Gegensatz dazu sind indirekte Wirkmechanismen vom Fc-Teil des Antikörpers (und damit vom Isotyp des Antikörpers) abhängig. Diese Fc-Teil-abhängigen Mechanismen beinhalten die Zielzellyse durch den klassischen Weg der Komplementkaskade, sowie die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen durch die Multimerisierung von Fc γ -Rezeptoren auf deren Zelloberflächen. Die Immobilisierung von Antikörpermolekülen auf der Membran der Zielzelle ist dabei essentiell und verhindert, dass Effektormechanismen durch lösliche Antikörper ausgelöst werden.

Die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (*engl.: Complement-dependent cytotoxicity, CDC*) wird von der hochaffinen Bindung des Plasmaproteins C1q an die Fc-Teile (C_H2) mindestens zweier auf der Zielzelloberfläche immobilisierter Ig γ -Moleküle eingeleitet. Die Komplementkaskade mündet schließlich in der Ausbildung des *membrane-attack-complex* (MAC), welcher die Lyse der Zielzelle induziert. Weiterhin werden im Zuge der Komplementaktivierung die Spaltprodukte C3b und (in geringerem Ausmaß) C4b gebildet, welche die Phagozytose der C3b/C4b-markierten Zelle durch Makrophagen und Neutrophile induzieren. Dieser Vorgang wird auch als Komplement-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (*engl.: Complement-dependent cellular cytotoxicity, CDCC*) bezeichnet.

Für die Rekrutierung und Aktivierung immunologischer Effektorzellen ist die Interaktion von Ig γ -Fc-Teil mit Ig γ -spezifischen Fc-Rezeptoren (Fc γ R) Voraussetzung. Diese werden von allen hämatopoetischen Zellen (mit Ausnahme der $\alpha\beta$ -T-Zellen) exprimiert. Die Familie der Fc γ -Rezeptoren vereint dabei drei aktivierende (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIII) Moleküle und ein inhibierendes (Fc γ RIIB, wovon zwei *splice*-Varianten bekannt sind) Molekül. Eine Übersicht über die Familie der Fc γ -Rezeptoren ist in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

Tabelle 1.1: **Charakteristika der humanen Fc γ R-Klassen.** Zusammengestellt aus [Hogarth und Pietersz, 2012; Sigal, 2007]ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motive*ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motive**a*: in NK-Zellen assoziiert FcRIIIa mit der CD3- ζ -Kette, wohingegen in den übrigen Zellen FcRIIIa mit der *common* γ -Kette assoziiert.*b*: GPI: Glykosyl-phosphatidylinositol-Anker, kein ITAM/ITIM vorhandenNK, NK-Zellen; M ϕ , Makrophagen; MO, Monozyten; DC, dendritische Zellen; Neu, Neutrophile; Eo, Eosinophile; Baso, Basophile; Thromb, Thrombozyten; B, B-Zellen.

-: keine Expression

+: schwache Expression

++: mittlere Expression

+++ : starke Expression

?: unklar

c: H¹³¹ weist eine höhere Affinität für Ig γ 2 und Ig γ 3 auf, als R¹³¹*d*: V¹⁵⁸ weist eine höhere Affinität für Ig γ 1 und Ig γ 3 auf als F¹⁵⁸*e*: zwei Allele sind bekannt, die als *Neutrophil-specific antigen* NA1 und NA2 bezeichnet werden

| | FcγRI (CD64) | FcγRIIa (CD32) | FcγRIIb (CD32) | FcγRIIc (CD32) | FcγRIIIa (CD16) | FcγRIIIb (CD16) |
|---|--|--|--|---|---|--|
| Signal | γ ITAM | α ITAM | α ITIM | α ITAM | γ ITAM bzw. CD3- ζ ITAM ^a | GPI ^b |
| Igγ- Affinität | hoch (Monomere) 1. Ig γ 1 = Ig γ 3 2. Ig γ 4 3. Ig γ 2 | niedrig (Multimere) 1. Ig γ 1 2. Ig γ 2 = Ig γ 3 3. Ig γ 4 | niedrig (Multimere) 1. Ig γ 1 2. Ig γ 2 = Ig γ 3 3. Ig γ 4 | medium (Multimere) | niedrig (Multimere) 1. Ig γ 1 = Ig γ 3 ^b | niedrig (Multimere) 1. Ig γ 1 = Ig γ 3 |
| Expression | | | | | | |
| NK | - | - | - | + | ++ | - |
| M ϕ | + | +++ | ++ | ? | + | - |
| MO | + | +++ | + | ? | ++ | - |
| DC | ++ | ++ | ++ | - | ++ | - |
| Neu | + | +++ | + | ? | - | ++ |
| Eo | + | +++ | + | - | - | ? |
| Baso | - | ++ | ++ | - | - | + |
| Thromb | - | +++ | - | - | - | - |
| B | - | - | ++ | - | - | - |
| Allele | | R/H ¹³¹ ^c | I/T ²³² | | V/F ¹⁵⁸ ^d | NA1/NA2 ^e |

Grundsätzlich zeigen hämatopoetische Zellen eine Koexpression aktivierender und inhibierender Rezeptoren, die zusammen die zellulären Reaktionen regulieren. Einzig B-Zellen (welche nur den inhibierenden Fc γ RIIB tragen) und NK-Zellen bilden eine Ausnahme. NK-Zellen exprimieren dabei nur aktivierende Fc γ R, in Form von Fc γ RIIIA (sowie in ca. 30% aller Menschen auch Fc γ RIIc). Dementsprechend gelten diese Zellen mittlerweile als die wichtigsten Effektorzellen bei der Antikörpervermittelten Lyse von Zielzellen (*engl.: Antibody-dependent cellular cytotoxicity*,

ADCC). Die Bindung von immobilisierten Ig γ -Molekülen und die darauffolgende Multimerisierung von Fc γ RIIIA führt zur Aktivierung der NK-Zelle. Diese induziert durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen die Lyse der Zielzelle. Lange Zeit galten NK-Zellen als die einzigen effizienten Effektorzellen der ADCC. Allerdings wird mittlerweile angenommen, dass auch andere Fc γ R-tragende Zellpopulationen in direkter oder indirekter Form an der Antikörper-vermittelten Lyse Ig γ -markierter Zielzellen beteiligt sind. So konnte die Expression von Fc γ RIIIA auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden [Lafont et al., 2001]. Auch wurde die Fähigkeit dieser Zellen, ADCC zu vermitteln, *in vitro* belegt [Chen und Freedman, 2008]. *In vitro* konnte weiterhin die Antikörper-vermittelte Phagozytose (*engl.: antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP*) Ig γ 1-opsonierter Zielzellen durch Makrophagen nachgewiesen werden. Hier werden die Antikörper-vermittelten Effekte jedoch über den Rezeptor Fc γ RIIA induziert. Im Zusammenhang mit Antikörper-vermittelter Phagozytose wird ebenfalls über eine (indirekte) Induktion des adaptiven Immunsystems durch die Präsentation von Antigenen Ig γ -opsonierter Zielzellen durch Fc γ R-tragender Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen diskutiert. Die Rolle der Population der Granulozyten (insbesondere der Neutrophilen) im Hinblick auf Ig γ -vermittelte Effekte ist derzeit noch unklar. Zumindest im Mausmodell scheint die Population der Neutrophilen entscheidend an der Antitumor-Aktivität therapeutischer Antikörper beteiligt zu sein, wie Depletionsexperimente zeigen konnten [Hernandez-Ilizaliturri et al., 2003; Siders et al., 2010].

1.3 Therapeutische Ig γ -Antikörper

Die erstmalige Generierung immortalisierter Hybridome, welche Antikörper einer definierten Spezifität sekretieren, durch Köhler und Milstein [Köhler und Milstein, 1975] legte den Grundstein für die Produktion und somit auch die klinische Anwendung dieser Moleküle. Die damals entwickelte Methodik wird bis heute angewendet. Dabei werden Antikörper-sekretierende B-Zellen von zuvor mit dem entsprechenden Antigen immunisierten Tieren mit Zellen einer immortalisierten Linie fusioniert. Die daraus entstehenden Hybridome werden zu Zelllinien, welche ihrerseits nun ebenfalls unbegrenzte Teilungsfähigkeit aufweisen und weiterhin monoklonale Antikörper sekretieren.

Die erste Generation klinisch eingesetzter monoklonaler Antikörper bestand aus Ig γ -Molekülen der Maus (z.B. MAb17-1A, bzw. Edrecolomab). Begründet durch die schwache Affinität humaner Fc-Rezeptoren gegenüber diesen murinen Molekülen war die Wirksamkeit jedoch meist unbefriedigend. Auch konnte oftmals die Bildung von Human- α -Maus-Antikörpern (HAMA) nachgewiesen werden [Sears et al., 1982], welche die Wirksamkeit von Maus-Antikörpern im humanen Organismus teilweise weiter beeinträchtigten [Schulz et al., 1988].

Therapeutische Antikörper der zweiten Generation zeichnen sich durch eine verminderte Immunogenität, sowie eine gesteigerte Wirksamkeit aus. Erreicht wurde dies durch den Ersatz von Maus- durch die entsprechenden humanen Sequenzen. Dabei wurden im Zuge der Chimärisierung von Antikörpern die variablen Domänen (V_H / V_L) eines Maus-Antikörpers auf einen humanen Fc-Teil kloniert

[Neuberger et al., 1985]. Die Immunogenität dieses Moleküls beschränkt sich somit auf die beiden variablen Domänen. Gleichzeitig erlaubt der humane Fc-Teil die effizientere Vermittlung Fc-abhängiger Wirkmechanismen, verglichen mit dem Maus-Ig γ 2a-Molekül.

Eine weitere Methode der Humanisierung besteht im Transfer der CDR-Regionen des Maus-Antikörpers in das Gerüst (*framework regions*) einer humanen V-Domäne [Jones et al., 1986]. Somit wird die höchste Reduktion des immunogenen Potentials eines Maus-Antikörpers erreicht. Allerdings kann es im Zuge dieser Modifikation zum Verlust von Bindungsaffinität des Antikörpers durch Veränderung der Struktur kommen.

Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie erlauben mittlerweile auch die Generierung vollhumaner Antikörper sowohl *in vitro* unter Verwendung der *phage display*-Methodik, als auch *in vivo* in transgenen Mäusen. Im Zuge des *phage display* können in zuvor angelegten, großen Bibliotheken humaner V_H- und V_L-Sequenzen bindende Moleküle identifiziert und gleichzeitig die kodierenden DNA-Sequenzen isoliert werden [Marks et al., 1991]. Diese Methodik umgeht damit die Immunisierung von Tieren und demnach auch die natürliche Affinitätsreifung von Immunglobulinen. Als Alternative kann die Verwendung transgener Mäuse erfolgen, in welchen die für schwere und leichte Ketten kodierenden Loci gegen die humanen Homologe ausgetauscht wurden. Immunisierungen solcher Mäuse resultieren in der Generierung und Produktion voll-humaner Antikörper [Green et al., 1994].

Die meisten der gegenwärtig etablierten therapeutischen Antikörper stellen Vertreter dieser zweiten Generation dar.

Die Bedeutung der Interaktion von Fc-Teilen therapeutischer Antikörper mit Fc γ -Rezeptoren wurde durch Versuche in Fc γ R-*knockout*-Mäusen nachgewiesen [Clynes et al., 2000]. Hierbei zeigte sich die Abhängigkeit der Wirksamkeit der Antikörper Rituximab (Rituxan[®], bzw. MabThera[®]) und Trastuzumab (Herceptin[®]) gegenüber CD20⁺- bzw. Her2⁺- Tumorzelllinien von der Expression aktivierender Fc γ R. Gleichzeitig konnte durch die Deletion des inhibitorischen Rezeptors Fc γ RIIB dessen negativer Effekt auf die Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse gezeigt werden. Weitere Studien im Mausmodell legten nahe, dass hier Fc γ R-vermittelte zelluläre Reaktionen größeren Einfluss auf die effiziente Antikörper-vermittelte Eliminierung von Tumorzellen haben, als das Komplementsystem [Uchida et al., 2004].

Weitere Hinweise auf die Relevanz Fc γ R-vermittelter Effekte therapeutischer Antikörper im humanen Organismus lieferte erstmals eine Studie im Jahr 2002 durch die Korrelation der klinischen Effizienz von Rituximab mit dem Genotyp des polymorphen Fc γ RIIIA-Rezeptors des Patienten [Cartron et al., 2002]. Der Polymorphismus entscheidet dabei über einen hochaffinen (V¹⁵⁸) oder einen niedrigaffinen (F¹⁵⁸) Rezeptor [Koene et al., 1997]. Unter Rituxan[®]-Behandlung konnte den V¹⁵⁸/V¹⁵⁸ homozygoten Patienten, welche an Non-Hodgkin-Lymphomen erkrankt waren, ein signifikant erhöhter Therapieerfolg zugeordnet werden.

Später konnte ein solcher Zusammenhang auch zwischen Fc γ RIIIA-Allotyp und Erfolg unter Herceptin[®]-Therapie bei Patienten mit metastasierendem Brustkrebs [Musolino et al., 2008], sowie unter Erbitux[®]-Behandlung bei Patienten mit meta-

stasierendem kolorektalem Karzinom gezeigt werden [Calemma et al., 2012]. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht unumstritten. So konnte in weiteren Studien kein signifikanter Zusammenhang zwischen klinisch erfolgreicher Therapie und dem Fc γ RIIIA-Genotyp von Patienten unter Rituxan[®]- [Ghesquieres et al., 2012] oder unter Herceptin[®]- [Hurvitz et al., 2012] Behandlung festgestellt werden. Eine Zusammenfassung dieser Studien ist in [Mellor et al., 2013] zu finden.

1.3.1 Fc-optimierte Ig γ -Antikörper der dritten Generation

Die dritte Generation therapeutischer Antikörper zeichnet sich durch die gezielte Verbesserung der (Effektor-)Eigenschaften dieser Moleküle aus. Dabei wurden sowohl modifizierte Varianten des natürlichen Ig γ 1-Antikörpers, als auch neuartige Molekülformate (ausgehend von Ig γ 1) generiert. Aus Arbeiten zur Ig γ -Fc γ R-Interaktion [Duncan et al., 1988; Sarmay et al., 1992; Redpath et al., 1998; Shields et al., 2001] entwickelten sich zwei unterschiedliche Strategien zur Optimierung der Effektorfunktionen therapeutischer Ig γ -Antikörper.

Der Ansatz der Glykooptimierung von Ig γ 1-Antikörpern bezieht sich dabei auf Studien aus dem Jahr 1995 [Lifely et al., 1995], die erstmals einen Zusammenhang zwischen Glykosylierung des Fc-Teils (an Asparagin 297) des Antikörpers Alemtuzumab und dessen biologischer Aktivität aufzeigte. Dieser Effekt konnte daraufhin dem Fehlen von Fucose im Zuckerkomplex des Fc-Teils zugeordnet werden und erhöhte die Affinität des Fc-Teils zum Fc γ RIIIA um das zeh- bis fünfzig-fache [Shields et al., 2002]. Fucose-defiziente Antikörper zeigten dabei ebenfalls eine leicht-erhöhte Affinität zu Fc γ RIIB.

Die Konsequenz dieser Entwicklung ist die derzeitige klinische Testung des Fucose-defizienten α CD20-Antikörpers GA101 (Roche). Die bisher verfügbaren Ergebnisse zeigen dabei eine deutliche Überlegenheit von GA101 gegenüber seinem Vorgänger, einem chimären Antikörper der zweiten Generation, MabThera[®] (Rituximab).

Die gezielte Mutation der Aminosäuresequenz von Ig γ -Molekülen stellt die zweite Strategie zur Generierung von Varianten des Ig γ 1-Moleküls mit erhöhter Affinität zu Fc γ -Rezeptoren. Grundlage für diesen Ansatz war die Lokalisierung und Identifizierung der an Ig γ 1-Fc γ R-Interaktionen beteiligten Aminosäuren innerhalb des Fc-Teils [Shields et al., 2001]. Die bis dato potentesten Varianten eines Ig γ 1-Moleküls wurden 2006 von der Firma Xencor sowie 2007 durch die Firma Macrogenics generiert.

Im Fall der Xencor-Optimierungen wurden *in silico* die zu mutierenden Aminosäuren bestimmt und daraufhin Varianten mit einer bis drei Mutationen innerhalb des Fc-Teils generiert. Die so identifizierte S239D/I332E-Varianten der Antikörper Alemtuzumab (α CD52), Trastuzumab (α Her2) und Rituximab (α CD20) zeigten eine deutlich gesteigerte Affinität zu Fc γ RIIIA und Fc γ RIIA, sowie eine erhöhte Affinität zum inhibitorischen Fc γ RIIB. Gleichwohl zeigten diese SDIE-Varianten *in vitro* eine um bis zu 100-fach erhöhte Potenz in der Vermittlung von ADCC und ADCP. Die gesteigerte Wirksamkeit der SDIE-Variante von Rituximab war ebenfalls in einem *in vivo*-Modell (B-Zell-Depletion in *Macaca fascicularis*) nachweisbar [Lazar et al., 2006].

Die durch Macrogenics definierten Mutationen (F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L) des humanen Ig γ 1-Fc-Teils wurden aus einer Bibliothek von ca. 10^7 Varianten durch Hochdurchsatzanalysen identifiziert. Diese Fc-Variante zeigte deutlich gesteigerte Affinitäten gegenüber Fc γ RIIIA, sowie Fc γ RIIA, wohingegen die Bindung von Fc γ RI und dem inhibitorischen Fc γ RIIB fast unverändert blieb. Auch hier konnte eine deutlich gesteigerte ADCC-Aktivität *in vitro*, sowie in einem Xenograft-Mausmodell (Daudi-Zellen in BALB/c-Mäusen) nachgewiesen werden [Stavenhagen et al., 2007]

Mittlerweile haben monoklonale Antikörper dieser dritten Generation (u.a. gerichtet gegen CD19, CD20, CD30, Her2) die Phase der klinischen Studien erreicht. Zwar liegen bisher noch keine Ergebnisse dieser Studien vor, doch lassen die präklinischen Daten auf eine verbesserte therapeutische Aktivität hoffen. Die Fc-optimierten Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM, welche das mit myeloischen Leukämien assoziierte Antigen FLT3 binden, stellen weitere Vertreter dieser Generation therapeutischer Antikörper dar, die die oben beschriebenen Xencor-Modifikationen tragen.

1.3.2 Die FLT3-spezifischen Fc-optimierten Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM

Akute myeloische Leukämien

Mit dem Begriff „Leukämie“ (griechisch: weißes Blut) werden Krebsformen des blutbildenden Systems bezeichnet. Sie zeichnen sich durch die Entartung nicht vollständig differenzierter hämatopoetischer Zellen aus. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Blasten im Knochenmark und im Blut, was mit der Unterdrückung der normalen Hämatopoese und somit Leukozytose, Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie einhergeht.

In Deutschland erkranken jährlich ca. 9.200 Menschen an Leukämie, die Hälfte davon an einer akuten Form, also AML (akute myeloische Leukämie) oder ALL (akute lymphatische Leukämie).

Das mittlere Erkrankungsalter für AML liegt bei 67 Lebensjahren, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen (Verhältnis 3:2). Die Anzahl der Neuerkrankungen beträgt für die ALL 1,4, für die AML 3,8 pro 100.000 [www.dgho.de/cmsdata/file/file 136.pdf].

Zunehmend treten akute Leukämien auch als therapie-assoziierte Leukämie (t-AML), nach erfolgreicher Therapie anderer maligner Erkrankungen auf. Des Weiteren entwickelt sich ein Teil der AML sekundär aus einem myelodysplastischen Syndrom als Sekundärleukämie (s-AML).

Diagnostik und Klassifizierung Seit 1976 werden AML-Erkrankungen anhand des *French-American-British*-(FAB)-Systems kategorisiert [Bennett et al., 1976]. Die Einordnung erfolgt hierbei unter Berücksichtigung des Differenzierungsstadiums der malignen Zellen in acht Gruppen.

Tabelle 1.2: **FAB-Klassifizierung der AML** [Bennett et al., 1976]

| FAB-Subtyp | Bezeichnung |
|------------|--|
| M0 | AML mit minimaler Differenzierung |
| M1 | AML ohne Ausreifung |
| M2 | AML mit granulozytärer Ausreifung |
| M3 | Akute promyelozyten Leukämie (APL) |
| M4 | Akute myelomonozytäre Leukämie |
| M4eo | Myelomonozytäre Leukämie mit Knochenmarks-Eosinophilie |
| M5a | Akute Monoblasten-Leukämie |
| M5b | Akute Monozyten-Leukämie |
| M6 | Akute Erythroleukämie |
| M7 | Akute Megakaryoblasten-Leukämie |

Das FAB-Klassifizierungssystem wurde mittlerweile offiziell von der WHO-Klassifizierung abgelöst, wird allerdings weiterhin verwendet.

Die WHO-Klassifizierung integriert zusätzlich zur Morphologie Informationen über Zytologie, Immunphänotyp und genetische Aberrationen der Blasten [Vardiman et al., 2002]. So sollen bessere klinische und prognostisch relevante Aussagen möglich sein. Die WHO-Klassifikation wurde zuletzt 2008 aktualisiert, wobei nun weitere definierte Mutationen als Klassifizierungsmerkmal aufgenommen wurden [Vardiman et al., 2009]. Im Zuge dieser Revision wurde weiterhin empfohlen, den Mutationsstatus des Gens *FLT3* als zusätzlichen prognostischen Marker zu analysieren [Vardiman et al., 2009].

FLT3 (CD135)

Das *FLT3*-Gen kodiert für ein 993 Aminosäuren langes Protein, welches nach posttranslationaler Glykosylierung ein Molekulargewicht von 140 - 160 kDa aufweist. FLT3 (*engl.: fms-like tyrosine kinase 3*; auch als CD135 bezeichnet) wird zur PDGF-Rezeptor-Familie, die oftmals auch als Familie der Klasse III Rezeptor-tyrosinkinase (RTK) bezeichnet wird, gezählt. Weitere Mitglieder dieser Familie sind c-KIT, c-FMS, PDGFR- α und β [Rosnet et al., 1991; Agnes et al., 1994], welche alle durch einen aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebauten extrazellulären Teil, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, die durch einen flexiblen Polypeptidlinker unterbrochen wird, definiert sind [Rosnet und Birnbaum, 1993].

Die Aktivierung dieser membranständigen Rezeptoren wird durch die Rezeptordimerisierung, induziert durch die Bindung des entsprechenden Liganden, eingeleitet. Der Ligand von FLT3 (FLT3-Ligand, FLT3L) [Lyman et al., 1994] ist ein Zytokin der Erythropoetinfamilie, die strukturell durch ein aus zwei Helices bestehendem Bündel charakterisiert ist. FLT3L kommt als Homodimer sowohl in einer membran-gebundenen, als auch in einer löslichen Form vor. Die löslichen Formen entstehen dabei sowohl durch proteolytische Aktivität, als auch durch *splice*-Varianten.

Die Bindung von FLT3L an zwei FLT3-Moleküle induziert die räumliche Annäherung zweier intrazellulärer Kinase-Domänen, was die *trans*-Phosphorylierung wichtiger Tyrosine in der Membran-nahen intrazellulären Domäne erlaubt. Die sich daraus ergebende Konformationsänderung ermöglicht die *trans*-Phosphorylierung weiterer Tyrosine, welche ihrerseits dann als Bindungs- und Aktivierungsstellen von *Src-homology 2*-(SH2)-Domänen tragenden Signaltransduktoren fungieren. Im Fall von FLT3 konnten *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K), *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) [Rottapel et al., 1994], Grb10 [Kazi und Ronnstrand, 2012], und *Phospholipase C γ* PLC γ [Dasil et al., 1993] als Signaltransduktoren identifiziert werden. Die genauen, durch FLT3-Aktivierung induzierten Signaltransduktionskaskaden sind jedoch noch unklar.

FLT3L-kodierende mRNA wird von vielen verschiedenen Geweben im humanen Organismus exprimiert [Lyman und Jacobsen, 1998]. Demgegenüber ist die Expression von FLT3 im humanen System auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen beschränkt [Lyman und Jacobsen, 1998]. Nachgewiesen wurde eine schwache Expression auf CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellen [Kikushige et al., 2008], auf myeloischen Vorläuferzellen (*engl.: common myeloid progenitor, CMP*) [Gabbianelli et al., 1995; Hjertson et al., 1996; Rosnet et al., 1996; Kikushige et al., 2008], sowie eine Expression auf lymphoiden Vorläuferzellen (*engl.: common lymphoid progenitor, CLP*) [Gabbianelli et al., 1995; Hjertson et al., 1996; Rosnet et al., 1996; Kikushige et al., 2008]. Im Falle der myeloischen Vorläufer können weiterhin FLT3⁺ GMP- (*granulocyte/macrophage progenitor*) Zellen von FLT3⁻ MEP- (*megakaryocyte/erythrocyte progenitor*) Zellen unterschieden werden [Ratajczak et al., 1995; Ratajczak et al., 1996; Kikushige et al., 2008].

FLT3-vermittelte Signale induzieren die Proliferation und Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen, wobei diese Signale (zumindest *in vitro*) stark von anderen Wachstumsfaktoren, wie IL-3, c-KIT-Ligand, *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *colony stimulating factor 1* (CSF-1) und *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) abhängig sind [Lyman, 1995; Rusten et al., 1996; Lyman und Jacobsen, 1998].

Experimente im Mausmodell zeigen weiterhin die Abhängigkeit der Hämatopoese von FLT3 [McKenna et al., 2000], wobei hier die restringiertere Expression von FLT3 [Kikushige et al., 2008] berücksichtigt werden muss.

Weiterhin konnte ein direkter Einfluss von FLT3L auf die Generierung bzw. Differenzierung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen gezeigt werden [Maraskovsky et al., 1996; Arrighi et al., 1999].

FLT3 und AML 70-100% der untersuchten AML-Fälle zeigen eine Expression von FLT3 auf der Oberfläche der malignen Zellen [Birg et al., 1992; Carow et al., 1995; Rosnet et al., 1996; Drexler, 1996]. Dabei konnte neben der Expression von wildtypischem FLT3 auch mutierte Formen dokumentiert werden. Diese Mutationen von FLT3 können in zwei Kategorien eingeteilt werden:

- i) Mutationen in der intrazellulären, Membran-nahen Domäne
- ii) Punktmutationen in der Kinase-Domäne

In der Membran-nahen Domäne kommt es zu sogenannten internen Tandem-Duplikationen (FLT3-ITD), wobei die Länge der Domäne verändert wird, ohne das Leseraster zu zerstören. Die Länge dieser Duplikationen variiert dabei zwischen 1 und 130 Aminosäuren [Schnittger et al., 2002]. Die so verlängerte Domäne ist nicht mehr in der Lage, die inaktive Form des Rezeptors aufrechtzuerhalten, was die autonome *Trans*-Phosphorylierung ohne Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung ermöglicht, wobei die Länge der Mutation keine Rolle spielt [Levis und Small, 2003]. Diese Mutationen korrelieren mit einem schlechteren Gesamtüberleben der betroffenen Patienten [Sallmyr et al., 2008; Gaidzik und Dohner, 2008] und können in ca. 17-26% aller AML-Erkrankungen nachgewiesen werden [Kottaridis et al., 2001; Thiede et al., 2002; Moreno et al., 2003].

Punktmutationen der Kinase-Domäne (FLT3-TKD) betreffen hauptsächlich die Aminosäure an Position 835 (Aspartat, D₈₃₅), welche in der Familie der RTK hochgradig konserviert ist. Mutationen dieser Position resultieren ebenfalls in einer Ligand-unabhängigen Aktivierung von FLT3 und können in ca. 5-7% aller AML-Erkrankungen nachgewiesen werden [Moreno et al., 2003; Bacher et al., 2008], wobei diese Art der aktivierenden FLT3-Mutationen das Gesamtüberleben der Patienten nicht negativ beeinflusst [Frohling et al., 2002; Thiede et al., 2002; Bacher et al., 2008], was qualitativ unterschiedliche Signale der konstitutiv-aktivierten FLT3-Moleküle nahelegt. Damit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass FLT3-ITD, aber nicht FLT3-TKD oder wtFLT3 eine aberrante Aktivierung von STAT5 induziert [Choudhary et al., 2005; Leischner et al., 2012].

Derzeitige Therapie der AML

Die Therapie akuter Leukämien ist in mehrere Phasen untergliedert, wobei Induktions- und Postremissionstherapie unterschieden werden.

Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission. Als komplette Remission wird definiert, dass im peripheren Blut keine und im Knochenmark weniger als 5% Blasten nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollen die Zahlen der Neutrophilen über 1000/ μ l, der Thrombozyten über 100.000/ μ l im peripheren Blut liegen [Cheson et al., 2003].

Während der Standardinduktionstherapie werden die Patienten mit einer Zytostatikakombination, bestehend aus Cytarabin und Anthrazyklin, behandelt. In 65-75% der Patienten unter 60 Jahren kann damit eine komplette Remission erreicht werden [Tallman, 2005].

Die Postremissionstherapie soll eine weitere Verbesserung des Therapieerfolgs der Induktionstherapie erreichen und gleichzeitig die minimale residuale Erkrankung (*engl.: minimal residual disease, MRD*), d.h. mikroskopisch nicht mehr erkennbare Leukämiezellen, eliminieren. Die Basis dieser Postremissionstherapie bilden wiederholte Therapiezyklen mit hoch-dosiertem Cytarabin [Mayer et al., 1994]. Innerhalb der Konsolidierungstherapie nach der ersten Remission kann bei Patienten mit hohem Rückfallrisiko eine Stammzelltransplantation (autolog oder allogene) erfolgen. In den übrigen Patienten wird die Stammzelltransplantation nur im Falle eines Wiederauftretens der Krankheit (Rezidiv), sowie einer erneuten Remission durchgeführt.

Die optimierten α FLT3-Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM

Ausgehend von den Hybridomen 4G8 und BV10 (Dr.rer.nat. Hans-Jörg Bühring, Universitätsklinikum Tübingen), welche beide FLT3-spezifische Antikörper (Maus-Ig γ 1/ κ) produzieren, wurden die chimärisierten bzw. Fc-optimierten Antikörper χ 4G8 und 4G8SDIEM [Hofmann, 2009], sowie χ BV10 und BV10SDIEM (Dr.rer.nat. Elwira Pyz, Universität Tübingen) generiert. Es handelt sich dabei um chimäre Antikörper des humanen Isotyps Ig γ 1 κ . Im Falle der SDIEM-Varianten wurden innerhalb des Fc-Teils die durch die Firma Xencor definierten Mutationen S239D und I332E eingeführt. Zusätzlich tragen diese Moleküle eine Peptidsequenz des Proteins c-myc (*myc-tag*) am C-terminalen Ende.

In der dieser Dissertation vorangehenden Diplomarbeit wurde eine initiale Charakterisierung des FLT3-Antigens im Kontext der akuten myeloischen Leukämie unternommen. Gleichzeitig konnte eine drastische Steigerung der ADCC-Vermittlung durch 4G8SDIEM, verglichen mit χ 4G8, unter Verwendung leukämischer Zelllinien nachgewiesen werden [Hofmann, 2009].

1.3.3 Fc γ R-Aktivierung durch bispezifische Antikörper

Die gezielte und selektive Aktivierung immunstimulatorischer Rezeptoren (und somit bestimmter Effektorzellpopulationen) durch therapeutische Antikörper ist eine der zentralen Voraussetzungen für die Steigerung der Effektivität dieser Moleküle. Als Alternativen zum natürlichen Ig γ 1-Format wurde schon in den frühen 1980er-Jahren das Konzept bispezifischer Antikörper entwickelt. Prinzipiell handelt es sich dabei um ein Antikörpermolekül, welches in der Lage ist, zwei unterschiedliche Zielantigene simultan und spezifisch zu binden. Durch die Kombination von Spezifitäten für Tumor(-assoziierte) Antigene und immunstimulatorische Rezeptoren kann dabei die tumorspezifische Aktivierung von Effektorzellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen, erreicht werden. Im Gegensatz zur Fc-Optimierung von Ig γ -Antikörpern kann dabei die unerwünschte Bindung an inhibitorische Rezeptoren völlig unterbunden werden. Weiterhin können die durch bispezifische Moleküle aktivierten Effektorzellen durch die Verwendung entsprechender Antikörperfragmente fast beliebig selektiert werden. So konnte bereits erfolgreich die Zielzell-restringierte Aktivierung von T-Zellen (über CD3 oder den T-Zell-Rezeptor, sowie CD28) [Perez et al., 1985; Jung et al., 1986; Grosse-Hovest et al., 2003], NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen (über CD16) [Glennie et al., 1987] und von neutrophilen Granulozyten (über Fc α RI [Valerius et al., 1997; Stockmeyer et al., 2000] und über Fc γ RI [Ball et al., 1992]) nachgewiesen werden. Die ersten immunstimulatorischen bispezifischen Antikörper waren chemisch-hergestellte Heterokonjugate unterschiedlicher Antikörper. Mit diesen Molekülen konnte erstmals die Antikörper-vermittelte und somit zielgerichtete, MHC-unabhängige Lyse von Zielzellen durch Maus-T-Zelllinien [Staerz et al., 1985], als auch durch prästimulierte humane T-Zellen [Jung et al., 1986] gezeigt werden. Jedoch waren diese Konjugate wegen ihrer Größe und Heterogenität nicht zur klinischen Applikation geeignet.

Eine weitere Strategie zur Generierung bispezifischer Antikörper war die Fusion zweier Hybridomlinien, welche daraufhin neben den ursprünglichen Antikörpern

auch Hybridmoleküle beider Spezifitäten sezernieren [Staerz und Bevan, 1986]. Die bisher einzigen in klinischen Studien getesteten bispezifischen Moleküle, welche die Tumorzelllyse über die Aktivierung des Fc γ RIII induzierten, wurden auf diese Weise generiert [Weiner et al., 1995; Hartmann et al., 1997]. Die Applikation dieser murinen Moleküle führte jedoch in den meisten Patienten zur Bildung neutralisierender Antikörper (*human anti-mouse antibodies*, HAMA), was ihre Wirksamkeit beeinträchtigte. Weiterhin stellt die heterogene Expression von „normalen“ Ig γ - und Hybrid-Molekülen durch die Hybrid-Hybridome Probleme im Zusammenhang mit der Reinheit und Homogenität bispezifischer therapeutischer Moleküle dar.

Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie ermöglichten im Folgenden die Generierung und verbesserte Produktion bispezifischer Antikörpermoleküle. Gleichzeitig konnte so die Größe der Moleküle und damit auch das immunogene Potential verringert werden. Grundvoraussetzung war dabei die Etablierung der *single-chain* F_V-Domäne (scF_V), welche die über einen Peptid-*Linker* verknüpften V_H- und V_L-Domänen eines Antikörpers innerhalb einer Polypeptidkette vereint [Bird et al., 1988]. Durch die Kombination zweier oder auch mehrerer scF_V-Domänen können so bi- oder auch multi-spezifische Moleküle generiert werden. Solche Moleküle werden, je nach Anordnung der einzelnen Domänen als *bispecific scF_V* (bscF_V; alle Domänen innerhalb einer Polypeptidkette exprimiert), bzw. *bispecific Diabody* (bsDiabody; Heterodimer aus zwei Polypeptidketten) bezeichnet. Wie schon zuvor im Zusammenhang mit therapeutischen Ig γ -Molekülen erwähnt, kann die Immunogenität dieser Antikörperfragmente durch Humanisierung der kodierenden Sequenzen drastisch verringert werden.

Diese bispezifischen Proteine (bscF_V, bsDiabody) weisen ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa auf. Demzufolge und auch aufgrund der fehlenden Interaktion mit dem neonatalen Fc-Rezeptor, ist die Serumhalbwertszeit dieser Moleküle äußerst kurz und liegt im Bereich weniger Stunden. Weitere Probleme dieser Formate sind außerdem die geringe Produktivität in der Zellkultur, die schwierige Aufreinigung, sowie die Tendenz dieser Moleküle zur Aggregation.

Als Lösungsansatz dieser Problematik werden mittlerweile bispezifische Antikörperformate, welche sich an der Struktur des humanen Ig γ -Moleküls orientieren, bzw. dessen Fc-Teil beinhalten, entwickelt und getestet. Eine Übersicht dieser Formate findet sich in [Weidle et al., 2013].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bispezifische, Ig γ -basierte Moleküle generiert, welche die CD16-vermittelte Lyse Endoglin-exprimierender Endothelzellen der Tumor-versorgenden Blutgefäße induzieren sollen.

1.3.4 Bispezifische Antikörpermoleküle mit Spezifitäten für Endoglin und CD16 zur anti-angiogenetischen Tumortherapie

Für das Wachstum eines soliden Tumors ist der Anschluss an versorgende Blutgefäße eine essentielle Voraussetzung. Tumoren mit einem Volumen von mehr als 1-2 mm³ sind, bedingt durch Nährstoffmangel und Akkumulation von Stoffwechselprodukten, abhängig vom Gefäßsystem des Wirtes. Im Zuge der Tumoretablierung kommt

es somit zum Wachstum von Gefäßen in Richtung der malignen Zellen, was als (Tumor-induzierte) Angiogenese bezeichnet wird. Schon 1971 postulierte Judah Folkman die Möglichkeit, Tumoren durch Unterbindung der Angiogenese zerstören zu können. Diese Strategie der Therapie ist heute z.T. schon klinische Realität. Das erste Medikament mit anti-angiogenetischem Wirkmechanismus wurde in Form des α VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin[®], produziert von Roche) erstmals 2004 in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von metastasierendem Rektumskarzinom zugelassen. Die Wirkung basiert auf der Bindung und Neutralisierung von löslichem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welches die Induktion der Angiogenese durch Stimulation und Aktivierung von Endothelzellen vermittelt. Allerdings ist der Nutzen dieser Therapie begrenzt. So hob die FDA die Zulassung von Bevacizumab zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs 2011 auf [Wagner et al., 2012].

Weitere Antikörper, wie z.B. Ramucirumab (IMC-1121B, entwickelt von ImClone Systems), zielen auf die Blockierung von VEGF durch antagonistische Bindung der VEGF-Rezeptoren ab und werden derzeit in präklinischen und klinischen Studien getestet [Krupitskaya und Wakelee, 2009].

Die Antikörper-basierte anti-angiogenetische Therapie solider Tumoren weist, verglichen mit Tumor-Antigen-spezifischen Antikörpern, einige wesentliche Vorteile auf. Da hier normale Endothelzellen als Ziel dienen, ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz-Entwicklung durch Mutation des Antigens oder Veränderung seiner Expression gering. Gleichzeitig erlaubt die Spezifität für Antigene normaler Endothelzellen eine Anwendung des Antikörpers bei der Therapie von Tumoren verschiedenster Gewebe.

Eine konsequente Weiterentwicklung des anti-angiogenetischen Ansatzes besteht in der gezielten Lyse der Endothelzellen tumorversorgender Blutgefäße. So kann nicht nur die Neubildung verhindert, sondern das bestehende Versorgungssystem des Tumors eliminiert werden. Gleichzeitig können diese leckhaften Gefäße als Zugang für immunologische Effektorzellen dienen.

Allerdings ist die Auswahl des Zielantigens im Rahmen eines solchen Ansatzes von entscheidender Bedeutung, um massive Nebenwirkungen der Therapie zu verhindern. Mit Endoglin konnte ein Antigen, dessen Expression auf aktiviertem Endothel drastisch ansteigt, identifiziert werden.

Endoglin

Das humane *ENG*-Gen kodiert für ein Glykoprotein (auch als CD105 bezeichnet), welches durch eine Disulfidbrücke stabilisierte Homodimere mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa bildet [Gougos und Letarte, 1988a]. Das Protein besteht dabei aus einem N-terminalen extrazellulären Bereich, welcher in drei Domänen geteilt ist, einer Transmembrandomäne, sowie einer kurzen zytoplasmatischen Signaldomäne (zusammengefasst in [Garcia-Pozo et al., 2008]).

Ursprünglich als Antigen auf einer leukämischen prä-B-Zelllinie identifiziert [Quackenbush et al., 1986], konnte die Expression von Endoglin auch auf Endothelzellen nachgewiesen werden [Gougos und Letarte, 1988a; Gougos und Letarte, 1988b]. Später konnte gezeigt werden, dass die Endoglin-Expression auf Endo-

thelzellen intra- und peri-tumorale Gefäße stark erhöht ist, wohingegen ruhende Endothelzellen nur eine marginale Expression dieses Antigens zeigten [Burrows et al., 1995; Wang et al., 1995; Miller et al., 1999]. Diese Ergebnisse konnten innerhalb der Arbeitsgruppe durch Dipl.-Biol. Karolin Schwartz (Universität Tübingen) bestätigt werden.

Auch konnte Endoglin als Teil des *transforming growth factor β* (TGF- β) Rezeptorkomplexes identifiziert werden [Cheifetz et al., 1992], wobei die genaue Beteiligung von Endoglin an TGF- β -vermittelten Signalen noch nicht verstanden ist.

Der funktionelle Einfluss von Endoglin auf Endothelzellen und somit die Bildung von Blutgefäßen wird auch aus *ENG*^{-/-} *knock out* Mäusen, welche schon früh im Mutterleib aufgrund fehlerhafter Vaskularisierung versterben, deutlich [Li et al., 1999]. Auch im Menschen konnten Mutationen innerhalb des *ENG*-Gens mit der Erbkrankheit hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (HHT) Typ 1, welche ebenfalls durch die Bildung pathologischer Blutgefäße charakterisiert ist, assoziiert werden [McAllister et al., 1994].

Diese Eigenschaften machen *ENG* zu einem attraktiven Antigen für eine Antikörper-basierte anti-angiogenetische Tumorthherapie. Mit dem chimären Ig γ 1-Antikörper TRC105 (produziert von TRACON Pharmaceuticals) wurde kürzlich der erste *ENG*-spezifische Antikörper im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie getestet [Rosen et al., 2012]. Der Antikörper zeigte dabei neben einer guten Verträglichkeit auch Hinweise auf klinische Wirksamkeit, welche in weiteren Studien belegt werden sollen.

Die *ENG*-spezifischen Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM

Ausgehend von der Idee der anti-angiogenetischen Therapie mit ADCC-optimierten Antikörpern wurden von Dipl.-Biol. Karolin Schwartz 21 neue Endoglin-spezifische Maus-Antikörper (K-ro2 - K-ro23) mittels Hybridomtechnik generiert. Im Zuge der Charakterisierung dieser Moleküle konnte auch die Überexpression von Endoglin auf Endothelzellen Tumor-versorgender Blutgefäße bestätigt werden.

Basierend auf Charakteristika, wie Bindungsaffinität und immunhistologischen Färbungen wurden vier dieser Maus-Antikörper selektioniert und chimärisierte und Fc-optimierte Moleküle hergestellt. Dabei konnte in allen Fällen eine deutliche Steigerung der ADCC-Aktivität der SDIEM-optimierten Antikörper gegenüber den chimären Ig γ 1-Moleküle nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in immunhistologischen und durchflusszytometrischen Versuchen jedoch auch gezeigt werden, dass der Antikörper K-ro8SDIEM eine, verglichen mit den übrigen Molekülen, stark erhöhte Spezifität für das innerhalb maligner Gewebe durch Endothelzellen exprimierte Endoglin-Protein aufwies.

Weitere Versuche machten dabei deutlich, dass das Molekül K-ro8SDIEM hinsichtlich Tumorendothelspezifität und ADCC-Aktivität auch dem mittlerweile in klinischen Studien getesteten Antikörper TRC105 überlegen ist.

Als Alternative zu der patentierten SDIE-Optimierung von humanen Fc-Teilen sollten, als Teil der hier vorliegenden Arbeit, Ig γ -basierte Moleküle mit Spezifitäten des K-ro8-Antikörpers, sowie für CD16 generiert und charakterisiert werden. Um

allgemeine Aussagen über die Potenzen und Eigenschaften dieser bispezifischen Moleküle treffen zu können, sollte weiterhin auch der Antikörper K-ro23SDIEM in diesem Kontext hergestellt und getestet werden.

1.3.5 Manipulation der T-Zellaktivität durch Antikörper

T-Zellen stellen neben den klassischen Fc γ R-tragenden Zellen des angeborenen Immunsystems die wichtigste Effektorpopulation im Zuge immuntherapeutischer Ansätze dar. Begründet ist dies durch ihre Fähigkeit, auf Aktivierung mit Proliferation und der Induktion einer adaptiven Immunantwort zu reagieren. Demnach zielen viele immuntherapeutische Ansätze auf eine Aktivierung dieser Zellen ab. Allerdings stellen die immunsuppressiven Eigenschaften etablierter Tumoren ein Hindernis bei der Induktion einer effektiven T-Zellantwort dar.

Unter physiologischen Bedingungen sind für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle zwei Signale nötig [Lafferty und Cunningham, 1975]. Das erste Signal wird dabei durch die spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex an den erkannten MHC:Peptid-Komplex vermittelt. Zweitsignale müssen dabei simultan über die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen der T-Zelle mit den entsprechenden, von Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten Liganden erfolgen. Eine Stimulierung des TZR/CD3-Komplexes ohne ein simultanes Zweitsignal führt zur Inaktivierung einer naiven T-Zelle, sowie zur Insensitivität gegenüber weiterer TZR/CD3-Stimulation (Anergie). Das wichtigste Zweitsignal wird dabei durch den kostimulatorischen Rezeptor CD28 nach Bindung der von Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) an die T-Zelle vermittelt. Für die Ausdifferenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen ist zusätzlich ein durch lösliche Faktoren, wie Interleukin-2 (IL-2), vermitteltes Signal erforderlich.

Zusätzlich zu CD28 können Zweitsignale auch durch eine Reihe anderer membranständiger Rezeptoren vermittelt werden. Unterschieden werden können dabei Rezeptoren mit stimulierenden und inhibierenden Eigenschaften. Zu den aktivierenden Molekülen zählen dabei der *inducible T-cell costimulator* (ICOS, CD278), OX40 (CD134), sowie 4-1BB (CD137). Inhibierende Funktion übernehmen die von aktivierten T-Zellen exprimierten Moleküle *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4, CD152), und *programmed cell-death 1* (PD-1, CD279).

Im Zuge immuntherapeutischer Strategien zur Aktivierung von T-Zellen als Tumor-eliminierende Effektorzellen sind alle diese Moleküle potentielle Ziele monoklonaler Antikörper und wurden bzw. werden derzeit in präklinischen oder klinischen Studien charakterisiert.

So konnten mit CD137-spezifische Agonisten im Mausmodell die T-Zellabhängige Eliminierung etablierter Tumoren induziert werden [Melero et al., 1997; Murillo et al., 2008]. Klinische Studien mit einem voll-humanen CD137-Agonisten (BMS-663513, produziert von Bristol-Myers Squibb) wurden mittlerweile begonnen und zeigen eine gute Verträglichkeit des Immunmodulators [Molckovsky und Siu, 2008].

Neben Agonisten werden auch antagonistische Antikörper zur Blockierung inhibitorischer Signale entwickelt. So konnte kürzlich in zwei unabhängigen Phase-I-Studien die Verträglichkeit eines blockierend-wirkenden PD-1-spezifischen Antikörpers [Topalian et al., 2012], bzw. eines blockierend-wirkenden PD-L1-spezifischen Antikörpers [Brahmer et al., 2012] gezeigt werden. Gleichzeitig zeigten

beide Moleküle erste Hinweise auf eine klinische Effektivität.

Derzeit am weitesten fortgeschritten ist die klinische Erprobung des CTLA-4-Antagonisten Ipilimumab (MDX-010, produziert von Medarex; Handelsname Yervoy[®]), der mittlerweile von der FDA für die Behandlung von inoperablem Melanom zugelassen ist. CTLA-4 gehört, wie auch CD28, zur Familie der Immunoglobulinsuperfamilie. Weiterhin haben CD28 und CTLA-4 in Form der Proteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) die selben Liganden. Im Gegensatz zu CD28 führt die, verglichen mit CD28, deutlich höher-affine Bindung von CTLA-4 an B7.1 oder B7.2 zu inhibitorischen Signalen in aktivierten T-Zellen. Die physiologische Relevanz dieses Moleküls zeigt sich im Mausmodell. Hier führt das experimentell-induzierte Fehlen von CTLA-4 zu unkontrollierter Proliferation von T-Zellen und Autoimmunerkrankungen [Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995].

Im tumorimmunologischen Kontext konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der Multimerisierung von CTLA-4 durch löslichen Antikörper oder Fab-Fragmente zu einer effizienten Eliminierung etablierter Tumoren führen kann [Leach et al., 1996; Kwon et al., 1997; Sabel et al., 2005].

Wurde anfangs der therapeutische Effekt des CTLA-4-Antagonisten allein der Blockierung inhibitorischer Signale gegenüber Effektorzellen zugeschrieben, werden mittlerweile direkte Effekte auf die suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen diskutiert [Gabriel und Lattime, 2007]. Experimentell konnte der direkte Einfluss der CTLA-4-Blockierung auf regulatorische T-Zellen jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden [Read et al., 2006; Kavanagh et al., 2008; Peggs et al., 2009].

Regulatorische T-Zellen (Treg) dienen unter normalen Umständen der Verhinderung übermäßiger und gefährlicher (Auto-)Immunreaktionen. Diese Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen, die ca. 5-10% aller peripheren T-Zellen ausmacht, ist durch die konstitutiv-hohe Expression von CD25 gekennzeichnet [Sakaguchi et al., 1995]. Als weiteres Charakteristikum gilt die Expression des Transkriptionsfaktors *forkheadbox-protein 3* (FoxP3).

Unterschieden werden dabei natürliche (nTreg) und induzierte (iTreg) regulatorische T-Zellen. Während nTreg im Thymus, als Konsequenz aus einer hochaffinen Bindung des TZR an von MHC-präsentierten Autoantigenen, gebildet werden, entstehen iTreg nach Aktivierung naiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen unter Toleranz-induzierenden Bedingungen (TGF- β , IL-10). Neben der Kontrolle und Limitierung von Immunreaktionen, sind Treg verantwortlich für die Inaktivierung autoreaktiver T-Zellen. Die genauen Mechanismen dieser Inhibition durch regulatorische T-Zellen sind jedoch noch nicht definiert. Nachgewiesen wurde im Zusammenhang mit Treg die Sekretion von IL-10 und TGF- β , sowie die Expression von CTLA-4, GITR und PD-L1.

Die Relevanz dieser Zellen für die klinische Prognose von Tumorerkrankungen (siehe Abschnitt 1.1.1, sowie [Curiel et al., 2004]), und auch ihr Beitrag zum immunsuppressiven und Toleranz-induzierenden Milieu des Tumors [Thomas und Massague, 2005; Curiel et al., 2004] machen Treg jedoch zu einem wichtigen Ziel immuntherapeutischer Strategien. Derzeitige Ansätze zielen dabei auf die Depletion von Treg durch den CD25-spezifischen Antikörper Daclizumab (Zenapax, produziert von Roche), bzw. auf die Neutralisierung des inhibitorischen und

Treg-induzierenden Faktors TGF- β durch den Antikörper Fresolimumab (GC1008, produziert von Sanofi-Aventis) ab.

Unter Berücksichtigung der Relevanz regulatorischer T-Zellen im tumorimmunologischen Zusammenhang stellt das von aktivierten T-Zellen exprimierte Molekül OX40 ein interessantes Zielantigen immunstimulatorischer Antikörper dar.

1.3.6 OX40 als kostimulierendes T-Zell-Antigen

OX40

OX40 wurde erstmals als Antigen auf der Oberfläche aktivierter CD4⁺T-Zellen der Ratte beschrieben [Mallett et al., 1990]. 1994 konnte die entsprechende cDNA aus humanen HUT-102-Zellen isoliert werden [Latza et al., 1994]. Das humane *OX40*-Gen kodiert demnach für 277 Aminosäuren und definiert ein Glykoprotein mit einer einzelnen Transmembrandomäne.

Das Protein konnte mittlerweile der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) und darin der *TNF receptor associated factor* (TRAF) *binding receptor* Familie zugeordnet werden, zu der auch die Proteine CD27, CD30, 4-1BB, HVEM und GITR gehören. Diese Gruppe von membranständigen Rezeptoren zeichnet sich durch die Vermittlung von Proliferations- [Godfrey et al., 1994], sowie Differenzierungs- [Ohshima et al., 1998] und Überlebens- [Rogers et al., 2001] Signalen durch die Rekrutierung von TRAF-Proteinen aus. Weiterhin spielen alle diese Moleküle eine Rolle in der Kostimulation aktivierter T-Zellen.

Einfluss von OX40 auf die Aktivität humaner T-Zellen

OX40 wird von aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation des TZR/CD3-Komplexes exprimiert, wohingegen es auf naiven und ruhenden T-Zellen nicht nachweisbar ist. Dabei erreicht die Expression 24 bis 48 Stunden nach Stimulation ihren Höhepunkt, um nach ca. sechs Tagen wieder zu verschwinden [Ohshima et al., 1998; Xie et al., 2006; Kober et al., 2008]. Zwar ist die TZR/CD3-Stimulation für eine OX40-Induktion ausreichend, jedoch kann die Expression durch CD28:B7.1/B7.2-Interaktion oder durch Zytokine weiter verstärkt und verlängert werden. Die Kostimulation aktivierter T-Zellen über OX40 führt zu einer Steigerung der TZR/CD3-induzierten Proliferation *in vitro* [Godfrey et al., 1994; Ohshima et al., 1998; Xie et al., 2006; Kober et al., 2008]. Weiterhin konnten die verstärkte Freisetzung von IL-4 [Ohshima et al., 1998; Kober et al., 2008], IL-5, IL-10 und IL-13 nachgewiesen werden [Kober et al., 2008].

Die oben zitierten Studien wurden zumeist unter Verwendung von OX40L-exprimierenden Zelllinien durchgeführt. Daten bezüglich agonistischer α OX40-Antikörper wurden bis dato nur durch Weinberg et al. [Weinberg et al., 2006] und Xie et al. publiziert [Xie et al., 2006]. Weitere Anstrengungen, die kostimulatorischen Eigenschaften von OX40 zu analysieren und eventuell zu nutzen beinhalten die Generierung rekombinanter OX40-Liganden und Varianten dieses Moleküls [Morris et al., 2007].

***In vivo* Einfluss von OX40 auf die Aktivität von T-Zellen der Maus**

Die meisten Informationen bezüglich der Relevanz und Potenz von OX40 im tumorthérapeutischen Kontext wurden bislang aus Experimenten im Mausmodell gewonnen. Grundsätzlich gilt für die OX40-Expression in Maus-T-Zellen ebenfalls die Abhängigkeit von einem TZR/CD3-Stimulus. Allerdings konnte hier gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen der Maus konstitutiv OX40 exprimieren [Vu et al., 2007], wohingegen die OX40-Expression humaner regulatorischer T-Zellen nicht eindeutig belegt ist, allerdings als „induzierbar“ angesehen wird [Croft, 2009; Croft, 2010].

Die potentielle Anwendung eines OX40-Agonisten zur Tumorthérapie wurde in verschiedenen Mausmodellen *in vivo* untersucht. Dabei konnten teils beeindruckende Ergebnisse erzielt werden. Neben der Applikation von rekombinantem OX40L-Fc-Fusionsprotein (OX40L-Fc) wurde hierbei auch ein agonistischer α OX40-Antikörper (OX86) [al Shamkhani et al., 1996] eingesetzt. In einer der ersten Studien konnte das Anwachsen syngener Tumorzellen durch die systemische Applikation von OX40L-Fc oder OX86 in 20-60% der Mäuse (abhängig von der Immunogenität der transplantierten Tumorzellen) verhindert werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass für eine effiziente Kontrolle des Tumorwachstums CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nötig sind [Weinberg et al., 2000].

2004 konnte erstmals ein direkter Einfluss von OX40-vermittelten Signalen auf regulatorische T-Zellen gezeigt werden. Hierbei wurden allogene T-Zell-depletierte Knochenmarkszellen zusammen mit isolierten CD4⁺CD25⁻- und CD4⁺CD25⁺-T-Zellen von C57BL/6- in (bestrahlte) BALB/c-Mäuse transferiert. Dabei resultierte die Applikation von OX86, genauso wie die Depletion der CD4⁺CD25⁺ Treg, in einer letalen *graft versus host disease* [Valzasina et al., 2005], was die OX40-vermittelte Blockierung der Treg-Aktivität *in vivo* nachwies.

Es folgten weitere Studien, die den Einfluss von OX40-Stimulation auf Treg-Funktionen *in vitro* untersuchten [Ito et al., 2006; Vu et al., 2007]. Piconese et al. wiesen daraufhin 2008 die Relevanz dieser Treg-Blockierung für die Induktion einer tumor-spezifischen Immunantwort nach. Gleichzeitig konnten durch intratumorale Applikation von OX86 etablierte Tumoren in 80% der behandelten Mäuse eliminiert werden, wobei die Expression von OX40 auf Treg und auf Effektor-T-Zellen essentiell für die OX86-vermittelte Therapie war [Piconese et al., 2008].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel therapeutische anti-Tumor-Antikörper zu optimieren. Hierbei wurden vor dem beschriebenen Hintergrund drei unterschiedliche Ansätze verfolgt, die alle eine verbesserte Aktivierung und Rekrutierung immunologischer Effektorzellen zum Ziel hatten:

1. Fc γ -Rezeptor-tragende Immunzellen stellen die Effektorpopulation der Fc-optimierten anti-FLT3-Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM dar. Ausgehend von diesen zwei Antikörpern sollte ein geeigneter Kandidat für eine initiale klinische Testung zur Behandlung myeloischer Leukämien identifiziert, sowie bezüglich Effektivität gegenüber malignen Zellen und Toxizität gegenüber normalen Zellen evaluiert werden.
2. Einen weiteren Ansatz zur Rekrutierung CD16-positiver Immunzellen stellen bispezifische Antikörper dar. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten deshalb neue Ig γ -ähnliche bispezifische Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16 generiert werden und deren Aktivität charakterisiert, sowie mit den entsprechenden optimierten monospezifischen Antikörpern verglichen werden.
3. Der dritte Ansatz verfolgt die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen als Effektorzellen. Als Grundlage für eine effiziente und dennoch kontrollierbare T-Zell-Aktivierung durch mono- oder auch bispezifische Antikörper sollten in diesem Teil der Arbeit agonistische anti-OX40-Antikörper hergestellt und charakterisiert werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|--|-----------------------------------|
| Brutschrank Heraeus function line | Thermo Electron, Waltham, USA |
| Brutschrank APT.line [®] CB | Binder, Tuttlingen |
| Dispensor Multipette | Eppendorf, Hamburg |
| DryEasy Mini-Gel Drying System | Novex, San Diego, USA |
| Durchflusszytometer FACSCalibur | BD, Heidelberg |
| Durchflusszytometer FACSCanto II | BD, Heidelberg |
| Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Jena |
| Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1 | GE Healthcare, München |
| Einkanalschreiber Rec101 | GE Healthcare, München |
| ELISA-Plattenlesegerät SpectraMax 340 | Molecular Devices, München |
| Heizrührer MR 2002 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| MicroBeta Counter 1450 Plus | PerkinElmer, Rodgau |
| MicroBeta ² 2450 Microplate Counter | PerkinElmer, Rodgau |
| NanoDrop [™] 1000 | ThermoFisher Scientific, Schwerte |
| Peristaltikpumpe P-1 | GE Healthcare, München |
| pH-Messgerät Seven Multi | Mettler-Toledo, Giessen |
| Photometer Ultraspec 3000 | GE Healthcare, München |
| Pipetten | Abimed, Langenfeld |
| Pipettierhilfe Pipetboy acu | Integra Biosciences, Chur, CH |
| Schüttler Multitron | Infors, Bottmingen, CH |
| SMART SYSTEM | GE Healthcare Europe, München |
| Sterilbank Tecnoflow | Integra Biosciences, Chur, CH |
| Thermocycler PTC-100 | BioRad, Waltham, USA |
| Trockenschrank Heraeus ET | Thermo Electron, Waltham, USA |
| UV-Tisch FLX-20M und TFX-20M | Vilber Lourmat, Eberhardzell |
| Vortexer Vibro-Fix VF2 | Ika Labortechnik, Staufen |
| Waagen (Fein- und Tischwaage) | Sartorius, Göttingen |
| Wippe Rocky RT-1 | Fröbel, Lindau |
| Zell-Harvester ICH-110-96 | Inotech, Dottikon, CH |

Zentrifugen:

Heraeus Biofuge A und Biofuge fresco

Heraeus Megafuge 1.0 und 2.0R

Sorvall RC 50 Plus

Thermo Electron, Waltham, USA

Thermo Electron, Waltham, USA

Thermo Electron, Waltham, USA

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Bechergläser, Glas

Bechergläser, Plastik

Bottletop Filter (0,22 μ m Porengröße)

Combitips

Cryoröhrchen 2 ml

Cryobox

Dialyseschläuche Visking 12 - 14 kDa

E-Plate 96

Einmalpipetten Plastik

1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml

Einmalpipetten Plastik 50 ml

Einmalspritzen Plastik

ELISA-Platte Maxisorp

Erlenmeyerkolben Simax 500ml, 1 l

Filtermatten Melti Lex A

Glasflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l

Lumaplate 96

Messzylinder Plastik

100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l

Mikrokonzentratoren Amicon Ultra-15

Neubauer Zell-Zählkammer

Pasteurpipetten, Long size

PCR-Softtubes 0,5 ml

Pipettenspitzen

20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l

Pipettenspitzen 10 μ l

Pipettenspitzen, gefiltert

10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l

PP-Röhrchen 50 ml

PS-Röhrchen 15 ml

Präzisions-Küvette Suprasil[®] halbmikro

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml

Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP

0,22 μ m

Zellkulturflaschen 250 ml, 500 ml

Zellkulturflaschen Triple flask

Zellkulturplatten 96-well flat / round bottom

Schott, Mainz

Vitalab, Großostheim

Millipore, Schwalbach

Eppendorf, Hamburg

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

ACEA Biosciences, San Diego, USA

BD, Heidelberg

Corning, Kaiserslautern

BD, Heidelberg

Nalgene Nunc international, Rochester NY, USA

Bohemia Cristal, Selb

Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland

Schott, Mainz

Packard BioScience, Dreieich

Vitalab, Großostheim

Millipore, Schwalbach

Brand, Weinheim

WU, Mainz

Biozym, Oldenburg

Greiner Bio-one, Frickenhausen

Biozym, Oldendorf

Biozym, Oldendorf

Greiner Bio-one, Frickenhausen

BD, Heidelberg

Hellma, Basel, CH

Eppendorf, Hamburg

Millipore, Schwalbach

Greiner Bio-one, Frickenhausen

Nunc, Wiesbaden

Greiner Bio-one, Frickenhausen

| | |
|--|--------------------------------|
| Zellkulturplatte 6-well flat bottom | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Zentrifugenbecher 500 ml | Nalgene, Hereford, UK |
| Zentrifugenröhrchen SS34 | Nalgene, hereford, UK |
| Zentrikon Amicon Ultra 10 kDa und 30 kDa | Millipore, Schwalbach |

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|---------------------------------|
| $^3\text{[H]}$ -methyl-Thymidin (1 mCi/ml) | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| 7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution) | Biolegend, Fell |
| 8-Azaguanin Hybri-Max TM | Sigma, Steinheim |
| Agarose | Sigma, Steinheim |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe |
| Bacto-Agar | BD, Heidelberg |
| Bacto-Hefeextrakt | BD, Heidelberg |
| Bacto-Trypton | BD, Heidelberg |
| β -Mercaptoethanol 14,3 M | Serva, Heidelberg |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Chloroform | |
| Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs) | Peqlab, Erlangen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth, Karlsruhe |
| Dimethylformamid (DMF) | Roth, Karlsruhe |
| Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) | Lonza, Basel, CH |
| Essigsäure (100%) | Merck, Darmstadt |
| Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA) | Sigma, Steinheim |
| Ethanol, vergällt (96 %) | Merck, Darmstadt |
| Ethanol, zur Analyse (100 %) | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid (EtBr) 10 mg/ml | Carl Roth, Karlsruhe |
| FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse | BD, Heidelberg |
| Glucose | Sigma, Steinheim |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumphosphat-Puffer 1M, pH 7,4 | Sigma, Steinheim |
| KappaSelect, Agarose-immobilisiert | GE Healthcare, München |
| Lymphocyte Separation Media LSM1077 | Lonza, Basel, CH |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Mineralöl | Sigma, Steinheim |
| Natriumacetat | Serva, Heidelberg |
| Natriumacetat (wasserfrei) | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumchromat (^{51}Cr , 5 μCi / ml) | Hartmann Analytic, Braunschweig |

2.1. Material

| | |
|---|--|
| Natriumhydroxid-Plättchen | Merck, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Orange G | Sigma, Steinheim |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth, Karlsruhe |
| Polyethylenglykol | Roche, Mannheim |
| 50% (w/v) PEG 1500 in 75 mM HEPES | |
| Propidiumiodid (PI) | Sigma, Steinheim |
| Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert | GE Healthcare, München |
| Rekombinanter humaner OX40Ligand | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Sorafenib | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA |
| Sunitinib-Malat | Sigma, Steinheim |
| Szintillationscocktail <i>Ultima Gold</i> | Perkin Elmer, Rodgau |
| Triton [®] X-100 | Sigma, Steinheim |
| Trizma Base (Tris-Base) | Sigma, Steinheim |
| Trizma Hydrochlorid (Tris-HCL) | Sigma, Steinheim |
| Trypanblau (0,4%) | Sigma, Steinheim |
| Tuerk'sche Lösung | Sigma, Steinheim |
| Tween 20 | Sigma, Steinheim |
| WST-1 Cell Proliferation Reagent | Roche, Mannheim |
| X-Gal (5'Br-4'Cl-3'Indolyl- β -D- Galactopyranosid) | Sigma, Steinheim |

Zellkulturmedien und -zusätze

| | |
|--|------------------------------------|
| CDM4PermAb | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| Fötales Kälberserum (FCS) (Brasilianischer Ursprung) | Lonza, Basel, CH |
| Hybridoma Cloning Supplement (HCS) | PAA, Pasching, A |
| Hypoxanthin / Aminopterin / Thymidin (HAT) Mediumzusatz (50x) | Sigma, Steinheim |
| Hypoxanthin / Thymidin (HT) Mediumzusatz (50x) | Sigma, Steinheim |
| IMDM | Lonza, Basel, CH |
| L-Glutamin (200 mM) | Lonza, Basel, CH |
| MEM-NEAA (100x) | PAA Pasching, A |
| Natrium-Pyruvat (100x) (nicht-essentielle Aminosäuren) | PAA, Pasching, A |
| RPMI | Lonza, Basel, CH |

Enzyme

| | |
|--|--------------------------------|
| Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) | New England Biolabs, Frankfurt |
| HotStar-Taq Polymerase | Qiagen, Hilden |
| PNGase F | New England Biolabs, Frankfurt |
| Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt |
| Restriktionsenzyme, diverse | New England Biolabs, Frankfurt |
| T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l) | Roche, Mannheim |
| VentR [®] DNA-Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt |

Größenmarker für die Gelelektrophorese

- 1kB Marker und 100 bp Marker, New England Biolabs, Frankfurt
- SeeBlue[®] Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe
- SeeBlue 2[®] Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Gebrauchsfertige Kits

| | |
|---|------------------------------------|
| BD [™] Anti-Mouse Ig, <i>kappa</i> /Negative Control | BD Biosciences, Heidelberg |
| (FBS) Compensation Particles Set | |
| BioTrap Gelelutions-Starterkit | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Blood Dendritic Cell Isolation Kit II | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| CD33 MicroBead Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| CD34 MicroBead Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| IsoGold [™] Rapid mouse monoclonal Isotyping Kit | BioAssay Works, Jamsville, MD, USA |
| Mini-PROTEAN [®] TGX | Bio-Rad, München |
| 10% Precast Gele | |
| 2x Laemmli Sample Puffer | |
| 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer | |
| Pan T Cell Isolation Kit II | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| PCR-Script [®] Amp Cloning Kit | Stratagene, Heidelberg |
| QIAGEN [®] Plasmid-DNA Maxiprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick [®] Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep [®] Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |

2.1.5 Oligonukleotide

Bezugsquelle: Biomers.net, Ulm

- m13-Hin: 5'-gta aaa cga agg cca gt-3'

- m13-Rev: 5'-aac agc tat gac cat g-3'
- OX40-Fw: 5'-agg atc cgc cac cat gtg cgt ggg ggc tcg gcg gc-3'
- OX40-Rev: 5'-ttc tag att atc aga tct tgg cca ggg tgg agt g-3'
- 3G8-Cys-fw: 5'-gca aag taa tga gga cgc tac acg ttc gga tgt ggg acc aag ctg gag ata aaa ggt gg-3'
- 3G8-Cys-rev1: 5'-cca aat gtg gtg cca gcc act cta ggc act tcc ctg aag gct gac gaa tcc agc c3'
- 3G8-Cys-rev2: 5'-tgg att ata gcg ctt gtc atc atc cca cca aat gtg tgc cag cca ctc tag gca ctt ccc3'
- FCER1G-A-fw: 5'aag gat cgc cgc cca cca tga ttc cag cag tgg tct tgc tct tac tcc-3'
- FCER1G-A-rev: 5'tat atc cgg act tgg atc ttc agt cga cag tag agg agg gtg agg ac-3'
- FCER1G-B-fw: 5'aag gat cca tat atc cgg aag gca gct ata acc agc tat gag aaa tc-3'
- FCER1G-B-rev: 5'tta atc tag att atc act gtg gtg gtt tct cat gct tca gag-3'
- FCGR3A-fw: 5'tta agg atc cgc cgc cac cat gtg gca gct gct cct ccc aac tgc tc-3'
- FCGR3A-rev: 5'tta atc tag att atc att tgt ctt gag ggt cct ttc tcc att taa att tat gg-3'

2.1.6 Software

| | |
|---------------------------------|--|
| CellQuest Pro | BD, Heidelberg |
| FlowJo | TreeStar Inc., Ashland, USA |
| GATC Viewer | GATC Biotech, Konstanz |
| GraphPad Prism | GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA |
| HUSAR Online Bioinformatics Lab | DKFZ, Heidelberg |
| MS Excel 2003 | Microsoft, Unterschleißheim |
| MS Powerpoint 2003 | Microsoft, Unterschleißheim |
| Sigma Plot V7.0 | SPSS, München |
| TeXnicCenter 1.0 | www.ToolsCenter.org |
| stable release Candidate 1 | (Open Source Projekt) |

2.1.7 Puffer und Medien

Molekularbiologie

| | |
|------------------------------------|---|
| Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml) | Ampicillin in H ₂ O (bidest.) |
| dNTP-Stocklösung | dATP, dCTP, dGTP, dTTP [je 10 mM] in H ₂ O (bidest.) |
| DNA-Ladepuffer (6x) | 30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA in H ₂ O (bidest.), pH 7,6 |
| DNA-Ladepuffer Orange G (6x) | 0,6 ml Orange G (10x) 1,8 ml Glycerin 3,6 ml TAE-Puffer (1x) |
| EtBr-Stocklösung [10 mg/ml] | Roth, Karlsruhe |
| IPTG-Stocklösung [100 mM] | in H ₂ O (bidest.) |
| LB-Medium (flüssig) | 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl H ₂ O (bidest.) ad 1 l |
| LB-Medium (Platten) | 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar H ₂ O (bidest.) ad 1 l 1 ml Ampicillin-Stocklösung |
| Orange G (10x) | 200 mg Orange G in 5 ml H ₂ O (bidest.) |
| SOBAG-Medium (Platten) | 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar 56 ml 2M Glukoselösung (in H ₂ O didest.) 10 ml 1M MgCl ₂ -Lösung in H ₂ O didest.) H ₂ O (bidest.) ad 1 l 1 ml Ampicillin-Stocklösung |
| TAE-Puffer (50x) | 2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA |

| | |
|--------------------------------|---|
| | in H ₂ O (bidest.), pH 8,5 |
| TfbI | 30 mM Kaliumacetat (CH ₃ COOK) 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% (w/v) Glycerin mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt sterilfiltriert |
| TfbII | 10 mM MOPS pH 7 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (w/v) Glycerin sterilfiltriert |
| X-Gal-Stocklösung [10 % (w/v)] | X-Gal in DMF |

Zellkultur

| | |
|-----------------------------------|---|
| CHO-Medium (CDM) | CDM4PermAb 4 mM L-Glutamin |
| Einfriermedium | 90 % FCS (hitzeinaktiviert) 10 % DMSO |
| Fusions-Komplettmedium (5 % FCS) | IMDM 5 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol |
| Fusions-Komplettmedium (20 % FCS) | IMDM 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 µM β-Mercaptoethanol |
| Fusions-Medium (8-Aza) | IMDM 5 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat |

| | |
|-------------------------|--|
| | 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol 130 μ M 8-Azaguanin |
| Fusions-HAT-medium (2x) | IMDM 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol 2% Hybridoma cloning supplement 200 μ M Hypoxanthin 0,8 μ M Aminopterin 32 μ M Thymidin |
| Fusions-HT-medium | IMDM 20 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol 2% Hybridoma cloning supplement 100 μ M Hypoxanthin 16 μ M Thymidin |
| Fusions-Waschmedium | IMDM 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol |
| IMDM-Komplettmedium | IMDM 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol |
| RPMI-Komplettmedium | RPMI1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin |

| | |
|--|---|
| | 1x Natrium-Pyruvat 1x MEM-NEAA 1x 50 μ M β -Mercaptoethanol |
| SFM Hybridoma serum-free medium + Pen/Strep | 1x Hybridoma SFM 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin |
| Trypan-Blau | 0,1 % Trypan-Blau in DPBS |

Chromatographische Verfahren

| | |
|--|---|
| 0,1 M Citrat/0,1 M Citrat-Puffer pH 2,4, pH 4,2 | 0,05 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat 0,05 M Zitronensäure (wasserfrei) 0,1 M Glycin 0,15 M NaCl in H ₂ O (bidest.) mit HCl auf erforderlichen pH-Wert ju- stiert sterilfiltriert |
| 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,3 | 0,1 M Glycin in H ₂ O (bidest.) mit HCl auf pH 2,3 justiert |
| 0,1 M Phosphatpuffer pH 8 | 10% (v/v) 1 M Kaliumphosphat-Puffer in H ₂ O (bidest.) mit NaOH auf pH 8 justiert |

Durchflusszytometrie

| | |
|-------------|--|
| FACS-Puffer | 1% FCS (hitzeinaktiviert) 0,02% NaN ₃ in DPBS |
| FK-Puffer | 1% FCS (hitzeinaktiviert) 0,02% NaN ₃ 50 μ g/ml humIgG (Flebogamma) 12% (v/v) BD Negative Compensation Particles 0,5 μ g/ml 7-AAD in DPBS |

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli DH5 α , MBI Fermentas, St. Leon Rot

Genotyp: F⁻(Φ 80d Δ (lacZ)M15)recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r _{κ} ⁻ m _{κ} ⁺ supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)U169

2.1.9 Plasmide

pGEM[®] -T Easy
pPCR-Script Amp SK(+)
pcDNA3(+)

Promega, Mannheim
Stratagene, Heidelberg
Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper hinsichtlich Spezifität, Klonname (soweit verfügbar), Isotyp, Konjugat (soweit verfügbar) und Bezugsquelle aufgeführt. Wurden Antikörper selbst gereinigt, so ist die Bezugsquelle des Hybridoms der Tabelle 2.17 zu entnehmen.

Tabelle 2.13: Konjugierte monoklonale Antikörper

| Konjugierte monoklonale Antikörper | | | | |
|------------------------------------|----------|-------------------------------|-----------|----------------------------|
| Spezifität | Klon | Isotyp | Konjugat | Bezugsquelle |
| humCD4 | HP2/6 | Maus Ig γ 2a, κ | FITC | Abteilung f. Immunologie |
| humCD8a | RPA-T8 | Maus Ig γ 1, κ | APC | Biolegend, Fell |
| humCD14 | HCD14 | Maus Ig γ 1, κ | APC/Cy7 | Biolegend, Fell |
| humCD25 | BC26 | Maus Ig γ 1, κ | PE | Biolegend, Fell |
| humCD33 | HIM3-4 | Maus Ig γ 1, κ | FITC | Biolegend, Fell |
| humCD34 | 581 | Maus Ig γ 1, κ | APC/Cy7 | Biolegend, Fell |
| humCD38 | HIT2 | Maus Ig γ 1, κ | PE/Cy7 | Biolegend, Fell |
| humCD45 | 2D1 | Maus Ig γ 1, κ | AmCyan | BD Biosciences, Heidelberg |
| humCD56 | MEM-188 | Maus Ig γ 2a, κ | APC | Biolegend, Fell |
| humCD69 | FN50 | Maus Ig γ 1, κ | PE | Biolegend, Fell |
| (unbekannt) | MOPC-21 | Maus Ig γ 1, κ | alle | Biolegend, Fell |
| (unbekannt) | MOPC-173 | Maus Ig γ 2a, κ | FITC; APC | Biolegend, Fell |

Tabelle 2.14: Konjugierte polyklonale Antikörper

| Konjugierte polyklonale Antikörper | | | | |
|---|--|---------|-------------------------|--------------------|
| Bezeichnung | Spezifität | Spezies | Konjugat | Bezugsquelle |
| polyklonales anti-Maus-Ig γ Serum | murines Ig γ und Ig μ H+L-spezifisch | Ziege | <i>R</i> -Phycoerythrin | Dianova Hamburg |
| polyklonales anti-Maus-Ig γ Serum | murines Ig γ F(ab') ₂ -spezifisch | Ziege | <i>R</i> -Phycoerythrin | Dianova Hamburg |
| polyklonales anti-human-Ig γ Serum | humanes Ig γ H+L-spezifisch | Ziege | <i>R</i> -Phycoerythrin | Dianova Hamburg |
| polyklonales anti-Maus-Ig γ Serum | murines Ig γ und Ig μ H+L-spezifisch | Ziege | Allophycocyanin | Dianova Hamburg |
| polyklonales anti-Maus-Ig γ Serum | murines Ig γ F(ab') ₂ -spezifisch | Ziege | Allophycocyanin | Dianova Hamburg |
| polyklonales anti-human-Ig γ Serum | humanes Ig γ H+L-spezifisch | Ziege | Allophycocyanin | Dianova Hamburg |

Tabelle 2.15: Unkonjugierte Antikörper

| Unkonjugierte Antikörper | | | | |
|--------------------------------------|------------|----------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Bezeichnung | Spezifität | Isotyp | Spezies | Bezugsquelle |
| 3G8 | humCD16 | Ig γ 1 | Maus | Biolegend, Fell |
| 4G7SDIEM | humCD19 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dr. L. Große-Hovest Tübingen |
| 4G8B4B12 hier als 4G8 bezeichnet | humFLT3 | Ig γ 1 | Maus | selbst gereinigt |
| 4G8SDIEM | humFLT3 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | selbst gereinigt |
| χ 4G8 | humFLT3 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | selbst gereinigt |
| 9.3 | humCD28 | Ig γ 2a | Maus | Dr. L. Große-Hovest Tübingen |
| 9.2.27SDIE | humCSPG4 | Ig γ 1 | chimär Tübingen | Dr. L. Große-Hovest |
| α EGFRSDIEM | hum EGFR | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dr. E. Pyz Tübingen |
| ACT35 | humOX40 | Ig γ 1 | Maus | BD Biosciences, Heidelberg |
| BV10A4H2 hier als BV10 bezeichnet | humFLT3 | Ig γ 1 | Maus | selbst gereinigt |
| BV10SDIEM | humFLT3 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dr. E. Pyz Tübingen |
| χ BV10 | humFLT3 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dr. E. Pyz Tübingen |
| χ K-ro8 | humENG | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dipl.-Biol. K. Schwartz Tübingen |
| K-ro8SDIEM | humENG | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dipl.-Biol. K. Schwartz Tübingen |
| χ K-ro23 | humENG | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dipl.-Biol. K. Schwartz Tübingen |
| K-ro23SDIEM | humENG | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dipl.-Biol. K. Schwartz Tübingen |
| M-OX1 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | selbst gereinigt |
| M-OX2 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | selbst gereinigt |
| M-OX3 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | selbst gereinigt |
| M-OX4 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | selbst gereinigt |
| M-OX9 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | selbst gereinigt |
| M-OX10 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | selbst gereinigt |
| M-OX11 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX12 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX13 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX14 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | selbst gereinigt |
| M-OX15 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX17 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX18 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX20 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| M-OX21 | humOX40 | Maus | Ig γ | selbst gereinigt |
| UCHT-1 | humCD3 | Ig γ 2a | Maus | Dr. L. Große-Hovest Tübingen |
| χ UCHT-1 | humCD3 | Ig γ 1 | chimär Maus / Mensch | Dr. L. Große-Hovest Tübingen |

Tabelle 2.16: Unkonjugierte Isotypkontroll-Antikörper

| Unkonjugierte Isotypkontroll-Antikörper | | | | |
|---|------------|----------------|---------|-----------------------------------|
| Bezeichnung | Spezifität | Isotyp | Spezies | Bezugsquelle |
| Isotypkontrolle IgG1 (B-Z1) | | Ig γ 1 | Maus | Diaclone, Besancon, Frankreich |
| Isotypkontrolle IgG2a (B-Z2) | | Ig γ 2a | Maus | Diaclone, Besancon, Frankreich |

2.1.11 Zelllinien

In Tabelle 2.17 sind die antikörperproduzierenden Hybridomlinien und die für *in vitro*-Experimente und Transfektionen genutzten Zelllinien, sowie im Rahmen dieser Arbeit generierte (i. R. d. A. generiert) Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 2.17: **Verwendete Zelllinien.**

| Hybridome | | | | |
|----------------------|---|---------|------------------------------|-------------------------------|
| Bezeichnung | Spezifität | Spezies | Isotyp | Bezugsquelle |
| 4G8B4B12 | humCD135 (FLT3) | Maus | Ig γ 1 | Dr. H.-J. Bühring, Tübingen |
| BV10A4H2 | humCD135 (FLT3) | Maus | Ig γ 1 | Dr. H.-J. Bühring, Tübingen |
| 9.3 | humCD28 | Maus | Ig γ 2a | J. A. Ledbetter, Seattle, USA |
| M-OX1 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | i. R. d. A. generiert |
| M-OX2 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | i. R. d. A. generiert |
| M-OX3 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | i. R. d. A. generiert |
| M-OX4 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | i. R. d. A. generiert |
| M-OX5 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX6 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX7 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX8 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX9 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | i. R. d. A. generiert |
| M-OX10 | humOX40 | Maus | Ig γ 2a | i. R. d. A. generiert |
| M-OX11 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX12 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX13 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX14 | humOX40 | Maus | Ig γ 1 | i. R. d. A. generiert |
| M-OX15 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX16 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX17 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX18 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX19 | humOX40 | Maus | Ig μ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX20 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| M-OX21 | humOX40 | Maus | Ig γ | i. R. d. A. generiert |
| UCHT-1 | humCD3 | Maus | Ig γ 2a | P. Beverley, Cambridge, UK |
| Humane Zelllinien | | | | |
| Bezeichnung | Beschreibung | | Bezugsquelle | |
| MV4-11 | akute monozytäre Leukämie | | Prof. Dr. H. Salih, Tübingen | |
| NALM-16 | B-Vorläuferzellen-Leukämie | | DSMZ, Braunschweig | |
| REH | B-Vorläuferzellen-Leukämie | | DSMZ, Braunschweig | |
| Tierische Zelllinien | | | | |
| Bezeichnung | Beschreibung | | Bezugsquelle | |
| CHO | Ovarialzellen eines chinesischen Hamsters, 14-CHO-S | | Celonic, Jülich | |
| Sp2/0-Ag14 | Maus-Myelom | | ATCC, Manassas, USA | |
| Transfektanten | | | | |
| Bezeichnung | Beschreibung | | Bezugsquelle | |
| CHO-OX40 | humOX40 ⁺ CHO-Zelllinie | | i. R. d. A. generiert | |
| CHO-ENG | humENG ⁺ CHO-Zelllinie | | i. R. d. A. generiert | |
| Sp2/0-FLT3 | humFLT3 ⁺ Sp2/0-Ag14-Zelllinie | | i. R. d. A. generiert | |
| Sp2/0-OX40 | humOX40 ⁺ Sp2/0-Ag14-Zelllinie | | i. R. d. A. generiert | |
| Sp2/0-CD16 | humCD16 ⁺ Sp2/0-Ag14-Zelllinie | | i. R. d. A. generiert | |

2.1.12 Primäre humane Zellen

Blutproben gesunder Spender wurden mit deren Einverständnis bearbeitet (Ethikvotum 156/2012BO1).

Blutproben bzw. isolierte PBMC von AML-Patienten wurden von Prof. H. Salih (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 337/2009BO2).

2.1.13 Mäuse

Die verwendeten Mausstämme, sowie deren Herkunft bzw. Bezugsquelle sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2.18: **Verwendete Mausstämme.**

| Stamm | Bezugsquelle |
|--------------|---|
| C57BL/6 | Eigenzucht der Abt. für Immunologie, Universität Tübingen |
| BALB/c | Charles River Laboratories, Wilmington, USA |

2.2 Methoden eukaryotischer Zellkultur

Alle Zelllinien wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Standardbedingungen bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Begasungsbrutschrank kultiviert.

2.2.1 Passagieren und Ernten von Zellen

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Suspensionszellen oder leichtadhärente Zelllinien. Die leicht-adhärenenten Zelllinien wurden durch seitliches Schlagen vom Flaschenboden abgelöst. Daraufhin wurde je nach Zelldichte ein entsprechendes Volumen an Zellsuspension aus dem Kulturgefäß entnommen und verworfen und das Gefäß mit frischem Vollmedium wieder aufgefüllt. Bei Suspensionszellen wurde ohne Abschlagen der Zellen genauso verfahren.

2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellzahl einer Probe zu bestimmen, wurde diese in einem definierten Verhältnis (1:2 oder 1:10) mit einer 0,1 %-Trypanblaulösung gemischt. Tote Zellen nehmen durch ihre gestörte Membranintegrität diesen Farbstoff auf, erscheinen somit unter dem Lichtmikroskop blau und werden nicht gezählt.

Diese Lösung wurde dann auf eine Neubauerzählkammer aufgebracht und mindestens 2 Großquadrate ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde anhand der Formel

Lebendzellzahl/ml Zellsuspension = Mittelwert ungefärbter Zellen pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor (Trypanblau) x Volumenfaktor der Zählkammer (10^4)

bestimmt.

2.2.3 Subklonierung von Zelllinien

Zur Subklonierung wurden Zellen in einer theoretischen Zelldichte von 0,3 - 1 Zelle in 50 μ l Medium auf mehrere 96-well Flachbodenplatten ausgesät. Nach 8 - 10 h wurden die Platten auf einzelne Zellen innerhalb einer Vertiefung mikroskopisch untersucht. So identifizierte Einzelklone wurden schrittweise durch Überführung auf 48-, 24-, und 6-well Platten expandiert.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen kurzfristig aufzubewahren, wurden diese bei -80°C gelagert. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, geerntet und in 1 ml 4°C kaltem Einfriermedium (90 % hitzeinaktiviertem FCS, 10 % DMSO) so resuspendiert, dass eine Konzentration von 2 - 10 x 10⁶ Zellen / ml resultierte. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanolkühler, der eine definierte Absenkung der Temperatur von 1°C/min ermöglichte, bei -80°C eingefroren.

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden die Kryoröhrchen nach 24 h in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Das angetaute Zellpellet wurde dann in 4°C kaltem Medium resuspendiert und in 50 ml kaltes Medium gebracht. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 200 x *g*. Das Zellpellet wurde in 37°C warmem Vollmedium resuspendiert und in Kulturgefäßen ausgesät.

2.2.5 Kultivierung antikörperproduzierender Zellen

Murine Hybridome wurden entweder in IMDM-Vollmedium kultiviert oder schrittweise auf serumfreies Medium (Hybridoma-SFM) adaptiert. Die Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen expandiert. Damit wurden 3-Bodenflaschen *triple flasks* angeimpft und diese schrittweise auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt.

Die Ernte des Zellkulturüberstandes erfolgte nach ca. 7 Tagen, wenn nur noch ungefähr 20% viable Zellen nachgewiesen werden konnten (Trypanblaufärbung).

Der Zellkulturüberstand wurde zweimal bei 6000 x *g* für 15 min zentrifugiert, um viable Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Anschließend wurde der Überstand mit NaOH (10 M) auf einen pH-Wert von 8,0 (für eine Reinigung an Protein A), bzw. 7,5 (für eine Reinigung an Kappa-Select) eingestellt und mit NaN₃ (Enkonzentration 0,02 %) versetzt. Der Überstand wurde mittels Bottle-top Filter (0,22 µm Porengröße) sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.6 Isolation von peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC)

Für verschiedene funktionelle Tests wurden periphere mononukleäre Zellen des Blutes (*engl.* peripheral blood mononuclear cells, PBMC) als Effektorzellen benötigt. Diese wurden aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Der verwendete Ficoll-Dichtegradient (1,077 g/ml) trennt Erythrozyten und Granulozyten, die durch ihr größeres spezifisches Gewicht am Boden sedimentieren, von mononukleären Zellen (Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten), die sich in der Interphase sammeln und dort isoliert werden konnten.

Um PBMC zu isolieren, wurde heparinisiertes Vollblut im Verhältnis 1:2 mit DPBS verdünnt und je 25 ml davon über 15 ml einer vorgelegten Ficoll-Lösung (BiocollTM Separation Solution) geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation mit 600 x *g* für 30 Minuten. Nach Abnahme der Interphase mit einer 10 ml-Plastikpipette wurden die Zellen zweimal in 50 ml DPBS gewaschen (jeweils 10 min bei 300 x *g* bzw 200 x *g*), um Verunreinigung durch Ficoll-Reste und Erythrozyten zu entfernen. Der letzte Waschschritt diente dabei zur Abtrennung von Thrombozyten, die bei dieser *g*-Zahl kaum sedimentieren.

Die so isolierten PBMC wurden anschließend in ein entsprechendes Volumen Vollmedium überführt und unter Trypanblau zur Bestimmung der Lebendzellzahl, sowie Tuerk'scher Lösung (10 µl Zellsuspension + 90 µl Tuerk'sche Lösung) zur Bestimmung der Leukozytenzahl gezählt.

2.2.7 Zellseparation mittels magnetischer Partikel

Zur Separierung und Isolation von Zellpopulationen aus PBMC-Präparationen wurden magnetische Partikel in Form von MACS-Kits verwendet.

Dendritische Zellen gesunder Spender wurden unter Verwendung des *Blood DC Isolation Kit II* aus *Buffy coat*-Präparationen gesunder Spender isoliert.

T-Zellen gesunder Spender wurden unter Verwendung des *Pan T cell Isolation Kit II* aus PBMC-Präparationen gesunder Spender isoliert.

AML-Blasten wurden durch die Verwendung von CD33- und CD34-*Microbeads* von normalen Effektorzellen in PBMC-Präparationen von AML-Patienten getrennt.

2.2.8 Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurden 40 bis 90 μg der entsprechenden Expressionsplasmide zuvor linearisiert, wobei sich die Restriktionsschnittstelle vorzugsweise innerhalb des β -Lactamase-Gens, dass für die Ampicillinresistenz verantwortlich ist, befand. Nach der präparativen Linearisierung der DNA wurde diese mittels Phenol/Chloroform-Extraktion von Verunreinigungen gesäubert und nach Fällung in 30 μl H_2O (bidest.) aufgenommen.

Die zu transfizierenden Sp2/0-Ag14-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion noch einmal subkultiviert, um eine optimale Viabilität zu erreichen. Für die Transfektion wurden $1\text{-}2 \times 10^7$ Zellen geerntet und dreimal in kaltem IMDM-Medium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 200 μl kaltem IMDM-Medium resuspendiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 4 mm) überführt. Die Zellsuspension wurde mit 25 μl der linearisierten DNA (10 μl *Ighg*-Kette und 15 μl *Ig κ* -Kette) versetzt.

Die Parameter für die Elektroporation von Sp2/0-Ag14-Zellen waren 230 V und 975 μF . Notiert wurde der vom Gerät ermittelte Widerstand der Zell-DNA-Suspension, die an der Küvette anliegende Spannung, sowie die Zeitkonstante. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes IMDM-Komplettmedium überführt und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 in einem Volumen von jeweils 50 μl auf 96-well Flachbodenplatten ausplattiert.

Zur Selektion der positiv-transfizierten Klone wurde jedes well nach 24 h mit dem Antibiotikum G418 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt. Nach ca. 8 Tagen erfolgte eine erste optische Kontrolle der Platten unter dem Mikroskop auf proliferierende Einzelklone. Die Kulturüberstände von Einzelklonen wurden mittels Durchflusszytometrie auf Antikörpersekretion und Spezifität überprüft.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmid-Päparation

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung kommerzieller Kits von Qiagen, Hilden. Grundlage ist ein modifiziertes Protokoll der alkalischen Lyse [Birnboim, 1983].

Je nach gewünschter Menge und Reinheit der Plasmid-DNA wurde entweder das QIAprep[®] Spin Plasmid-DNA Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder das QIAGEN[®] Plasmid-DNA Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Plasmidpräparation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2 Extension von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Um DNA-Fragmente zu verlängern und spezifische Restriktionsschnittstellen einzufügen, wurden überhängende Primer verwendet, die über mindestens 30 Basen komplementär zum Ausgangsfragment waren und eine Gesamtlänge von 40 bis 50 Basen aufwiesen. Auf diesem Wege konnten DNA-Fragmente um ca. 20 Basen definierter Sequenz verlängert werden. Sollten längere Sequenzen angefügt werden, wurden mehrere PCRs mit verschiedenen Primern nacheinander durchgeführt.

Als Polymerase wurde die *Vent*-Polymerase eingesetzt. Die Reaktionen wurden als *Hot start* durchgeführt, d.h. die Polymerase wurde erst nach einem Denaturierungsschritt (5 min, 96°C) direkt in das Reaktionsgefäß pipettiert. Dadurch werden unspezifische Amplifikate, die aufgrund von Primeranlagerung und Verlängerung durch die Polymerase während der Heizphase entstehen, verhindert.

Die Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 100 μ l und wurden mit Mineralöl überschichtet.

| | |
|-----------------------------|----------------|
| Template-DNA | 1 - 5 μ l |
| Primer forward (10 μ M) | 1 μ l |
| Primer reverse (10 μ M) | 1 μ l |
| dNTP-Stocklsg. (10 mM) | 4 μ l |
| 10x Puffer | 10 μ l |
| Vent-Polymerase | 1,5 μ l |
| H ₂ O (bidest.) | ad 100 μ l |

Das PCR-Profil wurde folgendermaßen gewählt:

| | | |
|-------|--------|-----|
| 96°C | 5 min | |
| <hr/> | | |
| 96°C | 30 sek | |
| 66°C | 30 sek | 30x |
| <hr/> | | |
| 72°C | 1 min | |
| <hr/> | | |
| 72°C | 10 min | |

2.3.3 Reinigung der Nukleinsäuren

Analytische und präparative Auftrennung von DNA in Agarosegelen

In der Agarosematrix wandern DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die Auftrennung erfolgte in 1 % (w/v) Agarosegelen in 1x TAE mit 1 bis 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid. Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurden zuvor, je nach Länge des erwarteten Fragmentes mit einem Fünftel Volumenanteil eines 6-fach Ladepuffers (Bromphenolblau), bzw. mit einem Neuntel Volumenanteil eines 10-fach DNA Ladepuffers (Orange G) versetzt.

Als Größenmarker wurden 1kB bzw. 100bp DNA-Leitern verwendet. Der verwendete Laufpuffer war 1x TAE-Puffer.

Die Auftrennung erfolgte für analytische Gele bei 140 V (konstant), für präparative Gele bei 100 V (konstant).

Die DNA-Banden wurden nach erfolgter Trennung unter UV-Licht bei 312 nm durch die Fluoreszenz des in der DNA-Helix interkalierten Ethidiumbromids visualisiert.

Präparation von DNA aus Agarose-Gelen

Sollten aufgetrennte DNA-Fragmente aus präparativen Agarose-Gelen isoliert werden, so wurden die Banden mit einem sauberen Skalpell unter möglichst kurzer UV-Belichtung ausgeschnitten und bis zu einer Länge von ca. 10 kB unter Verwendung des QIAquick[®] Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus der Agarose eluiert. Das System verwendet Säulchen mit einer Silicamembran, die die DNA unter Hochsalzbedingungen bindet und von der die DNA nach Waschschritten durch Nidrigsalzpuffer oder H₂O (bidest.) eluiert wird.

Die Eluate wurden entweder direkt weiterbearbeitet oder bei -20°C gelagert.

Sollten Fragmente mit einer Länge über 10 kB präpariert werden, wurden diese über Nacht mittels Elektroelution unter Verwendung des BioTrap-Kits bei einer Spannung von 80 V aus der Agarosematrix eluiert. Die DNA-Lösung wurde anschließend in Zentrifugen-Filtereinheiten (Centricons, 10 kDa Ausschlussgröße) ankonzentriert und gegen H₂O (bidest.) umpuffert.

Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Vor der Transfektion von eukaryotischen Zellen mit linearisierter Vektor-DNA wurde diese durch Phenolextraktion von hydrophoben Verunreinigungen und Proteinen gereinigt. Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde dazu mit einem Volumenanteil einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) versetzt, ausgiebig geschüttelt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten folgten drei Extraktionen mit je 1 Volumen Chloroform.

Die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase wurden mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen eiskaltem 100% Ethanol (nach Durchmischung durch Schütteln) für mindestens 1,5 h bei -80°C gefällt. Nach kurzem Mischen und Pelletierung der Nukleinsäuren in einer Tischzentrifuge (13.000 rpm, 60

min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in H₂O (bidest.) aufgenommen.

2.3.4 Behandlung der Nukleinsäuren

Ligation von DNA-Enden

Die Ligation von kompatiblen DNA-Enden erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase, wobei das molare Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA ca. 5:1 betrug. Die Reaktionen wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

T/A-Klonierung in pGEM[®]-T Easy PCR-Amplikons, die unter Verwendung der Taq-Polymerase synthetisiert wurden, konnten durch den 3'-A-Überhang in den pGEM[®]-T Easy-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert werden. Dazu wurden 1 µl (50 ng) Vektor-DNA mit 3 µl DNA-Lösung (aus Gelextraktion), 5 µl 2x Rapid Ligation Puffer (mit ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend direkt zur Transformation kompetenter Bakterien (siehe 2.3.4) eingesetzt.

Stumpfe Ligation in pPCR-Script PCR-Amplikons, die unter Verwendung der Vent-Polymerase synthetisiert wurden, konnten stumpfend in den geöffneten pPCR-Script Amp SK(+)-Vektor (Stratagene, Heidelberg) kloniert werden. Dazu wurden 1 µl (10 ng) des geöffneten Vektors mit 5 µl DNA-Lösung (aus Gelextraktion), 1 µl 10x Puffer, 1 µl rATP (10mM), 1 µl SrfI-Restriktionsenzym (5 U/µl) und 1 µl T4-DNA-Ligase (4 U/µl) versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Das Restriktionsenzym SrfI schneidet dabei ohne das einzufügende DNA-Fragment religierten Vektor. Die Reaktionen wurden im Anschluss direkt zur Transformation kompetenter Bakterien (siehe 2.3.4) eingesetzt.

Ligation komplementärer Überhänge: Klonierung von cDNA-Fragmenten in Expressionsvektoren Für die Ligation von cDNA-Fragmenten in den entsprechenden Expressionsvektor wurden sowohl Vektor als auch Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, die DNA aufgereinigt und der Vektor mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Insert versetzt. Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA betrug dabei 25 ng bis 50 ng. Zur Berechnung der benötigten Menge an Insert-DNA wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}}[\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]$$

Die so berechneten Volumina an Vektor- und Insert-DNA-Lösungen wurden mit 10x T4 DNA-Ligasepuffer, 1µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) versetzt und mit H₂O (bidest.) auf ein Volumen von 10 bzw. 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

Verdau der Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen

Analytischer Verdau Der analytische Verdau wurde eingesetzt, um Bakterienklone auf die Insertion des gewünschten DNA-Fragments in ein Plasmid zu

testen. Auch zur analytischen Linearisierung von Plasmiden wurden diese mit einem einfach-schneidenden Restriktionsenzym verdaut.

Alle analytische Reaktionen wurden in einem Volumen von 10 μl für 30 min bei der optimalen Temperatur des verwendeten Enzyms inkubiert.

| | |
|----------------------------|---------------------|
| Plasmid-DNA | 1 μl |
| 10x Reaktionspuffer | 1 μl |
| Restriktionsendonuklease | 10 U |
| H ₂ O (bidest.) | ad 10 μl |

Sollte ein Plasmid mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut werden, wurde, wenn möglich, ein Doppelverdau im selben Ansatz durchgeführt.

Präparativer Verdau Sollten DNA-Fragmente aus Plasmiden isoliert werden, wurden präparative Ansätze mit einem Endvolumen von 50 μl verwendet. Diese Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und mindestens 6 h, meist aber über Nacht bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert.

| | |
|-------------------------------|--|
| Plasmid-DNA | 10 - 15 μl (ca. 4 - 8 μg) |
| 10x Reaktionspuffer | 5 μl |
| BSA 100x (NEB), wenn benötigt | 0,5 μl |
| Restriktionsendonuklease | 10 U |
| H ₂ O (bidest.) | ad 50 μl |

Auch hier wurde falls nötig und möglich ein Doppelverdau mit beiden Enzymen im selben Reaktionsansatz durchgeführt.

Die Auftrennung und Isolierung der Fragmente erfolgte wie in 2.3.3 und 2.3.3 beschrieben.

Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden Einzelklone, ausgehend von einem Glycerolstock des *E. coli*-Stammes DH5 α , über Nacht in 5 ml LB-Medium (bei 250 rpm, 37°C) inkubiert. 50 μl dieser Übernachtskultur wurden daraufhin in 5 ml LB-Medium überführt und für weitere 1-2 Stunden kultiviert (250 rpm, 37°C). Nach Zugabe von weiteren 95 ml LB-Medium erfolgte die Kultivierung bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{550nm}) von 0,2 bis 0,3, woraufhin die Kultur pelletiert (1560 x g, 10 Minuten, 4°C) wurde. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml kaltem TfbI-Puffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Pelletierung (700 x g, 5 Minuten, 4°C) wurden die Zellen in 4 ml TfbII-Puffer zügig resuspendiert und Aliquots zu je 150 μl bei -80°C eingefroren.

Transformation kompetenter *E. coli* (DH5 α) mit Plasmid-DNA

Die kompetenten Bakterien (siehe 2.3.4) wurden bei -80°C gelagert und vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden 10 μl der Plasmid-DNA gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 45 Minuten erfolgte ein Hitzeschock für 1 Minute bei 42°C. Daraufhin wurden 400 μl LB-Medium zu den Zellen gegeben und

diese für 1 h bei 37°C im Horizontalschüttler (200 rpm) zur Ausbildung der Ampicillinresistenz inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Amp-Platten bzw. zur Blau-Weiß-Selektion auf LB-Amp-Platten mit 20 μl einer 10% (w/v) X-Gal-Lösung (in DMF) und 20 μl IPTG (0,1M) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Anlegen von Bakterienkulturen

Die Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt. Zur Lagerung der Klone bei 4°C wurden diese auf eine Sobag-Platte übertragen („Masterplatte“). Mit derselben Pipettenspitze wurde dann die Flüssigkultur in 5 ml LB-Amp-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin, + 25 mM Glucose) angeimpft und für 16 h bei 37°C mit 250 rpm im Horizontalschüttler angezogen.

Um Expressionsvektoren zur Transfektion von eukaryotischen Zellen in großer Menge und hoher Reinheit zu erhalten, wurden Maxikulturen angelegt. Die Vorkulturen wurden in 5 ml LB-Amp-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 8 h kultiviert. Davon ausgehend wurden mit 200 μl der Vorkultur 200 ml LB-Amp-Medium angeimpft und für 16 h bei 37°C und 250 rpm im Horizontalschüttler inkubiert. Gleichzeitig wurden zur längeren Aufbewahrung 800 μl der Vorkulturen mit 200 μl Glycerin (sterilfiltriert) versetzt und bei -80°C gelagert.

Nicht-radioaktive Sequenzierung

Doppelsträngige DNA wurde extern von der Firma Microsynth (Balgach, CH) sequenziert. Die Sequenzierung beruht auf der von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchmethode [Sanger *et al.*, 1977], ersetzt allerdings die radiokativ markierten Didesoxynukleotide durch Fluoreszenzmarkierte.

Zu sequenzierende Plasmid-Präparationen wurden dabei mit dem entsprechenden Primer (1,2 μg DNA und 30 pmol Primer in 15 μl ddH₂O) versetzt und per Post an Microsynth versendet. Die Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgte unter Verwendung der Software GATC Viewer (GATC-Biotech, Konstanz).

2.4 Generierung von Hybridomen

Die Generierung von Antikörper-sekretierenden Hybridomzelllinien beruht auf der von G. Köhler und C. Milstein im Jahr 1975 beschriebenen Methode der chemischen Zellfusion von B-Zellen einer immunisierten Maus mit einer Myelomzelllinie. Hierbei werden Mäuse mit dem Antigen, gegen welches Antikörper generiert werden sollen, mehrmals immunisiert. Die Milz der Mäuse wird daraufhin entnommen und die Milzzellen unter Einfluss von Polyethylenglykol mit Zellen der Myelomzelllinie fusioniert. Die so entstehenden Zellhybride werden kultiviert und subkloniert, um monoklonale Hybridome zu erhalten.

2.4.1 Immunisierung von Mäusen

BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäuse wurden mit syngenen, bzw. allogenen (Sp2/0-Ag14) oder xenogenen (CHO) Zellen, welche das durch Transfektion eingebrachte Antigen OX40 exprimieren, immunisiert. Dabei wurden 5×10^6 (Sp2/0-OX40) bzw. 20×10^6 (CHO-OX40) Zellen in 200 μl PBS wiederholt intraperitoneal appliziert. 3 bis 4 Immunisierungen erfolgten im Abstand von mindestens 14 Tagen. Die finale Applikation erfolgte 4 Tage vor der Fusion.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden beim zuständigen Regierungspräsidium nach §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt.

2.4.2 Zellfusion

Die als Fusionspartner verwendete Zelllinie Sp2/0-Ag14 wurde in Fusionsmedium mit Zellkonzentrationen von max. $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml kultiviert. 3 Tage vor der chemischen Fusion wurden die Zellen in Fusionskomplettmedium (5% FCS) überführt. Am Tag der Fusion wurden die Sp2/0-Ag14-Zellen mindestens 3 mal in Fusionswaschmedium gewaschen (5 Minuten, 200 x g).

Immunisierte Mäuse wurden durch lethale CO_2 -Inhalation getötet und die Milz unter aseptischen Bedingungen entnommen. Zur Herstellung von Einzellsuspensionen wurde die Milz durch ein steriles Teesieb in Fusionswaschmedium gedrückt. Die Zellsuspension wurde nach ca. 3 Minuten über abgesunkenen, großen Gewebestücken abgenommen, gewaschen (10 Minuten, 400 x g), und die Zellkonzentration unter Tuerk'scher Lösung bestimmt. Für die Fusion wurden 20×10^6 Milzzellen mit 5×10^6 Sp2/0-Ag14-Zellen in Fusionswaschmedium in einem 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen gemischt und pelletiert (10 Minuten, 400 x g).

Der Überstand über dem Zellpellet wurde komplett abgenommen, die Zellen durch leichtes Klopfen gelöst und mit 1 ml PEG1500 (bei 37°C vorgewärmt) versetzt. Die Röhrchen wurden von nun an kontinuierlich geschwenkt. Nach 45 Sekunden erfolgte die Zugabe von Fusionswaschmedium nach folgendem Schema:

- nach jeweils 20 Sekunden Zugabe von 100 μl Fusionswaschmedium über 1 Minute
- nach jeweils 15 Sekunden Zugabe von 100 μl Fusionswaschmedium über 1 Minute

- nach jeweils 10 Sekunden Zugabe von 100 μl Fusionswaschmedium über 1 Minute
- nach jeweils 5 Sekunden Zugabe von 100 μl Fusionswaschmedium über 1 Minute

Nach dieser Verdünnung wurden die Röhren auf ein Volumen von 50 ml mit Fusionskomplettmedium aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen erneut pelletiert (10 Minuten, 200 x g) und in 30 ml Fusionskomplettmedium vorsichtig resuspendiert, sowie auf 96-well Flachbodenplatten ausgebracht (100 μl /well).

Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von 100 μl Fusions-HAT-Medium (2x). Die Zellen wurden für weitere 10 bis 14 Tage bei 37°C, 5% CO₂ (Platten in Seranfolie verpackt) inkubiert.

2.4.3 Testung von Hybridomüberständen und Subklonierung

Nach 10 Tagen erfolgte die erste visuelle Kontrolle der Platten auf sichtbare Kolonien. Überstände dieser Kolonien wurden durchflusszytometrisch auf Antikörper-Produktion und -Spezifität untersucht. Positive Kolonien wurden durch Verdünnungsreihen in Fusions-HT-Medium subkloniert und daraus resultierende Einzelklone erneut durchflusszytometrisch getestet. So generierte monoklonale Hybridomlinien wurden kryokonserviert und zur Produktion monoklonaler Antikörper expandiert.

2.5 Chromatographische Verfahren

2.5.1 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A

Um monoklonale Antikörper aus Zellkulturüberstand aufzureinigen, wurde eine mit 0,1 M Phosphatpuffer (150 mM NaCl, pH 8,0) äquilibrierte Protein A Säule verwendet.

Protein A ist ein Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, der mit unterschiedlicher Affinität an Fc-Teile von Ig γ -Antikörpern verschiedener Spezies bindet. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt durch Änderung des pH-Wertes und / oder der Ionenstärke.

Der zentrifugierte und gefilterte Zellkulturüberstand (siehe 2.2.5) wurde unter Zugabe von NaOH auf pH 8,0 eingestellt und anschließend mit einer Flussgeschwindigkeit von 50 ml/h auf die Säule aufgetragen. Sowohl das Auftragen, wie auch das Waschen der Säule und die Elution wurden kontinuierlich unter Verwendung eines Durchflussspektrometers durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm überwacht. Um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, folgte ein Waschschritt mit Phosphatpuffer (0,1 M, 150 mM NaCl, pH 8). Zur Elution des gebundenen Antikörpers wurde zuerst 0,05 M Citratpuffer (pH 4,2) auf die Säule aufgetragen und die proteinhaltige Fraktion aufgefangen. Es folgte eine weitere Elution mit 0,05 M Citratpuffer (pH 2,2), um weiteres Protein von der Säule zu lösen. Die Fraktion wurde ebenfalls aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit DPBS (pH 7,4; 0,01 % NaN₃) gespült und konserviert.

2.5.2 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an KappaSelect

Einige der hier generierten Antikörpermoleküle tragen mutierte C_H2-Domänen, die eine stark verminderte Bindung zu Fc-Rezeptoren aufweisen. Diese Moleküle zeigen gleichzeitig keine Bindung an Protein A. Die Reinigung aus Zellkulturüberstand erfolgte deshalb unter Verwendung von KappaSelect als stationärer Phase. Dabei handelt es sich um rekombinantes Protein, welches selektiv die konstante Domäne leichter (kappa) Ketten humaner Antikörper bindet.

Die Affinitätschromatographie von zellfreiem Kulturüberstand (0,22 μ m filtriert, pH 7,5, siehe 2.2.5) erfolgte dabei prinzipiell wie oben beschrieben (2.5.1, wobei die Äquilibrierung der Säule mit DPBS, pH 7,4, und die Elution rekombinanter Antikörper unter Verwendung von 0,1 M Glycinpuffer (pH 2,4) erfolgte.

2.5.3 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Das aufgefangene Eluat wurde sofort in einen Dialyseschlauch überführt und mindestens 12 Stunden unter Rühren bei 4°C gegen 1 l DPBS dialysiert.

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels NanoDrop

Das dialysierte Eluat wurde unter Verwendung eines Spritzenvorsatzfilters (0,22 μm) sterilfiltriert und die Konzentration unter Verwendung eines NanoDropTM 1000-Spektrophotometers (Extinktionskoeffizient „IgG“) bestimmt. Dabei wurden mindestens drei Proben vermessen und der Mittelwert der Proteinkonzentration errechnet.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Analytische Gelfiltration

Antikörperpräparationen wurden mittels analytischer Gelfiltration auf Homogenität, sowie hinsichtlich apparentem Molekulargewicht, Aggregation und Degradation untersucht. Verwendet wurde dabei eine SUPERDEX200TM PC3.2/30 Säule in einem SMART System. Die Proteine wurden dabei in einem Volumen von 40 μ l DPBS mittels eines 50 μ l Loops aufgetragen. Aufgetrennt wurden die Proben mit einer Flussrate von 40 μ l pro Minute in DPBS. Die Retention auf der Säule wurde durch die Messung der Absorption bei 220 nm und 280 nm ermittelt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts einzelner Fraktionen wurden Eichproteine definierter Größe verwendet. Anhand der Abhängigkeit des Elutionsvolumens (in ml) vom Molekulargewicht der Eichproteine (\log_{10} Molekulargewicht in kDa) konnte eine lineare Kalibriergerade erstellt werden.

2.6.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der Reinheit einer Proteinlösung, sowie zur Bestimmung des Molekulargewichtes der enthaltenen Proteine, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt. Dabei erfolgt die Auftrennung der Proteine nur anhand ihres Molekulargewichtes, da durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine ein konstantes Verhältnis zwischen Masse und Ladung aufweisen.

Die SDS-PAGE wurde sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen eingesetzt. In beiden Fällen wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer (2x) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Als reduzierendes Agens wurde β -Mercaptoethanol im Ladepuffer verwendet. Durch die Reduzierung von Disulfidbrücken kommt es bei Antikörpern zur Dissoziation von schwerer und leichter Kette, welche dann getrennt im Gel nachgewiesen werden können. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in 10% Mini-PROTEAN[®]TGX Precast Gelen unter Verwendung einer Mini-PROTEAN[®]TetraCell bei 120V für ca. 2 Stunden.

Die Visualisierung der Proteinbanden wurde durch eine Coomassie Brilliant Blue Färbung erreicht. Nach der Färbung und Entfärbung wurden die Gele für 10 Minuten in Gel Trocknungslösung eingelegt, und anschließend zwischen Cellophan-Membranen getrocknet.

2.6.3 Durchflusszytometrie

Die Markierung von Zellen erfolgte sowohl mit direkt-konjugierten, als auch mit unkonjugierten Antikörpern. Pro Messpunkt wurden zwischen 0,1 und 1×10^6 Zellen verwendet. Die Färbung erfolgte in 96well Rundbodenplatten, zur Pellettierung der Zellen wurden diese für 3 Minuten bei 600 x *g* zentrifugiert. Überstände wurden danach schwungvoll abgeschüttet. Alle Inkubationen erfolgten in 50 μ l FACS-Puffer im Dunkeln bei 4°C für 30 Minuten. Unkonjugierte Antikörper wurden nach dreimaligen Waschen mit FACS-Puffer (200 μ l) mit den entsprechenden

Sekundärreagenzien markiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Wurden direkt-markierte Antikörper verwendet, so wurden diese nach Herstellerangaben verdünnt und ebenfalls in einem Volumen von 50 μl verwendet. Bei der Kombination von unkonjugierten und direkt-markierten Antikörpern erfolgte die Färbung mit direkt-markierten Antikörpern als letzte Inkubation.

Zur Identifizierung viabler Zellen wurden die Zellpellets in FACS-Puffer mit 7-AAD (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert.

Fc-Rezeptor-abhängige, unspezifische Bindung von Antikörpern wurde mit entsprechenden Isotypkontrollen überprüft. Wurde kein human-spezifisches Sekundärreagenz verwendet, wurden Fc-Rezeptoren mit humanem Ig γ (FleboGamma, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) in FACS-Puffer blockiert.

Durchflusszytometrische Analyse der induzierten Expressionsmodulation von FLT3

Um die durch die Bindung von Antikörpern induzierte Veränderung der Antigenexpression auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden 2×10^5 Zielzellen mit verschiedenen Konzentrationen der Antikörper 4G8SDIEM oder BV10SDIEM in 100 μl Komplettmedium für 24 oder 48 Stunden in 96well-Rundbodenplatten im CO₂-Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation folgte ein Waschschritt mit 200 μl FACS-Puffer, sowie die Inkubation mit saturierenden Konzentrationen der entsprechenden Primärantikörper (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für weitere 30 Minuten. Nach drei weiteren Waschschritten mit jeweils 200 μl FACS-Puffer erfolgte die Detektion gebundener Primärantikörper mit R-Pe-konjugiertem, polyklonalem Ziege- α -Human-Ig γ (1:100 verdünnt), sowie die Messung der Proben, wie unter 2.6.3 beschrieben. Entsprechende Isotyp- und Negativkontrollen wurden mitgeführt.

Durchflusszytometrische Analyse der Antikörperverdrängung durch FLT3-Ligand

Zum Nachweis einer Interaktion zwischen α FLT3-Antikörpern und dem FLT3-Liganden (FLT3L) wurden die Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von FLT3L in FACS-Puffer eingesetzt. Die Inkubation der Zielzellen erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zielzellen dreimal mit 200 μl FACS-Puffer gewaschen und gebundene Antikörpermoleküle mittels R-Pe-konjugiertem, polyklonalem Ziege- α -Human-Ig γ (1:100 verdünnt, 30 Minuten Inkubation) markiert. Die Analyse der Proben erfolgte nach weiterem zweimaligem Waschen auf einem FACSCalibur.

Quantitative Durchflusszytometrie

Die absolute Quantifizierung gebundener Antikörpermoleküle auf der Oberfläche von Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte über die Mitführung von Kalibrierpartikeln (QIFIKIT). Dabei handelt es sich um Partikelpopulationen, die

mit unterschiedlichen, aber genau definierten Mengen eines monoklonalen Maus-IgG-Antikörpers beschichtet sind. Über die so ermittelten Fluoreszenzintensitäten der Partikel in Abhängigkeit von der Anzahl der Moleküle pro Partikel kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Dies ermöglicht die Berechnung der Anzahl gebundener Antikörper pro analysierter Zelle. Dieses System ist allerdings nur für die Quantifizierung von Maus-Antikörpern verfügbar.

Zu analysierende Zellen wurden, wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben, mit sättigenden Konzentrationen unmarkierter Maus-Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen, wie auch die Kalibrierpartikel mit *R*-PE-konjugiertem, polyklonalem Ziege- α -Maus-Ig γ und Ig μ (1:100 verdünnt) versetzt und erneut 30 Minuten inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte nach weiteren zwei Waschschritten, wobei die Sensitivität der Fluoreszenzdetektoren des Durchflussszytometers anhand der Kalibrierpartikel justiert wurde.

Die Berechnung der gebundenen Antikörpermoleküle pro Zelle erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Bestimmung der Konzentration therapeutischer Antikörper in klinischen Serumproben

Die Bestimmung des Titers freier 4G8SDIEM-Moleküle in Serumproben von AML-Patienten erfolgte durchflusszytometrisch durch Messung der Bindung auf FLT3⁺ Zellen (REH und NALM-16). Jede Serumprobe wurde dabei in drei Verdünnungen (1:2, 1:10; 1:100), hergestellt in FACS-Puffer, analysiert. Als Vergleichsstandard diente dabei in autologem Serum (entnommen vor Therapiebeginn) verdünnter 4G8SDIEM, wobei Standardkurven in 50%, 10% und 1% Serum erstellt wurden. Alle Proben wurden wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben bearbeitet, wobei als Sekundärreagenz ein polyklonaler *R*-PE-konjugiertes Ziege- α -Human-Ig γ -Antikörper diente.

2.7 Funktionelle Charakterisierung von Antikörpern

2.7.1 ^{51}Cr -Freisetzungstest

Zur Messung von Zytotoxizität wurde der ^{51}Cr -Freisetzungstest verwendet. In diesem Test werden Zielzellen mit ^{51}Cr -Natriumchromat (Na_2CrO_4) inkubiert. Dabei nehmen die Zellen Cr^{6+} auf, welches im Zytoplasma zu Cr^{3+} reduziert wird. Das Cr^{3+} bindet dann an u.a. an Aminosäuren. Diese Komplexe werden von viablen Zellen nur langsam abgegeben. Kommt es jedoch zur Zellyse, so wird das gebundene Cr^{3+} in den Überstand abgegeben. Durch die Menge des im Überstand nachgewiesenen Cr^{3+} konnte dann das Maß der Zellyse unter Verwendung folgender Formel bestimmt werden.

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}}{\text{cpm}_{\text{maximale Freisetzung}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}} * 100$$

Die Zielzellen wurden geerntet und in frischem Kulturmedium aufgenommen (10^6 Zellen in 1 ml). Die Inkubation erfolgte in 100 - 150 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ Na_2Cr_4 für 1 Stunde bei 37°C . Die Zellsuspension wurde danach mit Vollmedium auf ein Endvolumen von 12 ml aufgefüllt und nochmals 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit jeweils 12 ml Medium gewaschen und auf 96-well-Flachbodenplatten ausplattiert (5 - 10^3 Zellen / 100 μl).

Zur Bestimmung der antikörpervermittelten Zytotoxizität wurden die zu testenden Antikörper in den entsprechenden Konzentrationen in einem Volumen von 50 μl , sowie PBMC gesunder Spender in definiertem Effektor-Zielzellen-Verhältnis (10:1 bis 50:1) in einem Volumen von 50 μl zugegeben.

Die Inkubation der Kokulturen erfolgte bei 37°C , 5% CO_2 , und 90% Luftfeuchtigkeit in einem CO_2 -Begasungsbrutschrank für 4 - 20 Stunden. Es wurden pro Zeitpunkt 50 μl Überstand entnommen und auf eine Feststoffszintillationsplatte (Lumaplate) transferiert. Diese wurde bis zur vollständigen Trocknung bei 50°C im Trockenschrank gelagert und anschließend im β -Zähler ausgewertet.

Für die Berechnung wurden Messpunkte zur Bestimmung der Spontanfreisetzung (Zielzellen in Vollmedium) und der maximalen Freisetzung von ^{51}Cr (Zielzellen in Vollmedium mit PBMC und 1% Triton X-100 (Endkonzentration)) mitgeführt.

Alle Tests wurden in einem Endvolumen von 200 μl und alle Messpunkte als Triplikate angesetzt.

2.7.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der antikörpervermittelten Zellyse

Für diese Versuche wurden 1×10^5 Zellen pro well einer 96well Flachbodenplatte zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen der zu untersuchenden

Antikörper in einem Gesamtvolumen von 250 μl inkubiert (37°C, % CO_2). Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und auf eine 96well Rundbodenplatte überführt, die Zellen pelletiert (600 x g , 3 Minuten) und in 200 μl FACS-Puffer (mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ humIgG) resuspendiert, um humane $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren abzusättigen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten (bei 4°C) wurden die Zellen erneut pelletiert (600 x g , 3 Minuten) und mit den erforderlichen direktmarkierten Antikörpern in einem Volumen von 50 μl gefärbt (30 Minuten, 4°C). Dabei wurden entsprechende Kontrollen (FMO, *engl.: Fluorescence minus one*), bei denen jeweils ein Antikörper durch die entsprechende Isotypkontrolle ersetzt wurde, mitgeführt. Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben. Als Kompensationskontrollen dienten einfach-gefärbte *Compensation Particles* (BD).

Nach Ablauf der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 200 μl FACS-Puffer (mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ humIgG) und Pelletierung der Zellen (600 x g , 3 Minuten). Die Zellpellets wurden dann jeweils in einem Volumen von 200 μl FK-Puffer resuspendiert.

Die Analyse der Proben erfolgte auf einem FACSCantoII. Dabei wurden die im FK-Puffer enthaltenen Partikel in der SSC-A/SSC-H-Darstellung identifiziert und eine Gesamtzahl von ca. 100.000 aufgenommenen Partikeln als Stopkriterium der Datenaufzeichnung definiert. Das analysierte Volumen jeder Probe konnte so standardisiert werden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der FlowJo-Software. Dabei wurden nacheinander viable (7-AAD⁻) und CD45⁺ Zellen selektiert. Aus dieser Zellpopulation erfolgte die Selektion von NK-Zellen (CD56⁺), sowie der Zielzellen (Kombinationen aus CD33, CD34, CD45, abhängig von den zu analysierenden Zellen). Die absolute Anzahl der Zellen der entsprechenden Populationen wurden zu Berechnungen der Zielzellyse und NK-Zellaktivierung herangezogen und auf die Zellzahlen in der Mediumkontrolle normiert.

2.7.3 Messung der Proliferation mittels ³[H]-methyl-Thymidin-Inkorporationsexperimenten

Messung der Proliferation primärer AML-Blasten

Für die Messung der Antikörper-induzierten Proliferation primärer AML-Blasten wurden 2×10^5 Zellen pro well einer 96well Flachbodenplatte zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen der zu untersuchenden Antikörper in einem Gesamtvolumen von 200 μl für 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO_2). Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von ³[H]-methyl-Thymidin (0,5 μCi / well) in einem Volumen von 50 μl RPMI. Die Zellen wurden nach weiteren 20 Stunden mittels eines Zell-Harvesters auf Filtermatten überführt. Inkorporiertes Thymidin wurde in einem 2450 Microplate Counter nach Zugabe des Szintillationscocktails *Ultima Gold* quantifiziert.

OX40-vermittelte Proliferation von T-Zellen

T-Zellen gesunder Spender wurden aus den PBMC durch negative Selektion unter Verwendung magnetischer Partikel (Pan T cell isolation Kit II) isoliert. So isolierte T-Zellen wurden über Nacht in 15 ml Zentrifugationsröhrchen bei einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml in IMDM-Komplettmedium bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurde der χ UCHT-1-Antikörper ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ in DPBS) auf einer 6well-Platte (2 ml pro well) über Nacht bei 4°C immobilisiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung von der 6well-Platte abgezogen und die wells zwei mal mit je 5 ml DPBS gespült. Anschließend wurde die T-Zell-Suspension auf die 6well-Platte aufgebracht und diese daraufhin für 2 Tage bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert.

Am Vorabend des Ablaufs der Inkubation wurde eine submitogene Konzentration von χ UCHT-1 auf 96well-Flachbodenplatten immobilisiert ($0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ in DPBS Endkonzentration). Sollten kostimulatorische Antikörper ebenfalls immobilisiert werden, wurden diese gleichzeitig inkubiert ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$ in DPBS Endkonzentration), wobei das Endvolumen in jedem well $100 \mu\text{l}$ betrug. Die Immobilisierung erfolgte über Nacht bei 4°C . Als Kontrollen wurden der agonistische $\alpha\text{CD}28$ -Antikörper 9.3, sowie rekombinanter OX40L (Endkonzentration $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) mitgeführt.

Die 96well-Platten wurden nach Ablauf der Inkubation entleert, mit $150 \mu\text{l}/\text{well}$ DPBS gewaschen und abschließend offen in der Sterilbank getrocknet. Kostimulatorische Antikörper in löslicher Form wurden anschließend in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ IMDM-Komplettmedium aufgebracht (Endkonzentration $5 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Die aktivierten T-Zellen wurden geerntet und mit IMDM-Komplettmedium gewaschen ($300 \times g$, 10 Minuten). Final wurden 5×10^4 Zellen pro well eingesät, wobei das Gesamtvolumen $150 \mu\text{l}$ pro well betrug. Die Platten wurden weitere 5 Tage bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert, wobei 16 Stunden vor Ablauf der Inkubation die Zugabe von ^3H -methyl-Thymidin ($1 \mu\text{Ci} / \text{well}$) in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ IMDM-Komplettmedium erfolgte.

Die Quantifizierung des inkorporierten Thymidins erfolgte wie im vorigen Abschnitt beschrieben.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Fc-optimierte α FLT3-Antikörper zur Therapie akuter myeloischer Leukämien

Ausgehend von den beiden neu-generierten SDIEM-optimierten α FLT3-Antikörpern 4G8SDIEM [Hofmann, 2009] und BV10SDIEM (Dr. E. Pyz, Universität Tübingen) sollte der zu bevorzugende Kandidat für erste klinische Studien mit Fc-optimierten Antikörpern zur Therapie von AML identifiziert werden. Die beiden Antikörper wurden dabei hinsichtlich Bindungsverhalten, Interaktion mit dem FLT3-Liganden (FLT3L), sowie ihrer Potenz zur Induktion der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (*engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) analysiert.

3.1.1 Bindung der chimärisierten Antikörper 4G8 und BV10 an FLT3

Die Analyse von Bindungsverhalten und Affinität der Antikörper erfolgte mittels Durchflusszytometrie auf den FLT3⁺ Zelllinien REH und NALM-16. Exemplarisch ist in Abb. 3.1 das Ergebnis eines solchen Experiments unter Verwendung von NALM-16-Zellen gezeigt. Hierbei wurden sowohl die chimärisierten Antikörper χ BV10 und χ 4G8, als auch deren Fc-optimierte Derivate BV10SDIEM und 4G8SDIEM analysiert. Dabei zeigten die chimärisierten und optimierten Versionen der jeweiligen Antikörper ein nahezu gleiches Titrationsverhalten. Lediglich die maximal-erreichte Fluoreszenz liegt bei den chimären Antikörpern etwas höher. Die Optimierung des Fc-Teils hat demnach keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Antikörper. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Antikörper χ 4G8 und 4G8SDIEM eine leicht höhere Affinität zu FLT3 aufweisen, als χ BV10 und BV10SDIEM. Dies wurde schon im Vorfeld beim Vergleich der entsprechenden parentalen Maus-Antikörper m4G8 und mBV10 beobachtet.

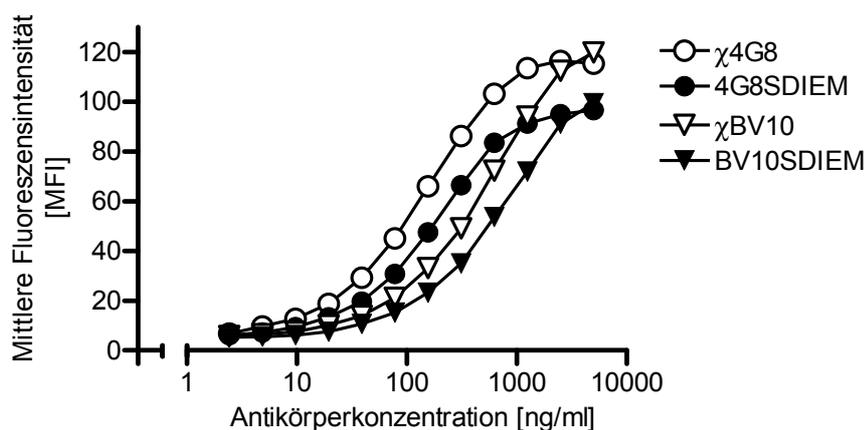


Abbildung 3.1: **Titration der chimären Antikörper 4G8 und BV10 auf NALM-16.** FLT3⁺ NALM-16 wurden mit steigenden Konzentrationen der chimären Antikörper 4G8 (○) und BV10 (▽), sowie der Fc-optimierten Versionen 4G8SDIEM (●) und BV10SDIEM (▼) inkubiert. Gebundene Antikörpermoleküle wurden mittels Markierung durch polyklonale, PE-markierte Ziege- α Human (Fc γ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmenten nachgewiesen.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Antikörper mit der Bindung des FLT3-Liganden interferieren. In Abb. 3.2 ist das repräsentative Ergebnis eines von vier Experimenten dargestellt.

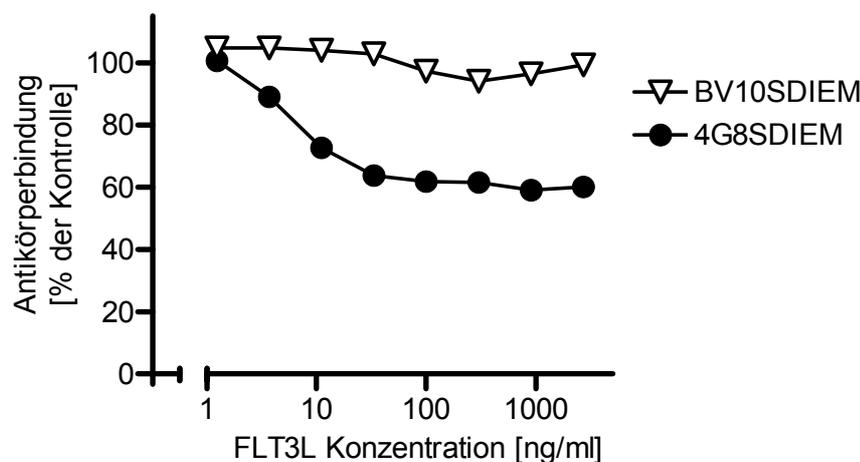


Abbildung 3.2: **Einfluss von FLT3L auf die Bindung von BV10SDIEM und 4G8SDIEM.** FLT3⁺ NALM-16-Zellen wurden gleichzeitig mit 1 μ g/ml der Antikörper 4G8SDIEM (●), bzw. BV10SDIEM (▽) und steigenden Konzentrationen FLT3L in FACS-Puffer bei 4°C inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels polyklonaler, PE-markierten Ziege- α Human (Fc γ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmenten.

Es zeigt sich, dass die Bindung von BV10SDIEM an FLT3 völlig unbeeinflusst von FLT3L bleibt. Im Gegensatz dazu kann die Bindung von 4G8SDIEM teilweise durch hohe Konzentrationen von FLT3L inhibiert werden. Dies deutet entweder auf die räumliche Nähe des von 4G8SDIEM-erkannten Epitops zur FLT3L Bindungsstelle, oder aber auf eine indirekte Maskierung des Epitops durch eine Konformationsänderung von FLT3 nach Ligandenbindung.

3.1.2 Antikörper-vermittelte Lyse FLT3-positiver NALM-16-Zellen

Das wesentliche Ziel der Generierung der Fc-optimierten Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM war die deutliche Verbesserung ihrer *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC)-Aktivität. Zur Charakterisierung und Messung dieser Aktivität wurden die Antikörper 4G8SDIEM und BV10SDIEM untereinander, sowie mit ihren chimärisierten Gegenstücken und anderen SDIEM-optimierten Antikörpern in ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen verglichen. Dabei dienten radioaktiv markierte NALM-16-Zellen als Zielzellen und PBMC gesunder Spender als Effektoren. In diesem und in weiteren Experimenten wurde der ebenfalls Fc-optimierte Antikörper 9.2.27SDIEM mitgeführt, welcher das Melanom-assoziierte Antigen NG2 (auch CSPG4 genannt) bindet und so als Kontrolle diente. Ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten ist in Abb. 3.3 dargestellt.

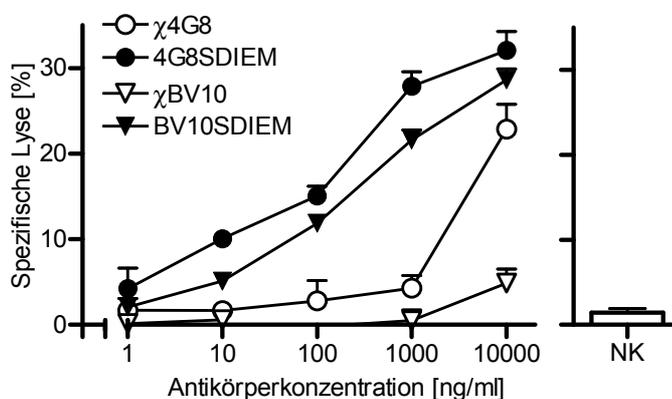


Abbildung 3.3: 4G8SDIEM- und BV10SDIEM-vermittelte zelluläre Zytotoxizität gegenüber NALM-16-Zellen. ^{51}Cr -markierte NALM-16-Zellen wurden mit PBMC eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:50 in Anwesenheit steigender Konzentrationen der chimären oder SDIEM-optimierten Antikörper 4G8 und BV10 inkubiert. Der Nachweis der Lyse der NALM-16-Zellen erfolgte nach vier Stunden durch die Messung des freigesetzten ^{51}Cr . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die SDIEM-optimierten Versionen der Antikörper, verglichen mit den chimärisierten Varianten, deutlich effektiver die Lyse der Zielzellen induzieren. In Experimenten mit verschiedenen PBMC-Spendern zeigt sich eine um einen Faktor 10 bis 1000 höhere ADCC-Effizienz der SDIEM-optimierten Antikörper verglichen mit den chimären Versionen, bezogen auf die benötigte Antikörperkonzentration zur Vermittlung einer effektiven Zielzellyse. Auch wurde in allen Experimenten deutlich, dass die 4G8-Antikörper, sowohl als chimäre, wie auch als SDIEM-optimierte Moleküle, bessere ADCC-Vermittler sind als die entsprechenden BV10-Derivate.

Die Überlegenheit von 4G8SDIEM gegenüber BV10SDIEM in der ADCC-Vermittlung, sowie die Interferenz der 4G8-Antikörper mit FLT3L führte zu der Entscheidung, 4G8SDIEM als erfolgsversprechenderen Kandidaten für klinische

Applikationen ausgiebiger zu analysieren.

In weiteren Experimenten wurde 4G8SDIEM mit dem α CD19-Antikörper 4G7SDIEM verglichen. NALM-16-Zellen exprimieren sowohl FLT3 als auch CD19 auf der Zellmembran. Die Expression der beiden Antigene konnte mittels quantitativer Durchflusszytometrie genauer bestimmt werden (siehe Abb. 3.4). Dabei zeigte sich, dass die Expression von CD19 mit ca. 25.000 Molekülen pro Zelle allerdings etwa vier-mal höher ist, als die Expression von FLT3 (ca. 6000 Moleküle pro Zelle).

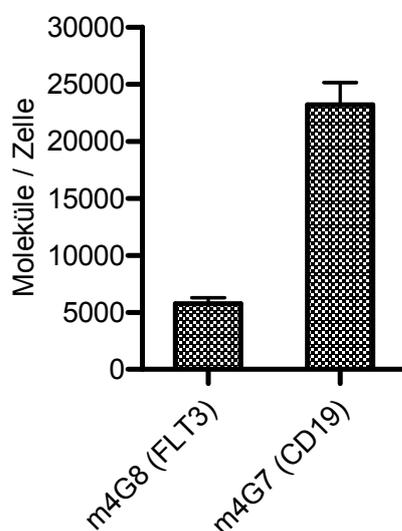


Abbildung 3.4: **Expression von FLT3 und CD19 auf NALM-16-Zellen.** NALM-16-Zellen wurden mit Antigen-sättigenden Konzentrationen der Antikörper m4G8 und m4G7, bzw. eines Kontrollantikörpers des Isotyps mIg γ 1 inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörpermoleküle erfolgte durch PE-markierte Ziege- α Maus (Ig γ - und Ig μ -spezifische) F(ab) $_2$ -Fragmente. Zur Quantifizierung gebundener Antikörper wurden Kalibrierungsbeads mitgeführt (QIFIKIT). Dargestellt sind absolute Molekülzahlen pro Zelle als Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, auf die sich die Standardabweichungen (als Fehlerbalken dargestellt) beziehen.

Im direkten Vergleich induzierte der α CD19-Antikörper 4G7SDIEM erwartungsgemäß nach 4 Stunden eine deutlich effektivere Lyse der NALM-16-Zellen, als 4G8SDIEM (vgl. Abb. 3.5, Teilabb.A). Unerwarteterweise zeigten jedoch beide Antikörper nach 20 Stunden vergleichbare Ergebnisse (vgl. Abb. 3.5, Teilabb.B). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

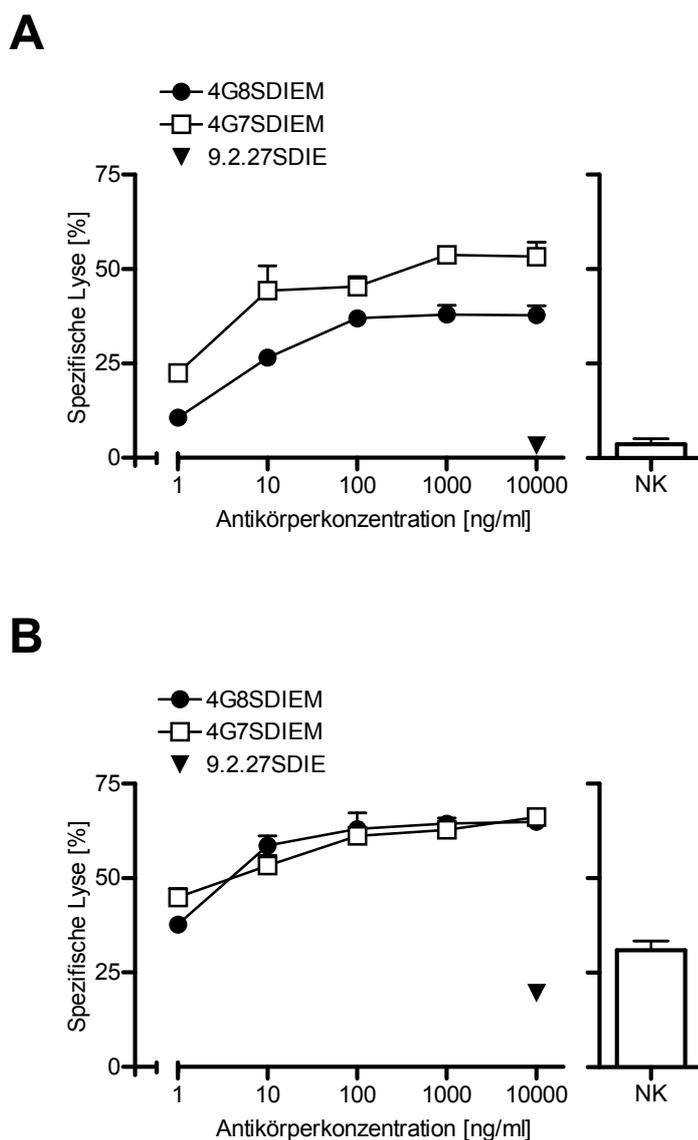


Abbildung 3.5: Vergleich der 4G7SDIEM- und 4G8SDIEM-vermittelten Lyse von NALM-16-Zellen ^{51}Cr -markierte NALM-16-Zellen wurden mit PBMC eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:50 in Anwesenheit steigender Konzentrationen der chimären oder SDIEM-optimierten Antikörper 4G8 und BV10 inkubiert. Der Nachweis der Lyse der NALM-16-Zellen erfolgte nach vier Stunden (A), bzw. 20 Stunden (B) durch die Messung des freigesetzten ^{51}Cr . Als Kontrolle wurde 9.2.27SDIE (▼) mitgeführt.

3.1.3 Expression von FLT3 auf leukämischen Blasten

Die Expression des Zielantigens FLT3 auf der Zelloberfläche leukämischer Blasten ist Voraussetzung für die Eliminierung dieser Zellen und somit für eine erfolgreiche Therapie. Darum sollte die FLT3-Expression auf malignen Zellen von AML-Patienten quantitativ bestimmt werden. Um einen Überblick über die Expression von FLT3 auf verschiedenen Subtypen der AML zu bekommen, wurden Blasten in PBMC verschiedener AML-Patienten durchflusszytometrisch analysiert. In Tabel-

3.1. Fc-optimierte α FLT3-Antikörper zur Therapie akuter myeloischer Leukämien

le 3.1 sind zunächst die entsprechenden Daten aller untersuchten Patientenproben zusammengestellt.

Tabelle 3.1: **Charakteristika der untersuchten AML-Proben**

LAIP: Leukämie-assoziiertes Immunophänotyp, zusätzlich zur verminderten CD45-Expression der Blasten

FLT3-TKD: FLT3-Tyrosinkinasedomäne

wt: wildtypisch

mut: mutiert

n.b.: nicht bestimmt

FLT3-ITD: FLT3-interne Tandemduplikation

| AML | FAB-Klassifizierung | LAIP (CD45 ^{dim}) | FLT3-TKD | FLT3-ITD |
|-----|---------------------|-------------------------------------|----------|----------|
| #1 | M0 | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #2 | M0 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #3 | M1 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #4 | M1 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #5 | M1 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #6 | M1/M2 | n.b. | n.b. | n.b. |
| #7 | M2 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #8 | M2 | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #9 | M2 | CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #10 | M2 | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #11 | M2 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #12 | M3 | CD33 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #13 | M3 | CD33 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #14 | M4 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | wt | positiv |
| #15 | M4 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #16 | M4eo | n.b. | n.b. | n.b. |
| #17 | M4eo | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #18 | M5 | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #19 | M5 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #20 | M5 | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | wt | positiv |
| #21 | M7 | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #22 | MDS | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #23 | n.b. | CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #24 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| #25 | n.b. | CD33 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #26 | n.b. | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #27 | n.b. | CD33 ⁺ CD34 ⁺ | wt | positiv |
| #28 | n.b. | CD34 ⁺ | wt | negativ |
| #29 | n.b. | CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #30 | n.b. | CD33 ⁺ | wt | positiv |
| #31 | n.b. | CD34 ⁺ | n.b. | positiv |
| #32 | n.b. | CD34 ⁺ | n.b. | n.b. |
| #33 | n.b. | n.b. | wt | positiv |
| #34 | n.b. | n.b. | mut | n.b. |

Standardisierte Daten bezüglich der FLT3-Expression wurden mittels quantitativer Durchflusszytometrie generiert und konnten so auch interexperimentell verglichen werden. Maligne Zellen wurden im Zuge der FLT3-Quantifizierung über die Expression von CD33 oder CD34 sowie einer (relativ zu Lymphozyten und Monozyten) verminderten CD45-Expression definiert. In Abb. 3.6, Teilabb. A) sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Diese Methode der absoluten Quantifizierung gebundener Antikörpermoleküle ist allerdings nur mit Maus-Antikörpern möglich. Gleichzeitig wurden die primären Zellen jedoch auch mit 4G8SDIEM, bzw. dem gegen das Glykoprotein NG-2 gerichteten Antikörper 9.2.27SDIE als irrelevante Kontrolle gefärbt. Diese Ergebnisse finden sich in Abb. 3.6, Teilabb. B).

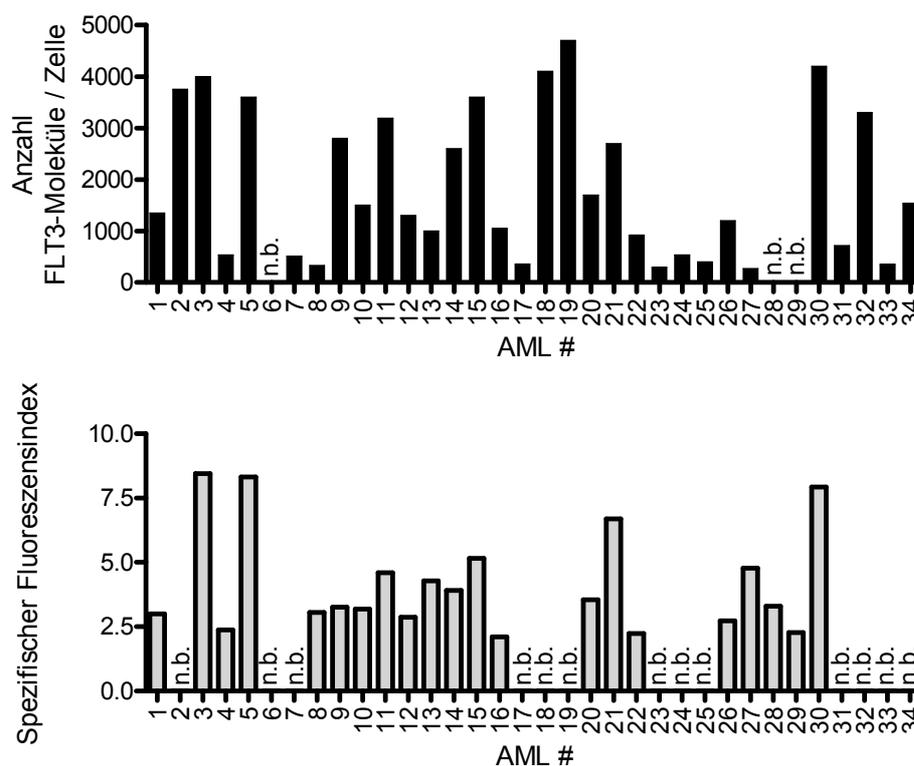


Abbildung 3.6: **FLT3-Expression auf AML-Blasten verschiedener Spender.** Die Bindung von m4G8 (A) oder 4G8SDIEM (B) wurde auf PBMC von AML-Patienten durchflusszytometrisch analysiert. Maligne Zellen wurden dabei anhand des zuvor definierten Phänotyps selektiert. (A) Unter Verwendung von Kalibrierungspartikeln, sowie polyklonalen, RPE-markierten Ziege- α Maus (Fc γ - und Fc μ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmenten wurde die absolute Anzahl gebundener m4G8-Moleküle pro maligner Zelle bestimmt. (B) zeigt die Bindung von RPE-konjugiertem 4G8SDIEM, bzw. 9.2.27SDIE an maligne Zellen, wobei Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von 4G8SDIEM und 9.2.27SDIE dargestellt sind (spezifischer Fluoreszenzindex).

Aus diesen zwei Teilabbildungen geht hervor, dass die malignen Zellen aller untersuchten Patientenproben FLT3 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Wie erwartet zeigen demnach alle untersuchten Proben auch eine spezifische Bindung von 4G8SDIEM. Allerdings ist das Niveau der FLT3-Expression sehr heterogen und schwankt zwischen ca. 270 Molekülen pro Zelle bis ca. 4700 Molekülen pro Zelle. Es liegt demnach deutlich unter der FLT3-Expression der NALM-16-Zelllinie (ca. 6000

Moleküle pro Zelle).

Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, wurden in den malignen Zellen der Patienten #14, #20, #27, #30, #31 und #33 interne Tandemduplikationen innerhalb des *FLT3*-Gens nachgewiesen. Dies entspricht ca. 30% aller untersuchten Proben. Weiterhin wurden die Blasten des Patienten #34 positiv auf eine Mutation der Tyrosinkinasedomäne des *FLT3*-Gens diagnostiziert (entspricht 6% der analysierten Proben). Im direkten Vergleich mit allen gemessenen Proben (im Mittel 1884 ± 1448 FLT3-Moleküle pro Zelle) zeigen nur die Blasten der Patienten #27 (270 Moleküle pro Zelle), #31 (720 Moleküle pro Zelle) und #33 (350 Moleküle pro Zelle) eine unterdurchschnittliche FLT3-Expression. Da der Anteil der FLT3-Mutationen-tragenden Proben am Gesamtkollektiv gering ist, lassen sich jedoch keine klaren Aussagen zum Einfluss von Leukämie-assoziierten FLT3-Mutationen auf die Expression des Moleküls treffen. Ebenso ist keine Korrelation zwischen FAB-Klassifizierung der AML, bzw. dem Leukämie-assoziierten Immunphänotyp und der Expression von FLT3 erkennbar.

3.1.4 4G8SDIEM-vermittelte Lyse primärer AML-Blasten

Wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.3), zeigten die analysierten Blasten von AML-Patienten, verglichen mit NALM-16-Zellen, eine deutlich niedrigere Expression des Antigens FLT3. Insofern war es besonders wichtig, zu untersuchen, ob der Antikörper 4G8SDIEM auch in der Lage ist, die Lyse primärer AML-Blasten zu induzieren. Mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest sollte dabei sowohl die 4G8SDIEM-vermittelte Lyse der Blasten durch allogene PBMC gesunder Spender, als auch durch autologe PBMC quantifiziert werden.

Zur Untersuchung der 4G8SDIEM-vermittelten Lyse allogener Blasten durch gesunde PBMC wurden PBMC gesunder Spender als Effektorzellen, sowie PBMC verschiedener AML-Patienten als Zielzellen verwendet. Die Anzahl der Blasten in den PBMC-Präparationen betrug dabei jeweils mehr als 75%. Somit wurden diese Zellen ohne weitere Separierung verwendet. Einige dieser Experimente wurden von cand. med. M. Bamberg durchgeführt.

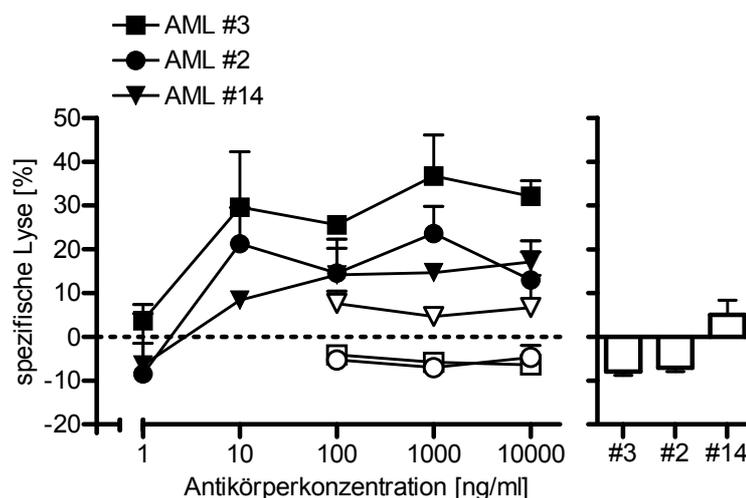


Abbildung 3.7: **4G8SDIEM-vermittelte Lyse primärer AML-Blasten durch allogene PBMC** PBMC eines gesunden Spenders wurden mit ^{51}Cr -markierten PBMC von AML-Patienten in Anwesenheit der Antikörper 4G8SDIEM (■, ●, ▼), bzw. als Kontrolle mit 9.2.27SDIE (□, ○, ▽) inkubiert. Dargestellt ist die Lyse der Zielzellen nach acht Stunden. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

Abb. 3.7 zeigt die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von PBMC desselben gesunden Spenders gegenüber Blasten verschiedener AML-Patienten. Dabei wurde, zusätzlich zu 4G8SDIEM der Antikörper 9.2.27SDIE als Kontrolle mitgeführt. Aus der Grafik wird deutlich, dass 4G8SDIEM die Lyse aller untersuchten AML-Blasten induzierte, wohingegen der Kontrollantikörper inaktiv war. Auch ist aus der Grafik ersichtlich, dass primäre Blasten gegenüber der Lyse durch allogene Effektoren deutlich resistenter zu sein scheinen, als die NALM-16-Zelllinie. So konnte bei zwei der drei Patientenzellen (AML #2 und AML#3) keine spontane NK-Zell-vermittelte Lyse (d.h. ohne Antikörperinkubation) der Zielzellen nachgewiesen werden. Hier resultierte die Kokultur mit allogenen PBMC in einer Verminderung

der spontanen ^{51}Cr -Freisetzung und somit zu einer Stabilisierung der Blasten. Auch war die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität gegenüber Blasten, verglichen mit der ADCC gegenüber NALM-16-Zellen, deutlich ineffizienter. Deshalb musste zum Nachweis einer 4G8SDIEM-vermittelten Zellyse die Inkubationszeit der Versuche von vier auf acht Stunden ausgedehnt werden. Wie schon zuvor gezeigt (siehe Abb. 3.5), spielt die Inkubationszeit bei solchen Experimenten eine entscheidende Rolle. Allerdings war es, bedingt durch die hohe spontane ^{51}Cr -Freisetzung der Blasten, nicht möglich, die Inkubationszeit auf über acht Stunden zu verlängern.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Antikörper-induzierte Lyse von AML-Blasten durch autologe PBMC nachzuweisen. Dazu wurden PBMC-Präparationen von AML-Patienten mittels magnetischer Zellseparation in Effektorzellen (definiert als $\text{CD33}^-/\text{CD34}^-$) und Blasten (definiert als CD33^+ bzw. CD34^+) getrennt. Die Reinheit der Populationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt, betrug allerdings nie mehr als 95%. Nach Markierung der Blasten wurden die Populationen im Verhältnis von ca. 50:1 und mit den Antikörpern 4G8SDIEM, bzw. 9.2.27SDIE kokultiviert. Die Bestimmung der Zieleellyse erfolgte dabei wiederum nach acht Stunden Inkubation.

Insgesamt wurden so PBMC fünf verschiedener AML-Patienten untersucht. Allerdings konnte nur bei zwei der fünf Patientenproben eine signifikante 4G8SDIEM-induzierte Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit cand. med. M. Bamberg durchgeführt.

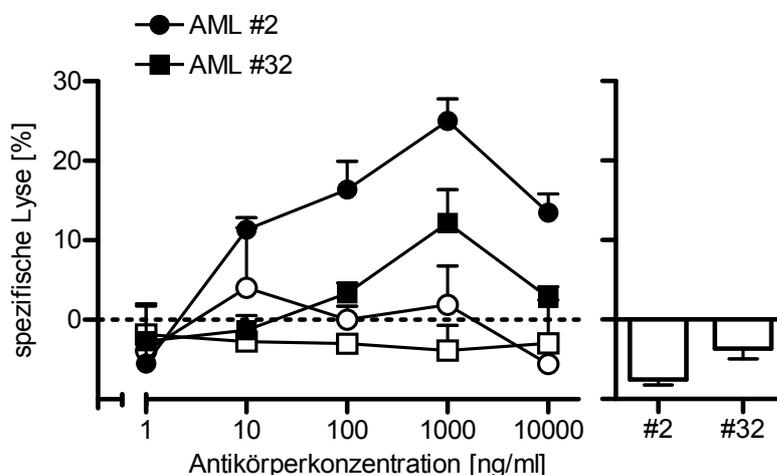


Abbildung 3.8: 4G8SDIEM-vermittelte Lyse von AML-Blasten durch autologe PBMC. PBMC von AML-Patienten wurden mittels MACS in Effektorzellen ($\text{CD33}^-/\text{CD34}^-$) und Zielzellen (CD33^+ oder CD34^+) separiert. Effektorzellen wurden mit ^{51}Cr -markierten Zielzellen in Anwesenheit der Antikörper 4G8SDIEM (■, ●), bzw. als Kontrolle mit 9.2.27SDIE (□, ○) inkubiert. Dargestellt ist die Lyse der Zielzellen nach acht Stunden. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

Die Abb. 3.8 zeigt dabei die Ergebnisse dieser zwei Patientenproben. Auch hierbei zeigten die Blasten beider Spender eine niedrigere spontane Lyse in Gegenwart von PBMC. In beiden Fällen konnte die Zugabe von 4G8SDIEM in die Kokulturen

diese Toleranz der PBMC gegenüber den autologen Zielzellen brechen und deren Lyse induzieren.

Die in Abb. 3.7 und 3.8 dargestellten Ergebnisse zeigen u.a. die technischen Einschränkungen des ^{51}Cr -Freisetzungstests in der hier verwendeten experimentellen Anordnung. So weisen primäre Zellen eine hohe spontane ^{51}Cr -Freisetzung auf, die die Länge der Versuche beschränkt. Außerdem führen Kontaminationen der Effektorzellpopulation mit Leukämiezellen zu einer Verschiebung des Effektor:Zielzellverhältnisses zu Gunsten der Blasten, bzw. zum Auftreten unmarkierter Blasten. Diese werden dementsprechend zwar lysiert, die Lyse aber nicht nachgewiesen.

Der ideale Versuchsaufbau zur Analyse der antikörpervermittelten Lyse primärer AML-Blasten sollte somit ohne eine (für die Zellen belastende) Separierung der Ziel- und Effektorzellen und ohne eine (für die Zielzellen ebenfalls belastende, sowie die Inkubationszeit limitierende) Markierung auskommen.

Zur Lösung dieses Problems wurde eine durchflusszytometrische Methodik etabliert, welche die vergleichende Quantifizierung von Zellpopulationen verschiedener Proben ermöglicht.

3.1.5 Durchflusszytometrische Quantifizierung Antikörpervermittelter Lyse von AML-Blasten

Mit Hilfe dieser Methodik konnte der Effekt von 4G8SDIEM auf autologe AML-Blasten untersucht werden. Dazu wurden zunächst PBMC von AML-Patienten *ex vivo* ohne weitere Manipulation für 24 Stunden mit 4G8SDIEM, 9.2.27SDIEM oder ohne Antikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Die Anzahl der Zellen bestimmter Populationen wurde unter Verwendung von nichtreaktiven Partikeln durchflusszytometrisch quantifiziert. So konnte die Anzahl viabler Blasten, wie auch die Anzahl aktivierter NK-Zellen bestimmt werden. In Abb. 3.9 ist eine Zusammenfassung aller so bearbeiteten Patientenproben gezeigt. Dargestellt ist in A) die Anzahl maligner Zellen (selektioniert über die in Tab. 3.1 gezeigten Immunphänotypen) nach Inkubation mit dem Kontrollantikörper 9.2.27SDIE oder 4G8SDIEM. Alle Ergebnisse wurden, der Vergleichbarkeit wegen, auf unbehandelte Kontrollen (Inkubation ohne Antikörper) normiert.

Die Teilabbildung B) stellt die Anzahl aktivierter NK-Zellen ($\text{CD}69^+$) nach Inkubation mit 9.2.27SDIE oder 4G8SDIEM als Anteil aller NK-Zellen ($\text{CD}45^+\text{CD}56^+$) dar. In C) ist das Effektor:Zielzell-Verhältnis jeder Patientenprobe dargestellt.

Die Inkubation der PBMC mit 4G8SDIEM resultierte bei vier von fünf Patientenproben (AML #1, #27, #26 und #6) in einer signifikanten NK-Zell-Aktivierung. Eine 4G8SDIEM-abhängige Verminderung der Anzahl viabler Blasten konnte jedoch nur bei einem Spender (AML #27) nachgewiesen werden. Diese Abnahme der malignen Zellen bei diesem Spender war aber nicht auf die ADCC-Vermittlung durch 4G8SDIEM und somit Zielzellyse zurückzuführen, sondern

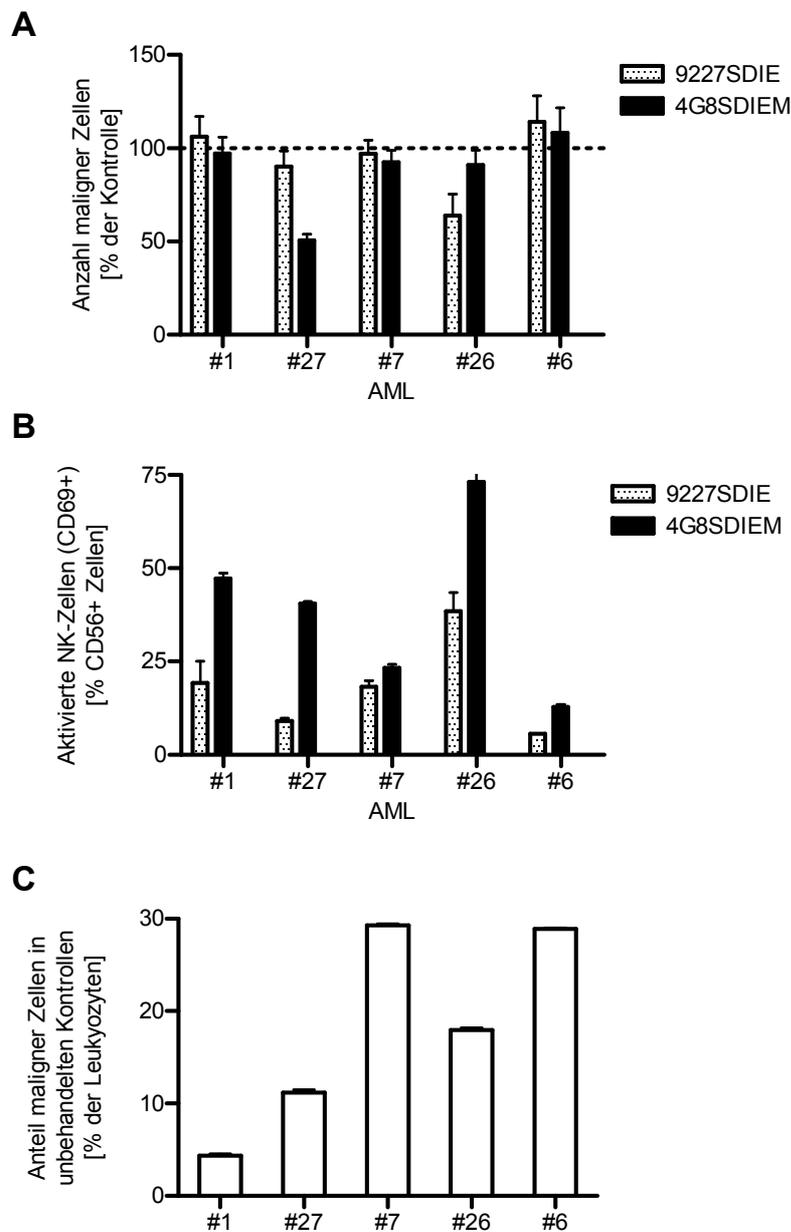


Abbildung 3.9: **Lyse autologer AML-Blasten *ex vivo*.** PBMC von AML-Patienten wurden für 24 Stunden mit den Antikörpern 4G8SDIEM oder 9.2.27SDIEM ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), bzw. ohne Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit α CD14-, α CD45-, α CD33-, α CD34-, α CD56- und α CD69-Antikörpern, sowie 7-AAD gefärbt. Die analysierten Zellzahlen aller Proben wurde durch mitgeführte Beads standardisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der malignen Zellen (A) und der Anzahl aktivierter (CD69^+) NK-Zellen ($\text{CD56}^+\text{CD45}^+$) (B) relativ zur unbehandelten Kontrolle. Dabei sind 4G8SDIEM-behandelte Proben in schwarz, 9.2.27SDIE-behandelte Proben in weiß gezeigt. (C) zeigt das Verhältnis zwischen malignen Zellen und den gesamten Leukozyten (CD45^+). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten.

3.1. Fc-optimierte α FLT3-Antikörper zur Therapie akuter myeloischer Leukämien

auf eine (4G8SDIEM-vermittelte) Veränderung des Immunphänotyps der Blasten. Durchflusszytometrische Darstellungen dieser Veränderungen sind in Abb. 3.10 gezeigt. Die Zellen wiesen dabei eine erhöhte Granularität (SSC-Signal) auf und exprimierten verstärkt CD14 und CD45. Die Zellen erschienen dabei immunophänotypisch als normale Monozyten. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Gesamtzahl CD33-positiver Zellen in den 4G8SDIEM-behandelten Proben, verglichen mit den Medium-Kontrollen und den 9.2.27SDIE-behandelten Proben, nachgewiesen. Somit

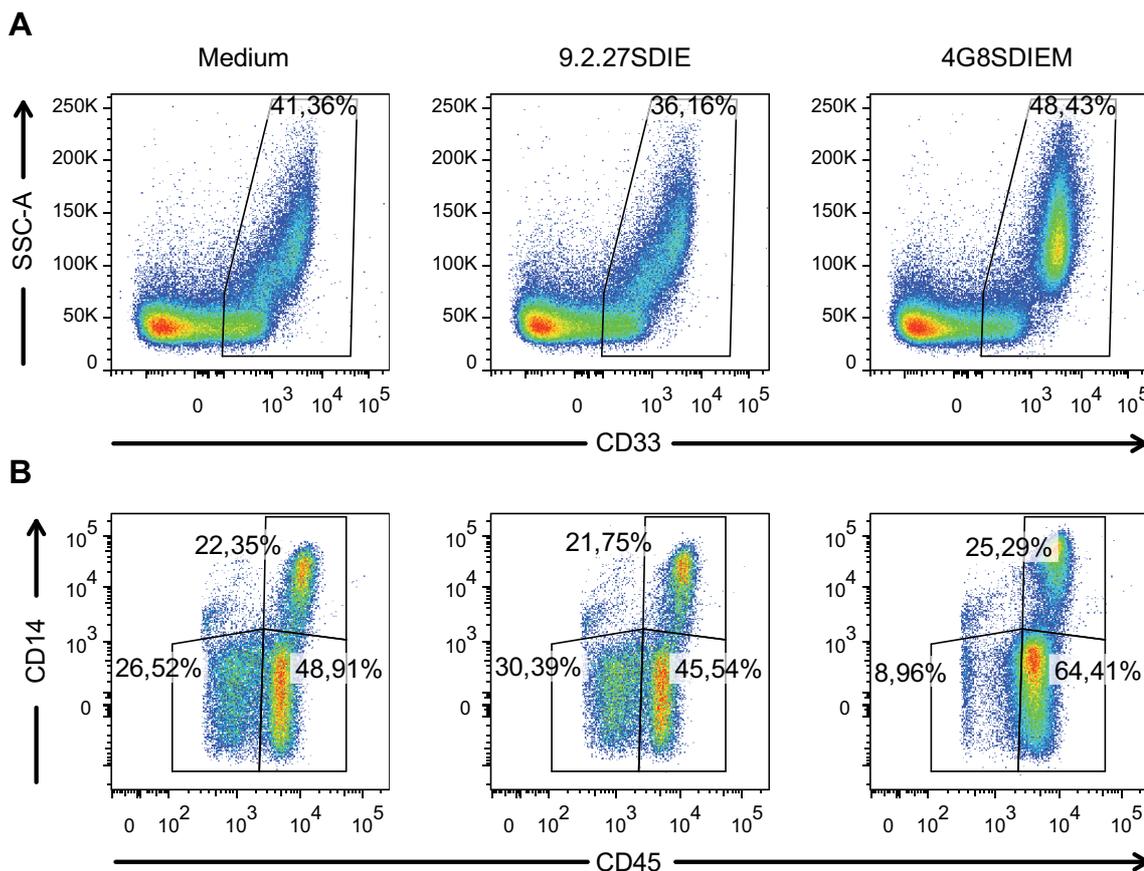


Abbildung 3.10: **Immunphänotyp der AML #27 nach 4G8SDIEM-Inkubation.** PBMC des AML-Patienten AML #27 wurden wie in der Legende zu Abb. 3.9 beschrieben, behandelt und analysiert. (A) zeigt viable (7-AAD⁻), CD45⁺ PBMC in der SSC / CD33-Darstellung. Die hieraus selektierten CD33⁺-Zellen sind in (B) hinsichtlich ihrer Expression von CD14 und CD45 dargestellt. Abgebildet sind repräsentative Proben der Mediumkontrolle, nach 9.2.27SDIE-, sowie 4G8SDIEM-Inkubation. Die Zahlen in den Graphen geben die prozentualen Anteile an der parentalen Population wieder.

konnte bei keiner der fünf analysierten *ex vivo* Proben eine signifikante 4G8SDIEM-vermittelte Lyse der malignen Zellen nachgewiesen werden. In allen vorangehenden Experimenten wurden Effektor:Zielzellverhältnisse von 50:1 gewählt. Im Gegensatz dazu zeigten diese *ex vivo* Proben Effektor:Zielzell-Verhältnisse zwischen 3:1 und 20:1, was ausschlaggebend für das Überleben der malignen Zellen sein könnte. Unter Effektorzellen werden hier, wie in der gesamten vorliegenden Arbeit, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, bzw. hier CD45-positive, nicht maligne Zellen

der PBMC-Pärparationen zusammengefasst. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Anteil Fc γ R-positiver Zellen in diesen Populationen nur etwa 10 bis 15% beträgt.

Demnach wurde im Folgenden versucht, im autologen System Effektor:Zielzell-Verhältnisse von ca. 50:1 herzustellen. Dazu wurden frische PBMC von AML-Spendern in Vollremission mit, zu früheren Zeitpunkten isolierten und kryokonservierten, autologen PBMC mit definiertem Anteil maligner Zellen zusammengebracht. Diese Kokulturen wurden, wie zuvor beschrieben, mit den Antikörpern 4G8SDIEM bzw. 9.2.27SDIE inkubiert und nach 24 Stunden durchflusszytometrisch analysiert. Die Zusammenfassung dieser Experimente ist in Abb. 3.11 gezeigt. Wie aus Teilabb. C) ersichtlich, konnte durch dieses Vorgehen der Anteil maligner Zellen in den Kokulturen auf ca. zwei bis fünf Prozent gesenkt werden, was Effektor:Zielzell-Verhältnissen von 50:1 bis 20:1 entspricht.

Unter diesen Bedingungen konnte bei zwei der untersuchten Patientenproben eine 4G8SDIEM-abhängige Verminderung der Anzahl maligner Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11, A; AML#10 und AML#28), wobei jedoch nur im Falle des Patienten AML#28 eine 4G8SDIEM-abhängige Aktivierung der NK-Zellen nachgewiesen werden konnte. In einem Fall (AML#13) induzierte sowohl der Antikörper 4G8SDIEM, wie auch 9.2.27SDIE eine Reduktion der Blastenzahl, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, wohingegen hier nur unter Einfluss von 4G8SDIEM eine Aktivierung der NK-Zellen nachweisbar war. In den Proben von AML#23 war nur eine marginale Reduktion maligner Zellen unter dem Einfluss beider Antikörper messbar. Der hohe Anteil aktivierter Zellen innerhalb der NK-Zellpopulation war in diesem Fall auch in den unbehandelten Kontrollen detektierbar.

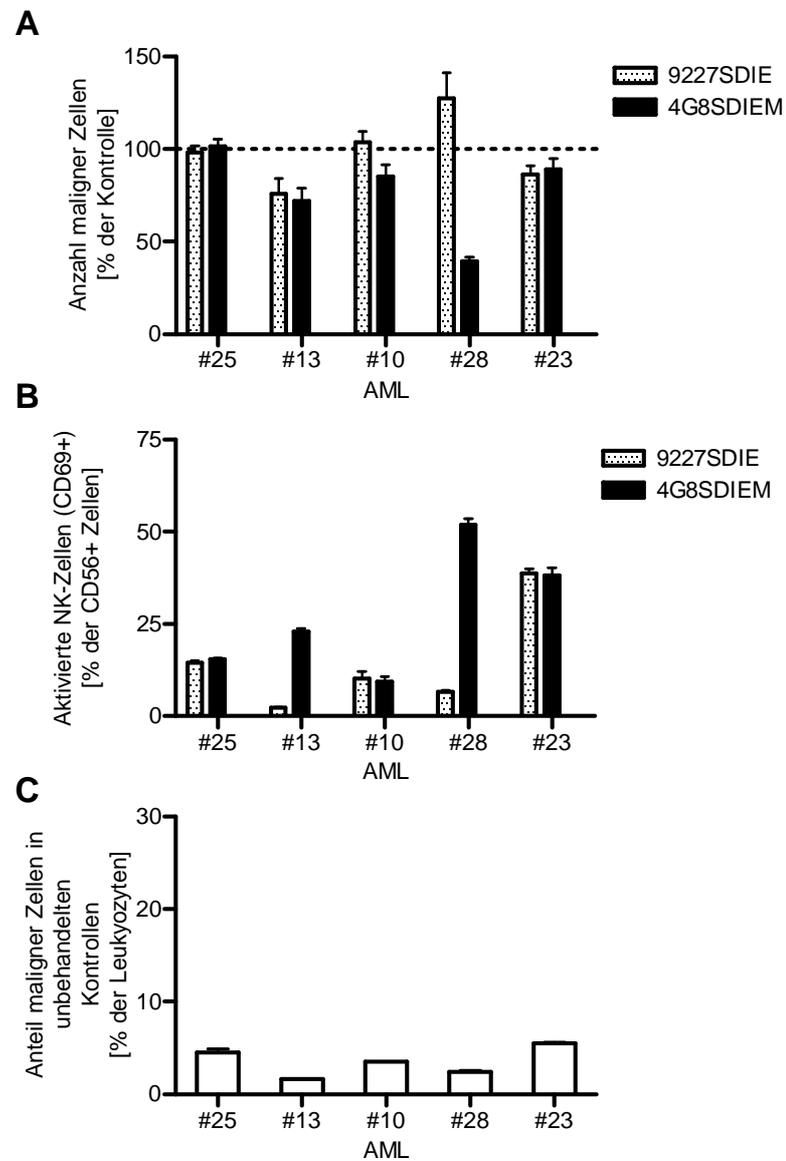


Abbildung 3.11: **Lyse autologer AML-Blasten.** Frische PBMC von AML-Patienten in Vollremission wurden mit autologen, zu früheren Zeitpunkten eingefrorenen, Blasten im Verhältnis von ca. 50:1 gemischt und für 24 Stunden mit den Antikörpern 4G8SDIEM, oder 9.2.27SDIE (1 μ g/ml), bzw. ohne Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit α CD14-, α CD45-, α CD33-, α CD34-, α CD56- und α CD69-Antikörpern, sowie 7-AAD gefärbt. Die analysierten Zellzahlen aller Proben wurde durch mitgeführte Beads standardisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der malignen Zellen (A) und der Anzahl aktivierter (CD69⁺) NK-Zellen (CD56⁺CD45⁺) (B) relativ zur unbehandelten Kontrolle. Dabei sind 4G8SDIEM-behandelte Proben in schwarz, 92.27SDIE-behandelte Proben in weiß gezeigt. (C) zeigt das Verhältnis zwischen malignen Zellen und den gesamten Leukozyten (CD45⁺). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten.

3.1.6 Expression von FLT3 auf dendritischen Zellen

Im Zuge der Analyse der FLT3-Expression gesunder Zellen wurden zunächst dendritische Zellen (DC) untersucht. Die Literatur beschreibt die Abhängigkeit des Maturierungsprozesses dendritischer Zellen von FLT3L im Maus-, wie auch im humanen System, was eine FLT3-Expression dieser Zellen voraussetzt. Die Anzahl dendritischer Zellen beträgt jedoch nur ca. 1% aller Leukozyten. Deshalb wurden dendritische Zellen gesunder Spender mittels magnetischer Partikel angereichert und durchflusszytometrisch untersucht.

In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse dieser Analysen gezeigt. Die angereicherte

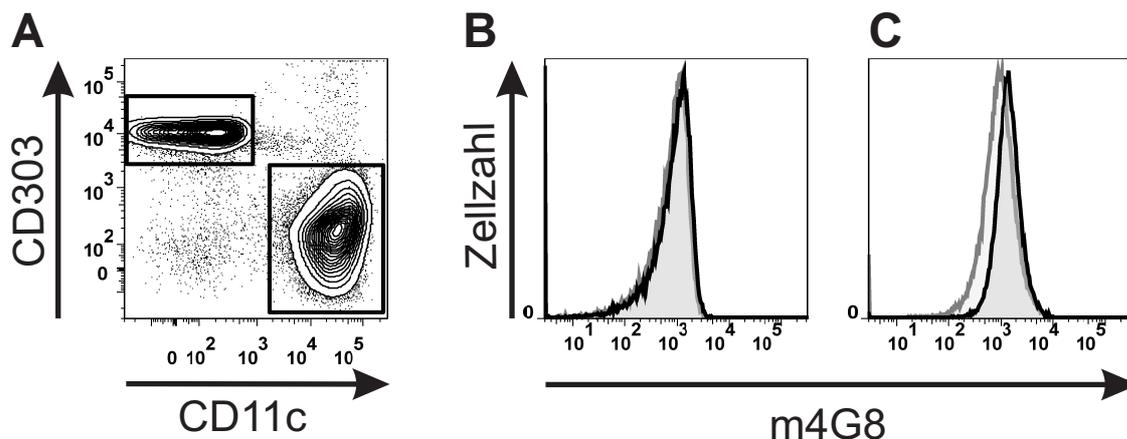


Abbildung 3.12: **FLT3-Expression auf dendritischen Zellen.** Dendritische Zellen wurden mittels magnetischer Partikel aus PBMC isoliert und mit 10 μ g/ml m4G8, bzw. eines Kontrollantikörpers des Isotyps mIg γ 1, inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte durch APC-markierte Ziege- α Maus (Ig γ - und Ig μ -spezifische) F(ab)₂-Fragmente. Anschließend wurden die Zellen mit α CD11c-PE und α CD303-FITC, sowie 7-AAD gefärbt. Die Subpopulationen der mDC (CD11c⁺) und pDC (CD303⁺) wurden wie in (A) dargestellt identifiziert. Die Histogramme in (B) und (C) zeigen jeweils die Bindung von m4G8 (schwarze Linie) im Vergleich zu einem irrelevanten Kontrollantikörper (graue Linie) auf den CD303⁺pDC (in B) und CD11c⁺mDC (in C).

DC-Population wurde mit Antikörper gegen CD303 und CD11c gefärbt, um die Subpopulationen der monozytären (mDC) und plasmazytoiden DC (pDC) unterscheiden zu können (vgl. Abb. 3.12, Teilabb. A). Wie aus Abb. 3.12 (Teilabb. B und C) ersichtlich, konnte lediglich auf den mDC eine geringe FLT3-Expression nachgewiesen werden. Auf den pDC konnte dagegen keine Bindung des Antikörpers m4G8 detektiert werden.

Im Zuge der Analyse von FLT3 auf dendritischen Zellen wurden die mittels magnetischer Zellseparation isolierten dendritischen Zellen auch als ⁵¹Cr-markierte Zielzellen in ⁵¹Cr-Freisetzungsversuchen eingesetzt. Dabei dienten autologe DC-depletierte Leukozyten als Effektorzellen, das Effektor:Zielzellverhältnis betrug 100:1. Ein repräsentatives Ergebnis zweier Experimente ist in Abb. 3.13 gezeigt. Daraus wird ersichtlich, dass 4G8SDIEM nicht in der Lage ist, die Lyse der dendritischen Zellen zu induzieren. Um eine Beeinträchtigung der Effektorzellen durch die vorangehende Zellseparation auszuschließen, wurden ebenfalls radioaktiv-markierte

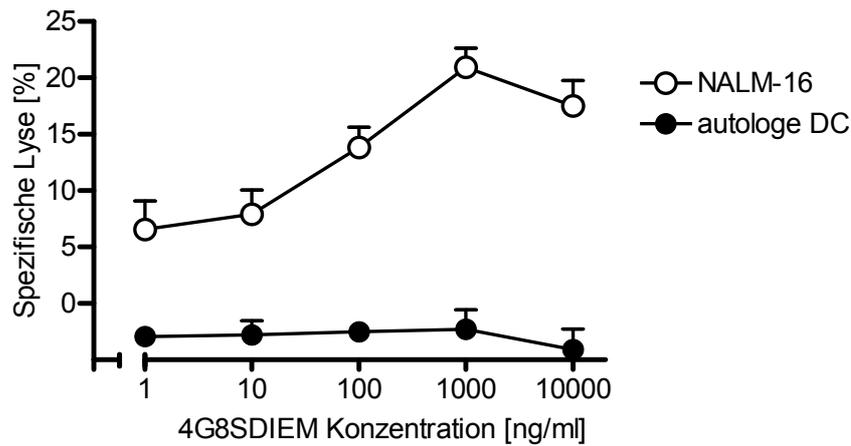


Abbildung 3.13: **Toxizität von 4G8SDIEM gegenüber autologen dendritischen Zellen.** Aus PBMC eines gesunden Spenders wurden mittels magnetischer Partikel dendritische Zellen isoliert, mit ^{51}Cr markiert und mit autologen PBMC im Verhältnis 1:100 in Anwesenheit steigender Konzentrationen des Antikörpers 4G8SDIEM (●) inkubiert. Als Kontrolle wurden ^{51}Cr -markierte NALM-16-Zellen ebenfalls mit PBMC dieses Spenders und steigenden Konzentrationen von 4G8SDIEM (○) inkubiert. Der Nachweis der Lyse der Zielzellen erfolgte nach vier Stunden durch die Messung des freigesetzten ^{51}Cr . Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten.

NALM-16-Zellen mit den Effektorzellen inkubiert. Hierbei konnte die 4G8SDIEM-vermittelte Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden. Es ist dabei anzumerken, dass diese Experimente nur über einen Zeitraum von vier Stunden durchgeführt werden konnten. Längere Inkubationen waren aufgrund der Spontanlyse der DC nicht möglich.

3.1.7 FLT3-Expression auf Zellen des normalen Knochenmarks und Untersuchungen zur Stammzelltoxizität von 4G8SDIEM

Das Protein FLT3 wurde ursprünglich als Stammzellmarker beschrieben. Um eine mögliche Stammzelltoxizität des Antikörpers 4G8SDIEM während der Therapie besser abschätzen zu können, wurden Zellen des Knochenmarks gesunder Spender durchflusszytometrisch analysiert und die Antigenexpression quantifiziert. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen wurden dabei gemäß der ISHAGE-Richtlinien identifiziert. Die Populationen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten wurden in der CD45/SSC-Darstellung eingegrenzt. Die entsprechende Gatingstrategie ist in Abb. 3.14 gezeigt.

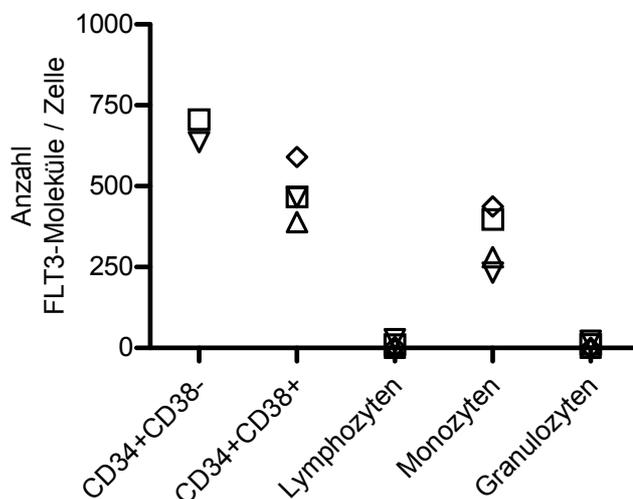


Abbildung 3.15: **FLT3-Expression auf Zellen des gesunden Knochenmarks.** PBMC-Präparationen aus Knochenmark gesunder Stammzellspender wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ m4G8, bzw. eines Kontrollantikörpers mIg γ 1, inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte durch PE-markierte Ziege- α Maus (Ig γ - und Ig μ -spezifische) F(ab) $_2$ -Fragmente. Zur Quantifizierung gebundener Antikörper wurden Kalibrierungsbeads mitgeführt (QIFIKIT). Anschließend wurden die Zellen wie in der Legende zu Abb. 3.14 gefärbt und die Zellpopulationen identifiziert. Gezeigt sind die ermittelten FLT3-Moleküle pro Zelle jeder analysierten Zellpopulation, wobei jedes Symbol (○, ×, △, □) einen gesunden Spender darstellt.

Die Subpopulation der CD34 $^+$ CD38 dim Zellen wurde nur bei zwei der vier Spender identifiziert und analysiert.

Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich, konnte eine FLT3-Expression auf CD34+CD45 dim hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, sowie auf Monozyten nachgewiesen werden. Bei zwei der untersuchten vier Spender wurde weiterhin die Population der CD34 $^+$ CD45 dim Zellen in CD38 $^+$ und CD38 $^-$ unterteilt. Diese Population der CD34+CD45 dim CD38 $^-$ Zellen gilt als Stammzellpopulation. Nachgewiesen wurden ca. 670 FLT3-Moleküle auf diesen Zellen, wohingegen CD34 $^+$ CD45 dim CD38 $^+$ Zellen im Mittel nur ca. 480 Moleküle exprimierten. Auf der Population der Monozyten wurden im Mittel 340 Moleküle pro Zelle nachgewiesen. Die Expression von FLT3

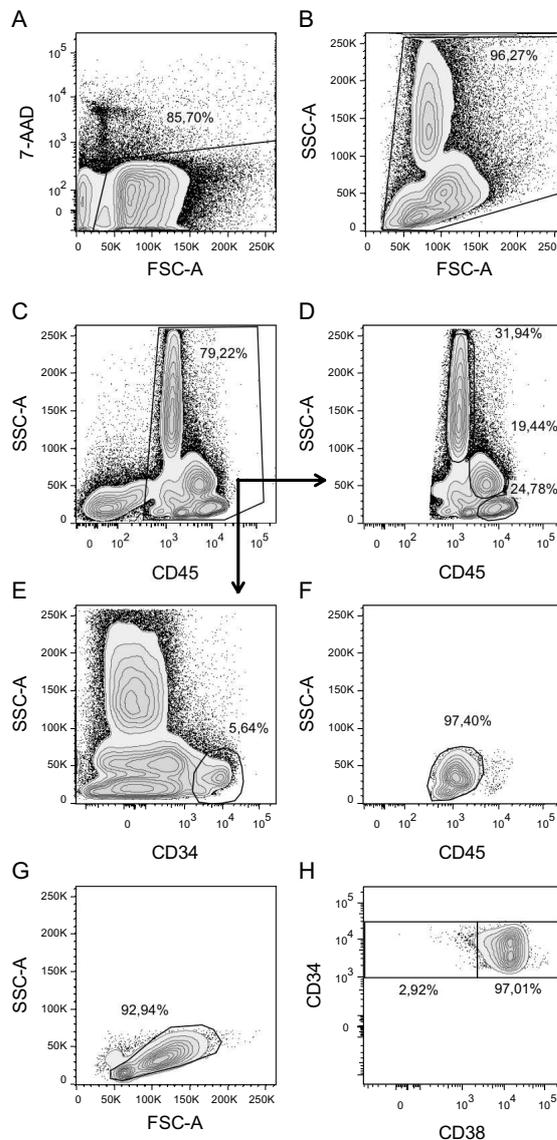


Abbildung 3.14: **Durchflusszytometrische Strategie zur Selektion der Zellpopulationen gesunden Knochenmarks.** Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender wurden mit α CD45-AmCyan, α CD34-APC und α CD38-PE/Cy7, sowie 7-AAD gefärbt. Viable Zellen wurden als 7-AAD⁻ definiert (A), und in der FSC/SSC-Darstellung weiter eingegrenzt (B). CD45⁻-Zellen wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (C). Aus der Population der CD45⁺-Zellen wurden zum einen Granulozyten (CD45^{dim}SSC^{hi}), Monozyten (CD45^{hi}SSC^{int}) und Lymphozyten (CD45^{hi}SSC^{low}) definiert (D). Weiterhin wurden aus den CD45⁺-Zellen CD34⁺-Zellen selektioniert (E). Im Folgenden wurden daraus CD45^{dim}SSC^{low} Zellen (F) mit den Lichtstreuungseigenschaften von Lymphozyten (G) isoliert. Diese Zellen stellen die Populationen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen dar. In einem finalen Schritt wurden diese in CD38⁻ und CD38⁺ getrennt (H). Zahlen innerhalb der Graphen bezeichnen den prozentualen Anteil der Zellen innerhalb der Gates an der entsprechenden parentalen Zellpopulation.

auf gesunden hämatopoetischen Zellen ist demnach in den meisten Fällen deutlich schwächer als die FLT3-Expression maligner AML-Blasten (im Mittel ca. 1880 Moleküle/Zelle). Auf den analysierten Lymphozyten und Granulozyten konnte bei keinem der Spender FLT3 nachgewiesen werden. Somit ist insgesamt nicht auszuschließen, dass eine Therapie mit 4G8SDIEM auch zu einer Beeinträchtigung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen führt. Deshalb wurde im Folgenden versucht, eine potentielle Stammzelltoxizität von 4G8SDIEM weiter zu analysieren. Die Untersuchungen erfolgten dabei mit Hilfe zweier unterschiedlicher experimenteller Systeme.

So wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmark gesunder Spender mit $1 \mu\text{g/ml}$ 4G8SDIEM, bzw. als Kontrollantikörper mit 9.2.27SDIE für 24 bis 48 Stunden inkubiert und die Anzahl viabler Stamm- und Vorläuferzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen wurden dabei wie unter Abs. 3.1.7 beschrieben, identifiziert und deren Anzahl wie in der Legende zu Abb. 3.1.5 skizziert, quantifiziert. Weiterhin wurde ein chemisch hybridisiertes bispezifisches F(ab)₂-Fragment (4G8xUCHT-1) mit Spezifitäten für FLT3 und CD3 als Positivkontrolle mitgeführt. Dieses Molekül führt in Gegenwart von FLT3⁺-Zielzellen zur Aktivierung von T-Zellen und somit zur Zielzelllyse.

Ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten ist in Abb. 3.16 darge-

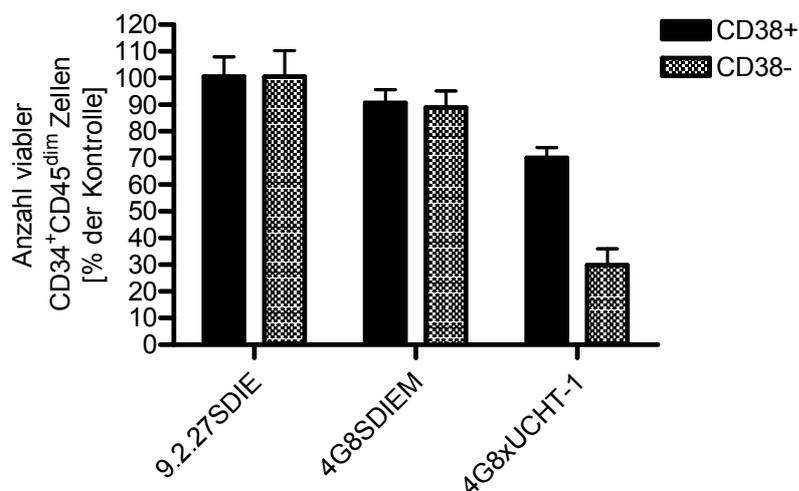


Abbildung 3.16: **Durchflusszytometrische Analyse der Toxizität von 4G8SDIEM gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des gesunden Knochenmarks.** Mononukleäre Zellen des Knochenmarks eines gesunden Spenders wurden in Gegenwart der Antikörper 4G8SDIEM, 9.2.27SDIE oder des bispezifischen Konstruktes 4G8xUCHT-1 für 24 Stunden inkubiert. Die absolute Anzahl überlebender hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die Anzahl viabler 7-AAD⁻CD34⁺CD45^{dim}CD38⁺-, bzw. 7-AAD⁻CD34⁺CD45^{dim}CD38⁻-Zellen relativ zu unbehandelten Kontrollen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten.

stellt. Hieraus wird ersichtlich, dass sowohl Teile der CD45^{dim}CD34⁺CD38⁻ als auch der CD45^{dim}CD34⁺CD38⁺ Population der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch 4G8xUCHT-1 eliminiert werden. Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von 4G8SDIEM oder 9.2.27SDIE in diesen Experimenten zu keiner

signifikanten Reduktion der CD45^{dim}CD34⁺- Zellen.

Gleiche Ergebnisse lieferten auch Analysen der Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden, wobei hier die Gesamtzahl viabler Zellen innerhalb aller Proben vermindert war.

Um die kritische Frage der Stammzelltoxizität weiter zu untersuchen, wurde die Beeinträchtigung der Koloniebildung in kultivierten Knochenmarkszellen gemessen (*engl.: Colony forming units*, daher CFU-assays). Dabei wurden mononukleäre Zellen des Knochenmarks gesunder Spender mit 1 μ g/ml 4G8SDIEM, bzw. 9.2.27SDIE oder einem entsprechendem Volumen PBS für 16 Stunden inkubiert und anschließend auf semisoliden Kulturplatten ausplattiert. Nach 12 bis 18 Tagen wurden die gewachsenen Zellkolonien ausgezählt und morphologisch differenziert. Diese Experimente wurden von Sabrina Grimm (Universitätsklinikum Tübingen) durchgeführt. Auch in dieser experimentellen Anordnung konnte keine signifikante Toxizität von

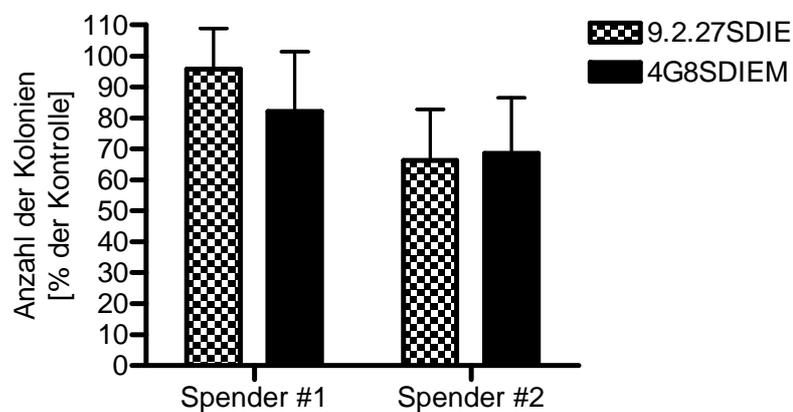


Abbildung 3.17: Einfluss von 4G8SDIEM auf die Kolonienbildung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen des gesunden Knochenmarks. Mononukleäre Zellen des Knochenmarks zweier gesunder Spender wurden für 16 Stunden mit den Antikörpern 4G8SDIEM oder 9.2.27SDIE (1 μ g/ml) inkubiert und anschließend auf semisoliden Kulturplatten ausplattiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl gewachsener Kolonien auf drei Kulturplatten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen innerhalb dieser drei Platten.

4G8SDIEM gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch verminderte Kolonienbildung nachgewiesen werden.

3.1.8 Weitere Therapie-relevante Parameter

Neben der Bindungsaffinität und Spezifität, sowie der potenten ADCC-Vermittlung sind noch weitere Parameter für eine etwaige klinische Applikation bedeutend. Insbesondere unter Berücksichtigung der FLT3L-4G8SDIEM-Interaktion, muss eine mögliche agonistische, also proliferationsinduzierende Wirkung des Antikörpers auf AML-Blasten ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist bekannt, dass membranständige Antigene nach der Bindung eines Antikörpers von der Zelloberfläche verschwinden können. Das Antigen kann dabei in das Zellumen internalisiert, sowie ganz oder teilweise von der Membran abgeschert werden (*engl.: antigen shedding*). Diese Effekte werden unter dem Begriff „Antigenshift“ zusammengefasst. Unter Berücksichtigung des inzwischen routinemäßigen Einsatzes von Sorafenib zur Behandlung rezidivierter AML (mit ITD-Mutation des FLT3-Gens) wurde dieser spezielle Tyrosinkinaseinhibitor auf antigenmodulierende Eigenschaften untersucht.

4G8SDIEM induziert keine Proliferation von AML-Blasten

Die Untersuchung der agonistischen Eigenschaften von 4G8SDIEM erfolgten durch die Messung der Proliferation von primären AML-Blasten. Dabei wurden die Zellen mit 4G8SDIEM inkubiert und anschließend die Menge neusynthetisierter DNA über die Inkorporation radioaktiven Thymidins quantifiziert. Diese Experimente wurden von cand. med. M. Bamberg durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind

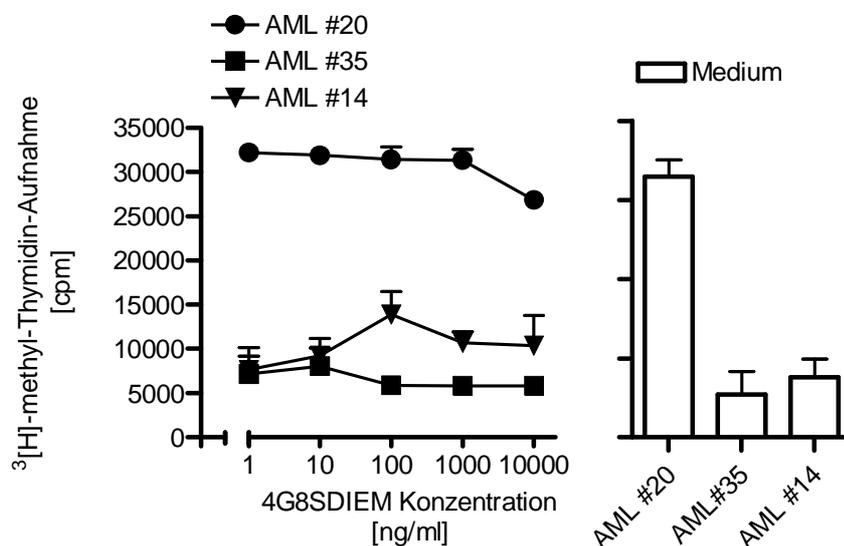


Abbildung 3.18: **4G8SDIEM-induzierte Proliferation von AML-Blasten.** PBMC von AML-Patienten wurden in RPMI mit steigenden Konzentrationen des Antikörpers 4G8SDIEM, bzw. als Kontrolle mit 9.2.27SDIEM für 44 Stunden inkubiert, wobei nach Ablauf von 24 Stunden die Zugabe von 3 [H]-methyl-Thymidin erfolgte. Die Proliferation der Zellen wurde durch Messung inkorporierter Radioaktivität in die DNA quantifiziert. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten.

in Abb. 3.18 gezeigt. Dabei ist die Proliferation von PBMC dreier AML-Patienten

in Abhängigkeit der 4G8SDIEM-Konzentration dargestellt. Auf der rechten Seite ist die Proliferation der Zellen ohne Antikörperinkubation dargestellt. Die Grafik zeigt, dass unter dem Einfluss von 4G8SDIEM bei keinem der Spender eine verstärkte Zellteilung nachgewiesen werden konnte.

4G8SDIEM-induzierter Antigenshift

Die Stabilität der FLT3-Expression auf der Oberfläche von Zielzellen nach Antikörperbindung wurde durchflusszytometrisch anhand der Zelllinie NALM-16, als auch von PBMC von AML-Patienten analysiert. Dabei wurde die FLT3-Expression auf der Zellmembran sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden quantifiziert.

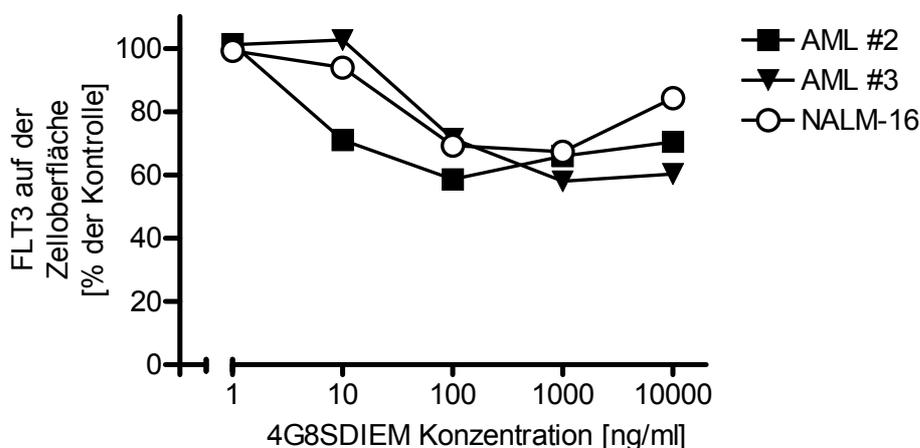


Abbildung 3.19: **4G8SDIEM-induzierter Antigenshift von FLT3.** NALM-16-Zellen, bzw. PBMC von AML-Patienten wurden mit steigenden Konzentrationen von 4G8SDIEM in RPMI-Vollmedium bei 37°C, 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Zellmembranständige FLT3-Moleküle wurden nach Ablauf der Inkubation mit 2 μ g/ml 4G8SDIEM markiert. Gebundene Antikörpermoleküle wurden anschließend mittels polyklonalen, PE-markierten Ziege- α Human (Fc γ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmenten gefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität unbehandelter Zellen wurde die relative Oberflächenexpression von FLT3 berechnet.

In Abb. 3.19 sind die Ergebnisse dieser Experimente nach 48 Stunden Inkubation der Zellen mit 4G8SDIEM gezeigt. Dabei ist auf allen Zellen eine 4G8SDIEM-abhängige Verminderung der Oberflächenexpression von FLT3 nachweisbar. Gleichzeitig ist jedoch auch ersichtlich, dass dieser Verlust lediglich 40% der ursprünglichen FLT3-Moleküle beträgt. Andere, hier nicht gezeigte Experimente konnten belegen, dass sich die FLT3-Expression auf der Zelloberfläche nach 24-stündiger, bzw. 48-stündiger Inkubation mit 4G8SDIEM nicht unterscheidet und demnach wohl auch bei längeren Inkubationen ein kompletter Verlust der FLT3-Expression unwahrscheinlich ist.

Sorafenib-induzierter Antigenshift von FLT3

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Sorafenib auf die FLT3-Expression von Zelllinien untersucht. Dabei wurden NALM-16- bzw.

REH-Zellen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sorafenib in RPMI-Vollmedium für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert und die Expression von FLT3 auf der Zelloberfläche überlebender Zellen gemessen.

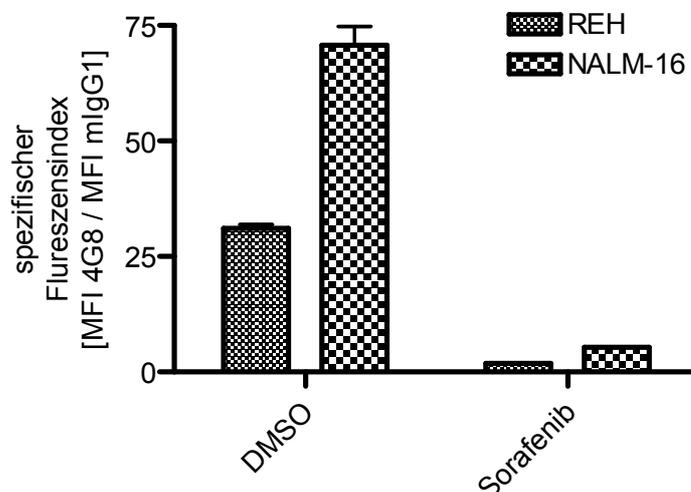


Abbildung 3.20: **Sorafenib-induzierter Antigenshift von FLT3.** NALM-16- bzw. REH-Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden mit Sorafenib (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder dem entsprechenden Volumen DMSO in RPMI-Vollmedium bei 37°C, 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden zellmembranständige FLT3-Moleküle mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ m4G8 markiert. Gebundene Antikörpermoleküle wurden anschließend mittels polyklonalen, APC-markierten Ziege- α Maus ($\text{Fc}\gamma$ - und $\text{Fc}\mu$ -spezifischen) $\text{F}(\text{ab})_2$ -Fragmenten gefärbt. Dargestellt ist die Bindung von m4G8 auf viablen (7-AAD^-) Zellen nach DMSO- oder Sorafenib-Inkubation. Der spezifische Fluoreszenzindex bezeichnet den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten m4G8-markierter und mIg γ 1-markierter Zellen. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes (von zweien) sind in Abb. 3.20 gezeigt. Nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib war die Viabilität der NALM-16-, sowie der REH-Zellen deutlich vermindert (14% bzw. 10% 7-AAD^- Zellen). Im Gegensatz dazu lag die Viabilität in den DMSO-behandelten Kontrollen in allen Proben bei über 85%. Die FLT3-Expression auf den viablen Zellen der Proben ist als Quotient aus den Fluoreszenzsignalen nach Inkubation der m4G8- und Kontroll-Antikörpern dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, dass NALM-16-Zellen, verglichen mit REH-Zellen ungefähr die doppelte Anzahl an FLT3-Molekülen exprimieren. Werden die Zellen allerdings mit Sorafenib behandelt, so ist auf den viablen Zellen beider Linien kaum noch FLT3 nachweisbar.

3.1.9 Serumkinetik von 4G8SDIEM *in vivo*

Die bisher gezeigten Daten waren Grundlage für die klinische Anwendung von 4G8SDIEM in Kooperation mit der Medizinischen Klinik II (Universitätsklinikum Tübingen). Der Antikörper 4G8SDIEM wurde im Zuge individueller Heilversuche (*engl.: compassionate need applications*) unter stringent-kontrollierten Bedingungen hergestellt (Prof. G. Jung, L. Grosse-Hovest, S. Aulwurm, Universität Tübingen). Hierzu wurde 4G8SDIEM in CHO-Zellen produziert und in universitätseigenen Reinräumen aufgereinigt. Die CHO-produzierten Antikörper verhielten sich in Bindungs- und ADCC-Experimenten erwarteterweise identisch zu den von Sp2/0-Zellen produzierten Molekülen.

Zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit waren fünf AML-Patienten im Rahmen individueller Heilversuche mit 4G8SDIEM behandelt worden (Prof. G. Jung, Universität Tübingen, Prof. H.R. Salih, Med. Klinik II, Tübingen). Die klinischen Ergebnisse dieser Behandlungen sind zwar nicht Gegenstand dieser Arbeit, die Bestimmung der Serumhalbwertszeit wurde aber von mir nach einer Methodik durchgeführt, die auf der Grundlage der hier beschriebenen Daten zur präklinischen Charakterisierung entwickelt wurde. Die Daten zur Serumkonzentration von 4G8SDIEM werden deshalb im Folgenden beschrieben und kurz diskutiert. Exemplarisch sind die Ergebnisse dieser Analysen für den ersten behandelten Patienten (AML#2) mit einer *minimal residual disease* (MRD) in Abb. 3.21 gezeigt. Die

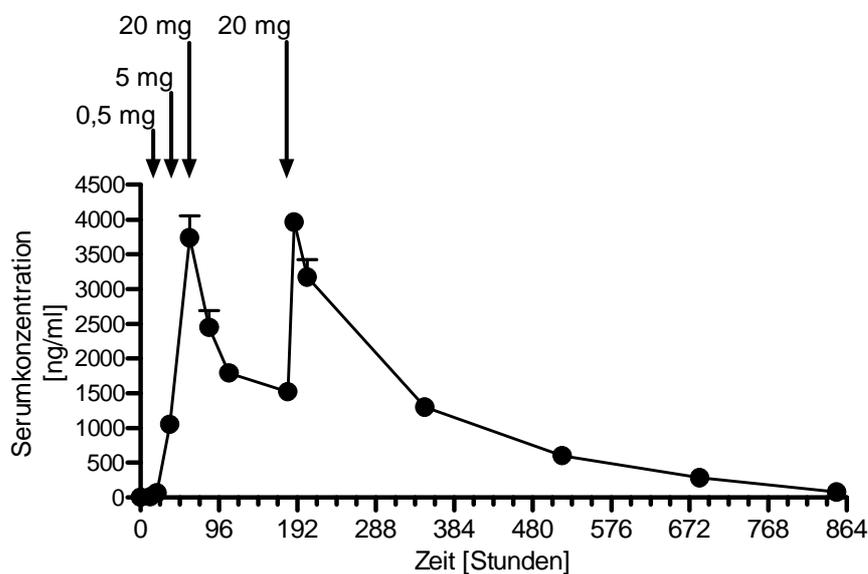


Abbildung 3.21: **4G8SDIEM-Konzentration im Serum des Patienten AML#2.** Die Konzentration von freiem 4G8SDIEM-Antikörper im Serum des AML-Patienten #2 wurde durchflusszytometrisch, wie unter Abs. 2.6.3 beschrieben, bestimmt. Pfeile zeigen die applizierten Mengen von 4G8SDIEM. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen innerhalb dreier Messpunkte.

Abb. 3.21 zeigt, dass im Verlauf der Therapie freie, intakte 4G8SDIEM-Moleküle im Serum des Patienten nachgewiesen werden. Die maximal erreichten Konzentrationen betragen dabei ca. 4 μ g/ml, und entsprachen demnach den in *in vitro*-

3.1. Fc-optimierte α FLT3-Antikörper zur Therapie akuter myeloischer Leukämien

Versuchen eingesetzten Antikörperkonzentrationen. Die errechnete Serumhalbwertszeit von 4G8SDIEM betrug in diesem Fall ca. 100 Stunden, ausgehend vom Zeitpunkt der zweiten Applikation von 20 mg 4G8SDIEM.

3.2 Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

Analog zum Wirkmechanismus SDIEM-optimierter Antikörper zielen bispezifische Moleküle mit Spezifitäten für ein Zielzell-Antigen und CD16 auf die Induktion der Zielzellyse durch immunologische Effektoren ab. Im Folgenden wird die Generierung, Optimierung und Charakterisierung bispezifischer Antikörper zur Aktivierung CD16-positiver Effektorzellen des angeborenen Immunsystems beschrieben. Dabei sollten verschiedene Derivate bispezifischer rekombinanter Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin (ENG) und Fc γ RIIIa (CD16) verglichen und so das erfolgsversprechendste Molekül identifiziert werden.

Als Ausgangspunkt dienten dabei die von Dipl.-Biol. K. Schwartz (Universität Tübingen) mittels Hybridomtechnik generierten und im Folgenden rekombinant hergestellten Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM.

In Abb. 3.22 ist eine schematische Übersicht über die generierten Moleküle gegeben.

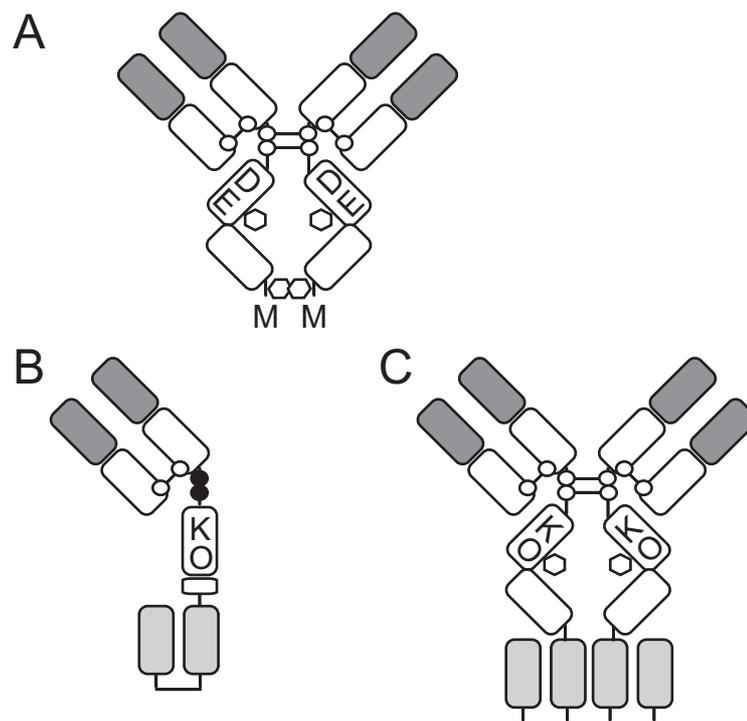


Abbildung 3.22: **Übersicht über die generierten Formate der ENGxCD16-Antikörper.** Ausgehend von den chimären SDIEM-optimierten Antikörpern K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM (A) wurden die in B) und C) dargestellten Moleküle generiert. **B)** Bivalent bispezifischer Antikörper NK8-C16-N297Q bzw. NK23-C16-N297Q. **C)** Tetravalenter bispezifischer Antikörper NK8-C16-FcKO bzw. NK23-C16-FcKO.

Die variablen Domänen mit ENG-Spezifität sind in Dunkelgrau, die variablen Domänen mit CD16-Spezifität in Hellgrau dargestellt. **DE:** SDIEM-Optimierung der C_H2-Domäne. **M:** myc-Tag. **KO:** knock-out-Mutationen der C_H2-Domäne. o: Cysteine, durch Disulfidbrücken verbunden. ●: Cysteinu-Serin-Mutation. **Hexagone** stellen Glykosylierungsstellen dar.

Die generierten Antikörper-ähnlichen Moleküle basieren dabei auf Formaten, welche von Dr. M. Durben und Dr. L. Grosse-Hovest entwickelt wurden [Durben, 2012]. Durch die gezielte Mutation von sechs Aminosäuren, sowie der Deletion einer weiteren innerhalb der C_H2 -Domäne konnte dabei ein attenuierter Fc-Teil (FcKO) generiert werden, dessen Bindung an Fc γ -Rezeptoren stark vermindert ist.

„Halbe“ Moleküle wurden durch die Mutation der zwei Cystein-Positionen innerhalb der *hinge*-Region zu Serin generiert. So wird die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei schweren Ketten verhindert. Die gleichzeitige Deletion eines Großteils der C_H3 -Domäne trägt weiterhin zur Verhinderung der Dimerisierung schwerer Ketten bei. Im Zuge dieser „Halbierung“ des Moleküls wurde durch die Mutation des Asparagins an Position 297 zu Glutamin (N297Q) die Glykosylierungsstelle innerhalb der C_H2 -Domäne deletiert. Begründet ist dies durch die starke Exposition der Kohlenhydrate im „Halb“-Format.

3.2.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung der Moleküle

Ausgehend von den Vektoren K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM wurden die Plasmide NK8-C16-N297Q und NK23-C16-N297Q (entsprechend der Teilabb. 3.22B) durch *NheI/XhoI*-vermittelte Klonierung des entsprechenden Inserts aus dem Vektor NF-C16-N297Q generiert. Analog wurden in die *AgeI/XhoI*-geöffneten Plasmide K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM die entsprechenden Inserts aus dem Vektor NF-C16-FcKO ligiert, was die Vektoren NK8-C16-FcKO und NK23-C16-FcKO (entsprechend der Teilabb. 3.22C) erzeugte.

Diese Expressionsvektoren wurden zusammen mit Plasmiden, die für die entsprechenden leichten Ketten der K-ro-Antikörper kodieren, durch Elektroporation in Sp2/0-Ag14-Zellen eingebracht. Stabile Transfektanten wurden identifiziert und expandiert, um die Moleküle an KappaSelect-Material aus dem Zellkulturüberstand aufzureinigen.

3.2.2 Proteinbiochemische Analyse der Moleküle

Die aufgereinigten Moleküle wurden initial bezüglich Homogenität und Aggregation mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Als Vergleich dienten dabei die Ausgangsmoleküle K-ro8SDIEM, bzw. K-ro23SDIEM. Grundsätzlich zeigten die Elutionsprofile aller Moleküle, mit Ausnahme der Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM, mehr als einen Peak, was auf erhöhte Tendenzen zur Aggregatbildung, bzw. auf Konformationsvarianten der Moleküle hindeutete.

Die resultierenden Chromatogramme dieser Analysen sind in den Abb. 3.23 und 3.24 dargestellt. Die Antikörper K-ro8SDIEM (Abb. 3.23 A) und K-ro23SDIEM (Abb. 3.24 A) zeigten dabei einen distinkten Einzelpeak. Das aberrant langsame Elutionsverhalten von K-ro8SDIEM auf dieser Gelchromatographiesäule ist ein bereits bekanntes Charakteristikum dieses Antikörpers [Dipl.Biol. Karolin Schwartz, unveröffentlichte Daten] und ist ebenfalls bei der Analyse der Moleküle NK8-C16-N297Q und NK8-C16-FcKO zu beobachten. Im Falle von NK8-C16-N297Q (Abb. 3.23 B) konnten zwei distinkte Peaks bei einem Elutionsvolumen (V_E) von 1,50 ml bzw. 1,63 ml, sowie ein über die Ausschlussgrenze der Säule reichender Peak nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung des aberranten Laufverhaltens von K-ro8SDIEM konnten diese erstgenannten Fraktionen jedoch nicht eindeutig erklärt werden, wohingegen der letztgenannte Peak höhermolekularen Aggregaten entspricht. Die gelchromatographische Analyse von NK23-C16-N297Q (Abb. 3.24 B) resultierte demgegenüber in zwei distinkten Peaks bei V_E von 1,21 ml und 1,40 ml, welche entsprechend ihrem apparenten Molekulargewicht dimerisierte und monomere Moleküle darstellen. Der Anteil der Dimere an der Gesamtproteinmenge ist hier gering. Weiterhin zeigte sich jedoch auch hier ein Peak, der über die Ausschlussgrenze der Säule reicht und demnach höhermolekulare Aggregate vermuten ließ. Dieses Verhältnis setzte sich bei der Analyse der tetravalenten Moleküle NK8-C16-FcKO und NK23-C16-FcKO fort. So weist das Elutionsprofil von NK23-C16-FcKO (Abb. 3.24 C) neben einem Peak bei einem V_E von 1,44 ml, welcher wahrscheinlich freien leichten Ketten entspricht, einen distinkten Peak bei einem V_E von 1,19 ml auf, welcher monomeren Molekülen entspricht. Demgegenüber erscheint das Chromatogramm der Analyse von NK8-C16-FcKO (Abb. 3.23 C) extrem heterogen. Entsprechend der bei einem Volumen von ca. 1,61 ml eluierten Fraktion ließen sich hier Konatminationen mit freien leichten Ketten des Moleküls vermuten. Eine weitere Einteilung der Fraktionen in Aggregate bzw. Konformationsvarianten, sowie monomeren Molekülen war jedoch, wegen des abberanten Elutionsverhaltens der K-ro8-Moleküle nicht möglich.

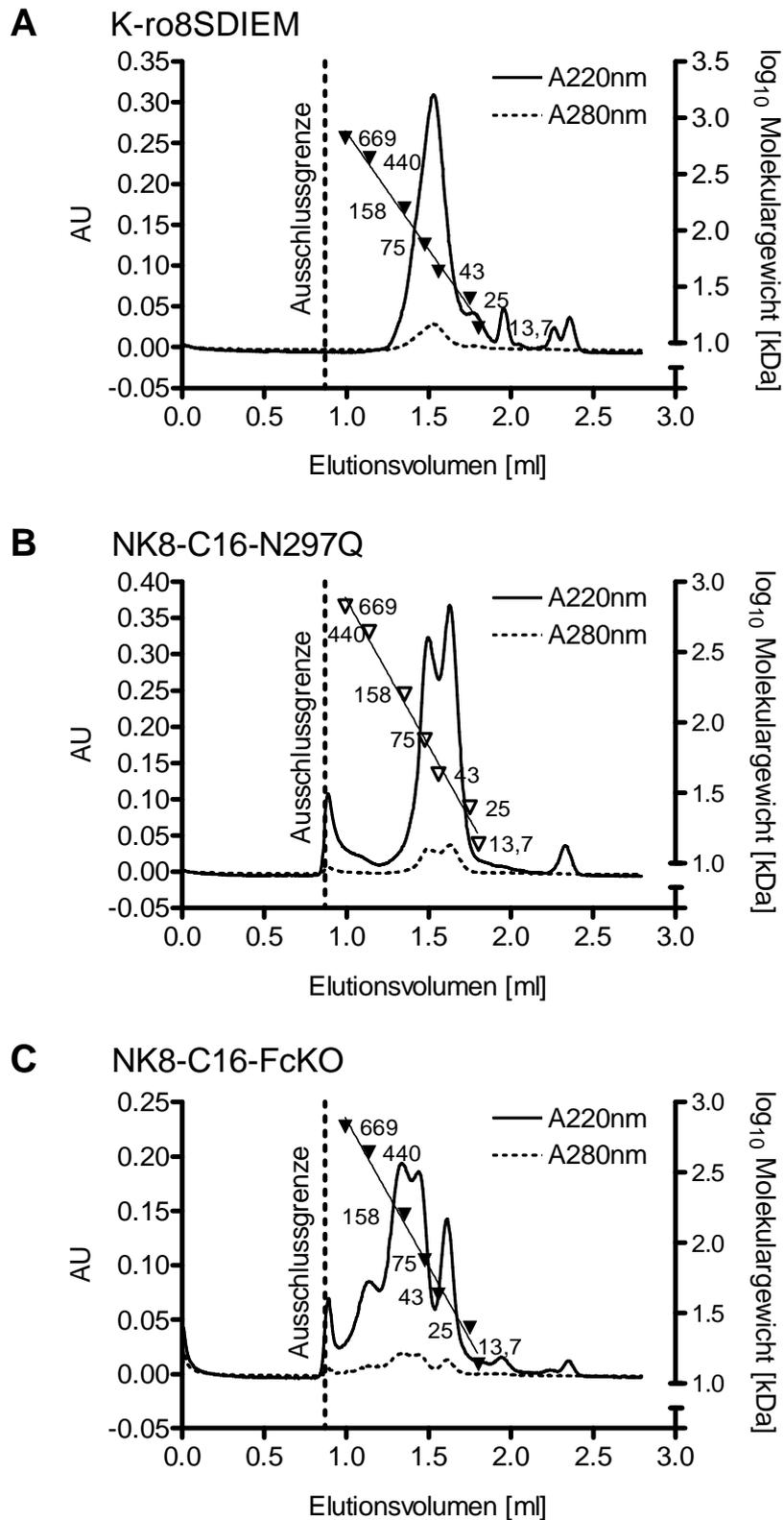


Abbildung 3.23: Analytische Gelchromatographie der NK8-Konstrukte. Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine K-ro8SDIEM (A), NK8-C16-N297Q (B) und NK8-C16-FcKO (C). Aufgetragen wurden 8 μg (K-ro8SDIEM, A), bzw. 10 μg (NK8-C16-N297Q, B; NK8-C16-FcKO, C) Protein.

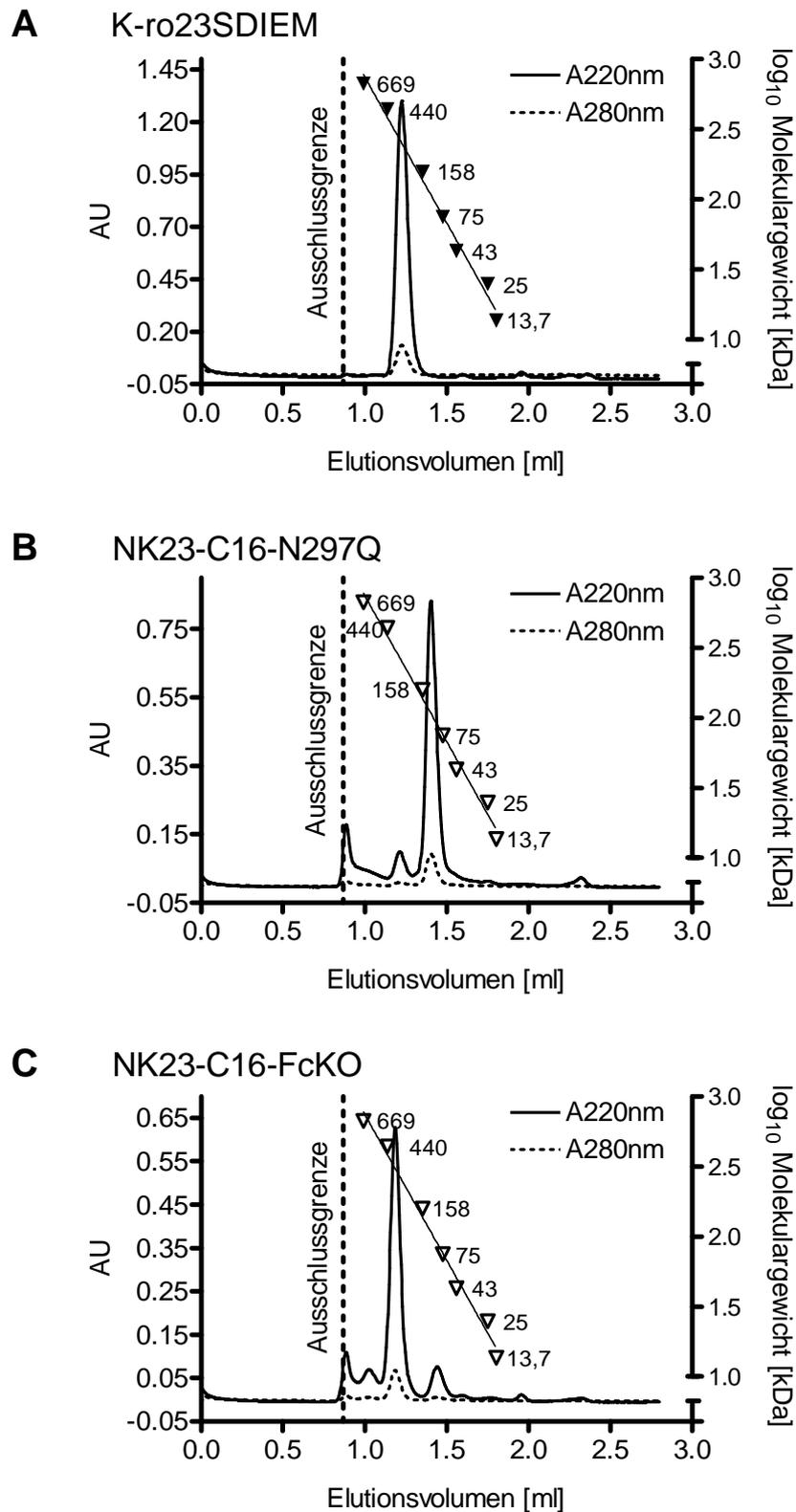


Abbildung 3.24: Analytische Gelchromatographie der NK23-Konstrukte. Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine K-ro23SDIEM (A), NK23-C16-N297Q (B) und NK23-C16-FcKO (C). Aufgetragen wurden 10 μ g Protein.

3.2.3 Disulfid-Stabilisierung des C-terminalen 3G8-scF_V

Ausgehend von der Hypothese, dass die C-terminalen scF_V-Domänen maßgeblich die Aggregation der generierten Moleküle beeinflussen, wurden stabilisierende Mutationen in die V_H- und V_L-Domänen des 3G8-scF_V-Moleküls eingebracht. Dabei wurden Nukleotid-Codons an Positionen, welche schon im Jahr 1993 durch Brinkmann et al. identifiziert wurden [Brinkmann et al., 1993], gegen Cystein-kodierende Codons ausgetauscht. Im translatierten scF_V sollten diese Mutationen zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Domänen V_H und V_L des 3G8-scF_V führen.

Die Cystein-kodierenden DNA-Sequenzen wurden mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der Oligonukleotide *3G8-Cys-fw*, sowie *3G8-Cys-rev1*, bzw. *3G8-Cys-rev2* in die für das 3G8-scF_V-Molekül kodierende Sequenz eingebracht. Die daraus resultierenden Expressionsvektoren kodierend für die Moleküle NK8-dsC16-N297Q, NK8-dsC16-FcKO, bzw. NK23-dsC16-N297Q und NK23-dsC16-FcKO wurden im Folgenden durch Elektroporation in Sp2/0-Ag14-Zellen eingebracht, stabil-transfizierte Klone expandiert und die Moleküle an KappaSelect-Material aufgereinigt.

Die Analyse dieser Moleküle hinsichtlich Aggregation und Integrität erfolgte ebenfalls durch analytische Gelchromatographie. Die Elutionsprofile dieser Analysen sind in den Abb. 3.25 und Abb. 3.26 dargestellt. Auch die Moleküle NK8-dsC16-N297Q und NK8-dsC16-FcKO wiesen das für die Familie der K-ro8-Antikörper charakteristisch-langsame Laufverhalten in der Gelmatrix auf (vgl. Abb. 3.25). Wie aus Abb. 3.25 A ersichtlich ist, resultierte die Cystein-Stabilisierung von NK8-dsC16-N297Q in einer Änderung des Elutionsverhaltens, verglichen mit dem Molekül NK8-C16-N297Q (Abb. 3.23 B). So war nun ein dominanter Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 1,63 ml, sowie ein zweiter, kleinerer Peak bei einem V_E von ca. 1,52 ml nachweisbar. Das Chromatogramm der Analyse von NK8-dsC16-FcKO ist in Abb. 3.25 B dargestellt und zeigt ebenfalls einen dominanten Peak, der wahrscheinlich monomerem Protein entspricht. Kontaminierende Dimere sind der Schulter dieses Peaks zuzuordnen. Die Ergebnisse der Analysen der Proteine NK23-dsC16-N297Q (3.26 A) und NK23-dsC16-FcKO (3.26 B) zeigen jeweils schlanke Einzelpeaks, welche monomeren Molekülen entsprachen. Somit war die Multimerisierung bzw. Aggregation in diesen Fällen deutlich vermindert.

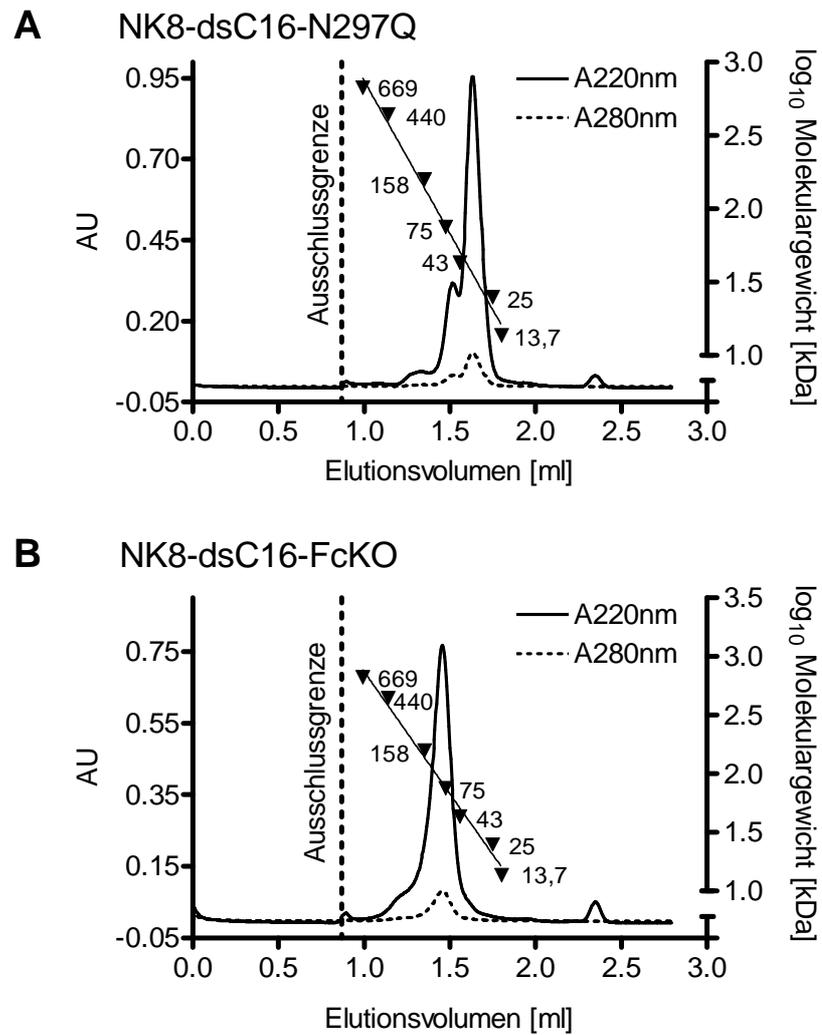


Abbildung 3.25: **Analytische Gelchromatographie der disulfid-stabilisierten NK8-Konstrukte.** Dargestellt sind die Elutionsprofile der Proteine NK8-dsC16-N297Q (A) und NK8-dsC16-FcKO (B). Aufgetragen wurden 10 μg Protein.

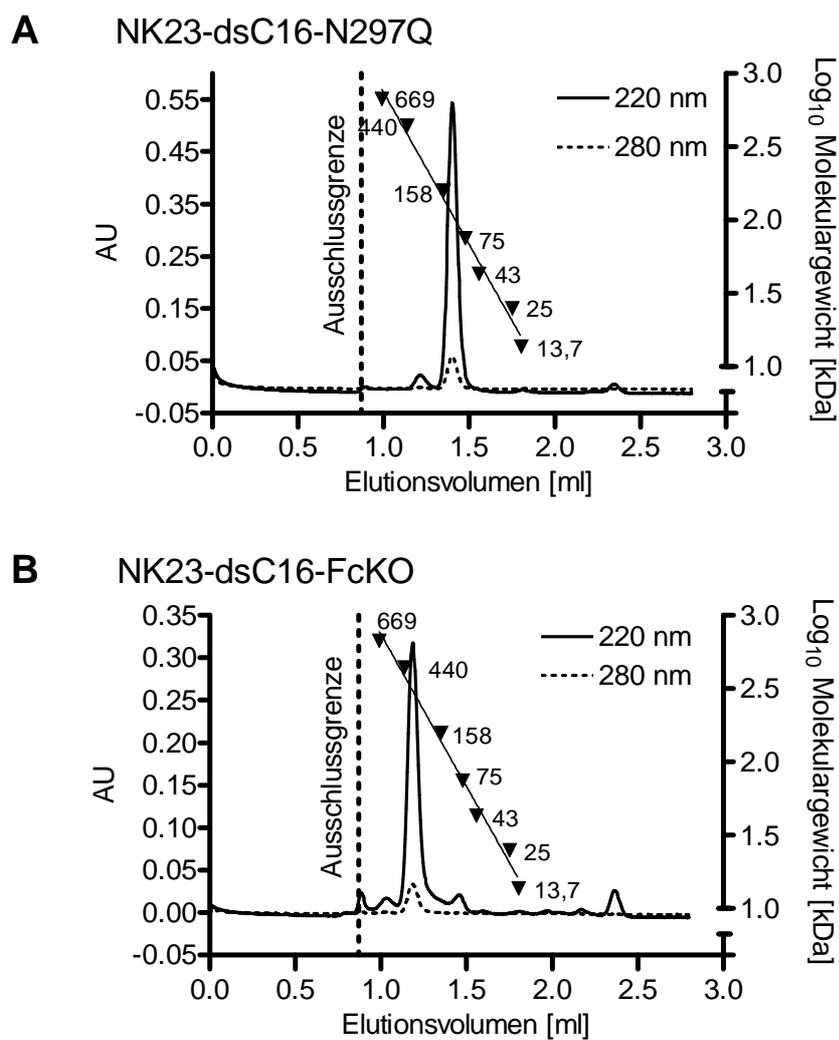


Abbildung 3.26: **Analytische Gelchromatographie der disulfid-stabilisierten NK23-Konstrukte.** Dargestellt ist das Elutionsprofil der Proteine NK23-dsC16-N297Q (A) und NK23-dsC16-FcKO (B). Aufgetragen wurden 4 μg (A), bzw. 5 μg (B) Protein.

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

Im Rahmen der proteinbiochemischen Analyse der generierten Antikörper-Derivate erfolgte weiterhin eine elektrophoretische Trennung der Moleküle mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden sowie unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Als Vergleich dienten dabei erneut die Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM.

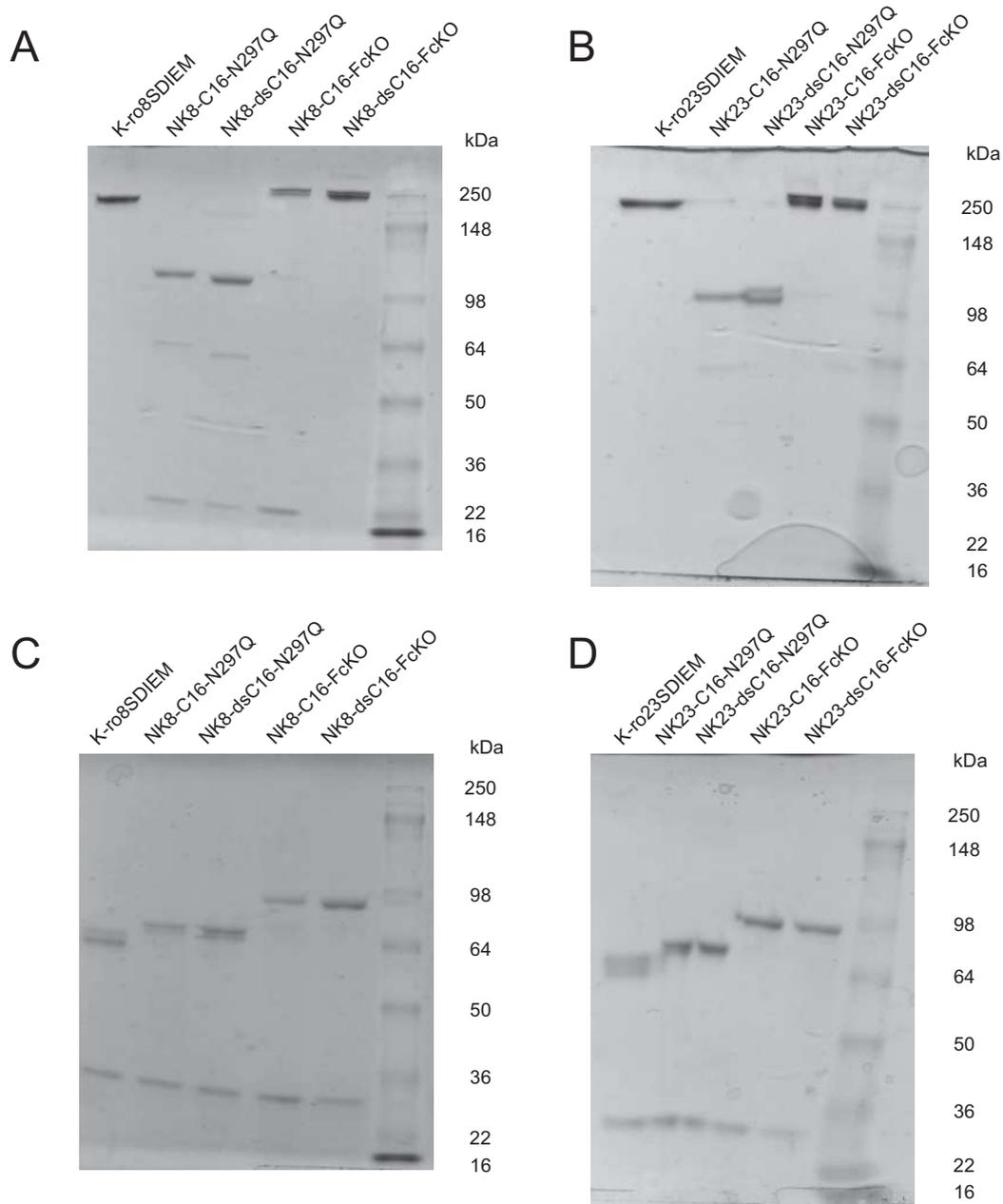


Abbildung 3.27: **SDS-PAGE-Analyse der Konstrukte.** 2 μ g Protein wurden unter nicht-reduzierenden (A, B), sowie unter reduzierenden Bedingungen auf 10% Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch getrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Coomassie-Brillant-Blue-Färbung und anschließender Entfärbung der Gele. Aufgetragen ist weiterhin das apparente Molekulargewicht des Größenstandards (SeeBlue[®] Plus2 Prestained).

Die anhand der Aminosäuresequenzen berechneten Molekulargewichte der Moleküle betragen für die chimären SDIEM-Antikörper ca. 160 kDa, für die „halbierten“ N297Q-Moleküle ca. 98 kDa, sowie für die tetravalenten FcKO-Moleküle ca. 190 kDa.

Wie aus Abb. 3.27 A ersichtlich ist, konnten unter nicht-reduzierenden Bedingungen distinkte Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht entsprechend der errechneten Masse für jedes Molekül der K-ro8-Familie nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigten jedoch die Moleküle NK8-C16-N297Q und NK8-dsC16-N297Q weitere distinkte Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 64 kDa und 22 kDa, welche freien schweren und leichten Ketten der Moleküle entsprachen. Eine distinkte Bande entsprechend freier leichter Ketten konnte weiterhin auch im Fall von NK8-C16-FcKO nachgewiesen werden.

Die Abb. 3.27 B zeigt die analogen Ergebnisse für die Moleküle der K-ro23-Familie. Auch hier konnten distinkte Proteinbanden entsprechend den errechneten Molekulargewichten nachgewiesen werden. Lediglich im Fall von NK23-C16-N297Q konnten auch distinkte Banden, welche dissoziierten schweren und leichten Ketten entsprachen, detektiert werden.

Weiterhin resultierte die elektrophoretische Trennung von NK23-dsC16-N297Q unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer Doppelbande, welche sich jedoch nicht erklären lässt.

Unter reduzierenden Bedingungen dissoziierten alle Moleküle in die entsprechenden schweren und leichten Ketten. Das errechnete Molekulargewicht der leichten Ketten aller Moleküle beträgt dabei ca. 25 kDa. Die errechneten Massen der schweren Ketten der einzelnen Moleküle unterscheiden sich und betragen im Falle chimärer SDIEM-Antikörper ca. 55 kDa, im Falle der „halbierten“ N297Q-Moleküle ca. 65 kDa, und im Falle der tetravalenten FcKO-Moleküle ca. 80 kDa.

Wie aus den Abb. 3.27 B und C ersichtlich ist, konnten für alle Moleküle distinkte Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht entsprechend der errechneten Massen nachgewiesen werden. Lediglich die schweren Ketten der chimären Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM zeigten Doppelbanden, die durch die zwei Glykosylierungsstellen der Proteine begründet sind. Die unter nicht-reduzierenden Bedingungen nachgewiesene Doppelbande des NK23-dsC16-N297Q-Moleküls (vgl. Abb. 3.27 B) war hier nicht mehr detektierbar.

3.2.4 Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle an Endoglin und CD16

Die Bindung an ENG wurde unter Verwendung der ENG-positiven Zelllinien REH und NALM-16 durchflusszytometrisch analysiert. Der Nachweis der Bindung an CD16 erfolgte durch die Generierung einer CD16-positiven Sp2/0-Ag14-Zelllinie, welche mit Expressionsvektoren kodierend für die α -Kette des humanen Fc γ -Rezeptor IIIa (Acc.Nr.: BC017865), und für die γ -Kette des humanen Fc ϵ -Rezeptor I (Acc.Nr.: NM004106) transfiziert wurden.

Ein repräsentatives Ergebnis dieser Bindungsanalysen ist in Abb. 3.28 gezeigt. Als Kontrollen und Vergleich wurden hier die Antikörper K-ro8SDIEM, K-ro23SDIEM, sowie der CD16-spezifische Maus-Antikörper 3G8 mitgeführt. Diese Analysen zeigten die Konzentrations-abhängige Bindung aller Moleküle auf den verwendeten Zelllinien. Die verminderte maximal-erreichbaren Fluoreszenzintensitäten der „halbierten“ Moleküle, verglichen mit den tetravalenten Molekülen und den SDIEM-optimierten Antikörpern, war hierbei durch die geringere Anzahl an Bindungsstellen für die Sekundärreagenzien erklärbar.

Die in Abb. 3.28 A), B) und C) dargestellten Titrationskurven der Moleküle zeigen, dass die tetravalenten Moleküle NK8-dsC16-FcKO, NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO mit den entsprechenden Antikörpern K-ro8SDIEM bzw. K-ro23SDIEM vergleichbare Affinitäten zu ENG aufwiesen. Lediglich die Affinität von NK8-C16-FcKO gegenüber ENG erscheint vermindert, was jedoch auf die Kontamination mit freien leichten Ketten, sowie Aggregaten (vgl. Abb. 3.23C) zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wiesen die „halbierten“ Moleküle NK8-C16-N297Q, NK8-dsC16-N297Q, sowie NK23-C16-N297Q und NK23-dsC16-N297Q deutlich verminderte Affinitäten gegenüber Endoglin auf. Dieser Verlust von Bindungsaktivität war, begründet durch die Monovalenz dieser Moleküle, erwartet.

Die Abb. 3.28 E) und F) zeigen die konzentrationsabhängige Bindung aller Moleküle auf CD16-exprimierenden Sp2/0-Ag14-Zellen. Als Vergleich diente hier der Maus-Antikörper 3G8, welcher über das entsprechende Sekundärreagenz detektiert wurde. Der direkte Vergleich aller Moleküle zeigte hier einen massiven Verlust der Bindungsaffinität des 3G8scF_V im Kontext der bispezifischen Antikörperderivate gegenüber dem parentalen Antikörper m3G8. Da auch die tetravalenten Moleküle dem parentalen Antikörper hinsichtlich der Affinität gegenüber CD16 unterlegen waren, ist dieser Verlust durch das *single chain*-Format der 3G8-V_H-V_L Domänen begründet und weniger durch die Univalenz. Gleichzeitig wird jedoch deutlich, dass die tetravalenten Moleküle NK8-dsC16-FcKO, sowie NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO bezüglich ihrer Affinität zu CD16 sowohl den „halbierten“ Molekülen, als auch den SDIEM-optimierten Antikörpern überlegen waren. Auch hier war die schwache Bindung von NK8-C16-FcKo mit der Aggregation bzw. der Kontamination dieses Proteins mit freier leichter Kette zu erklären.

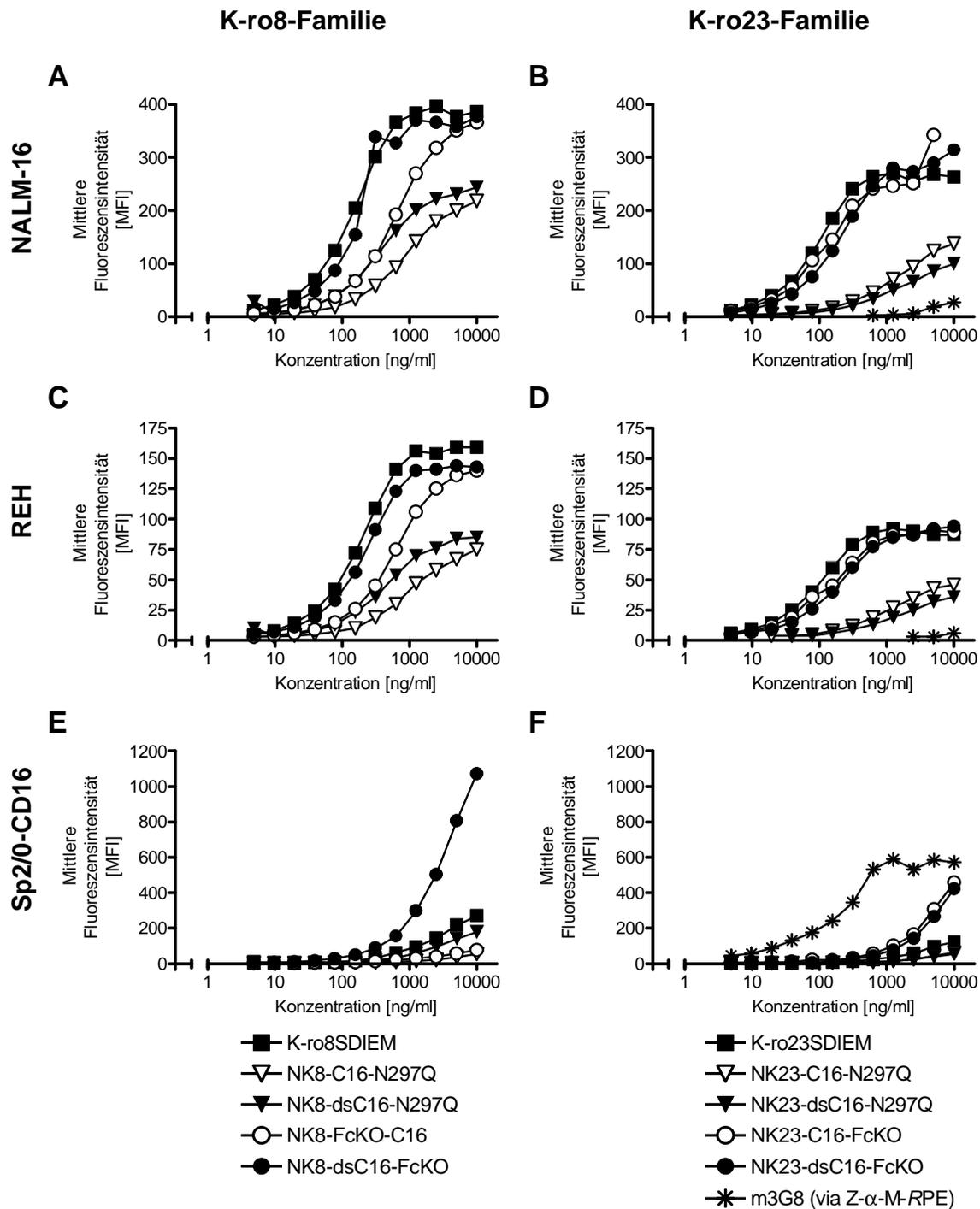


Abbildung 3.28: **Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der generierten bispezifischen Moleküle.** ENG⁺ NALM-16- (A) und REH- (B), sowie Sp2/0-CD16- (C) Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Antikörper(-Derivate) inkubiert. Gebundene Moleküle wurden mittels polyklonaler, PE-markierter Ziege- α Mensch (Fc γ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmente markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Der CD16-spezifische Maus-Antikörper m3G8 (*) diente als Vergleich und wurde mittels polyklonaler, PE-markierter Ziege- α Maus (Ig γ s und Ig μ -spezifischen) F(ab)₂-Fragmente markiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der analysierten Zellen.

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluss der Cystein-Mutationen des ds3G8-scF_V auf die Stabilität der Moleküle in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Dazu wurden die Proteine in FACS-Puffer bei 4°C oder aber bei 37°C inkubiert und die Bindung der Moleküle durchflusszytometrisch analysiert.

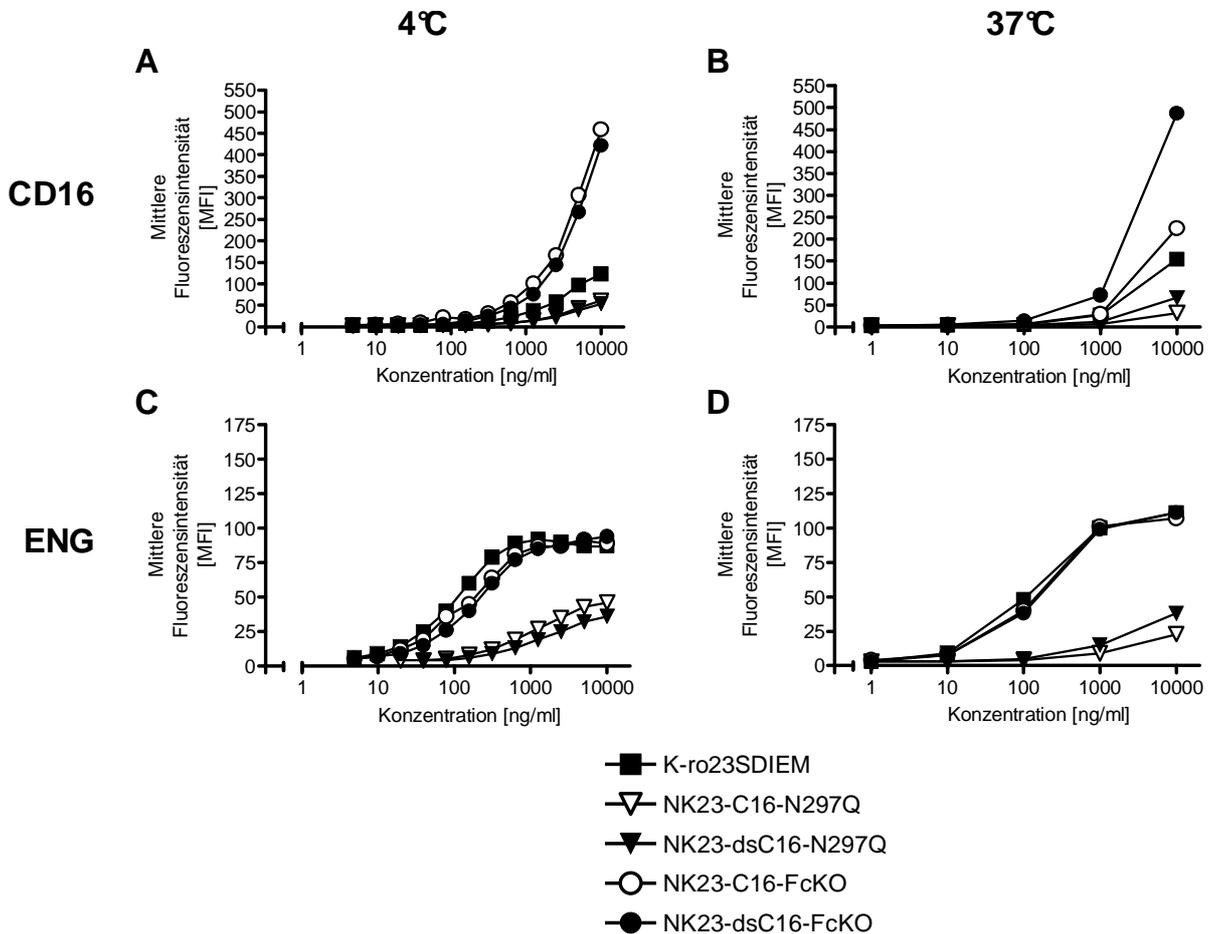


Abbildung 3.29: **Durchflusszytometrische Analyse der Temperaturstabilität der bispezifischen Moleküle.** Die generierten bispezifischen Moleküle, sowie die entsprechenden SDIEM-optimierten Antikörper der K-ro23-Familie wurden für 4 Stunden bei Temperaturen von 4°C oder 37°C mit einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden Verdünnungsreihen dieser Proben mit Sp2/0-CD16- und REH-Zellen inkubiert und gebundene Moleküle mittels polyklonaler, RPE-markierter Ziege-αMensch- (Fcγ-spezifischen) F(ab)₂-Fragmente durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der analysierten Zellen.

Ein repräsentatives Ergebnis dieser Versuche unter Verwendung der Moleküle der K-ro23-Familie ist in Abb. 3.29 dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass die Inkubation der Moleküle bei 37°C in einem Verlust der Bindungsaktivität von NK23-C16-FcKO an CD16-exprimierende Sp2/0-Ag14-Zellen resultierte. Die Bindung an ENG blieb von der Inkubation des Moleküls bei 37°C jedoch unbeeinflusst. Somit konnte der Verlust des Proteins durch Adsorption an das Inkubationsgefäß als Ursache für diese Ergebnisse ausgeschlossen werden. Für alle weiteren Moleküle der K-ro23-Familie konnte kein Einfluss erhöhter Temperatur auf das Bindungsver-

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

halten an die Zielantigene ENG und CD16 nachgewiesen werden.

Diese Versuche wurden ebenfalls mit den Molekülen der K-ro8-Familie durchgeführt. Hier konnte allerdings kein Einfluss der Inkubation bei 37°C auf die Bindungseigenschaften der Moleküle nachgewiesen werden, was möglicherweise auf die bereits vorhandenen Kontaminationen der NK8-C16-FcKO-Präparation mit freien leichten Ketten und Aggregaten und die daraus resultierende, schon verminderte Bindung der Moleküle an CD16 zurückzuführen war.

3.2.5 Charakterisierung der ADCC-Vermittlung durch bispezifische ENGxCD16-Moleküle

Die wichtigste zu analysierende Eigenschaft der neu-generierten bispezifischen Moleküle der K-ro8- und K-ro23-Familien war ihre Potenz bei der Vermittlung der Lyse Endoglin-positiver Zielzellen, sowie der direkte Vergleich mit den entsprechenden Fc-optimierten Ig γ 1-Antikörpern. Die biologische Aktivität der Moleküle wurde unter Verwendung des ^{51}Cr -Freisetzungstests bestimmt, wobei die Zelllinien REH und NALM-16 als Zielzellen dienen.

Die Abb. 3.30 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments zur Testung der Moleküle der K-ro23-Familie im direkten Vergleich mit dem SDIEM-optimierten Antikörper.

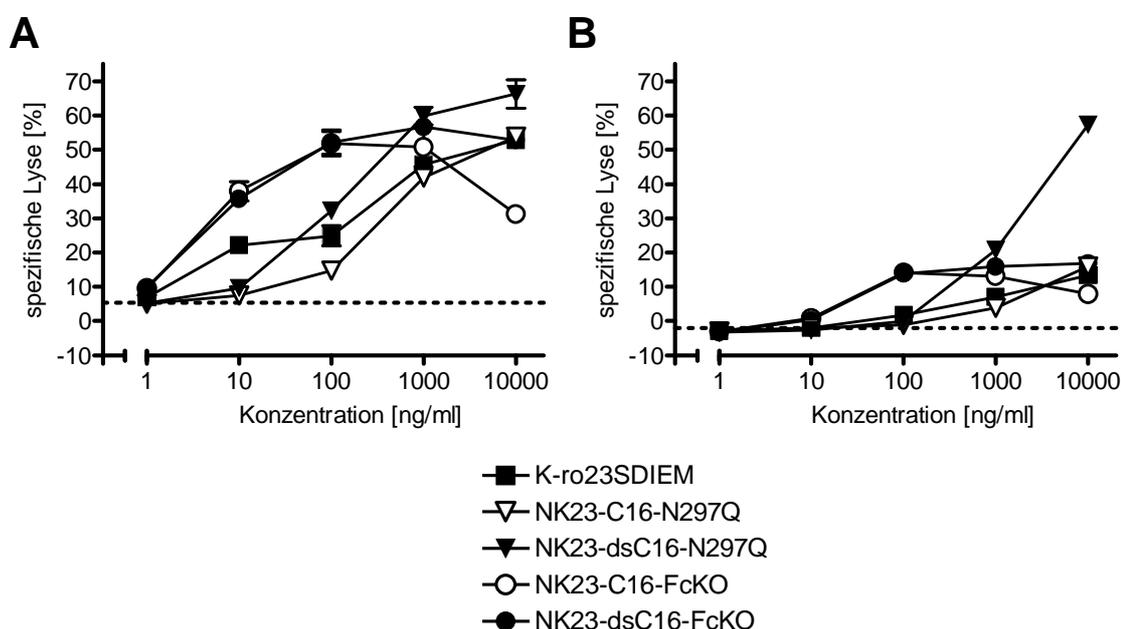


Abbildung 3.30: **ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro23-Familie.** ^{51}Cr -markierte NALM-16- (A), bzw. REH- (B) Zellen wurden mit PBMC eines gesunden Spenders (#005) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen der bispezifischen Moleküle oder des Antikörpers K-ro23SDIEM, bzw. als Negativkontrolle nur mit RPMI-Komplettmedium (- -) inkubiert. Das Verhältnis zwischen PBMC und Zielzellen lag dabei bei 50:1. Die Zielzelllyse wurde nach 4 Stunden durch die Quantifizierung der Radiokativität im Überstand bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von dreien (A) bzw. zweien (B).

Wie die Abb. 3.30 zeigt, induzierten alle getesteten Moleküle die Konzentrationsabhängige Lyse der ENG-positiven Zielzellen. Der direkte Vergleich von Versuchen mit den beiden Zelllinien NALM-16 (A) und REH (B) zeigte dabei eine deutlich ineffizientere Lyse der REH-Zellen, was auf eine erhöhte Resistenz dieser Zellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse hinwies. Dieser Effekt konnte ebenfalls unter Verwendung von PBMC anderer Spender beobachtet werden.

In allen Experimenten konnte weiterhin die effizientere Vermittlung der Zielzelllyse durch die tetravalenten Moleküle NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO, vergli-

chen mit den bivalenten (NK23-C16-N297Q, NK23-dsC16-N297Q), sowie mit dem Fc-optimierten Antikörper K-ro23SDIEM bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden. So benötigten die tetravalenten Moleküle ca. 10- bis 100-fache geringere Konzentrationen zur Vermittlung vergleichbarer Lysewerte, als die bivalenten Moleküle bzw. der Fc-optimierte Antikörper K-ro23SDIEM. Die maximal erreichte Zielzellyse durch die einzelnen Moleküle unterschieden sich dabei kaum. Lediglich in hohen Konzentrationen (1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zeigte das Molekül NK23-C16-FcKO überraschenderweise eine verminderte Aktivität. Weiterhin konnten wiederholt unter Verwendung der REH-Zelllinie eine unerwartet hohe Zielzellyse durch NK23-dsC16-N297Q bei der maximalen Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nachgewiesen werden. Dieser Effekt war unter Verwendung von NALM-16-Zellen jedoch nicht nachweisbar.

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

Begründet durch die von Dipl.-Biol. Karolin Schwartz nachgewiesene deutlich erhöhte Spezifität des Antikörpers K-ro8SDIEM für Endoglin, welches von Endothelzellen innerhalb malignen Gewebes exprimiert wird (vgl. 1.3.4), wurde der Schwerpunkt der Charakterisierung der biologischen Aktivität im Folgenden auf die Familie der K-ro8-Moleküle gelegt. Diese wurden initial ebenfalls in ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 3.31 und Abb. 3.32 zusammengefasst.

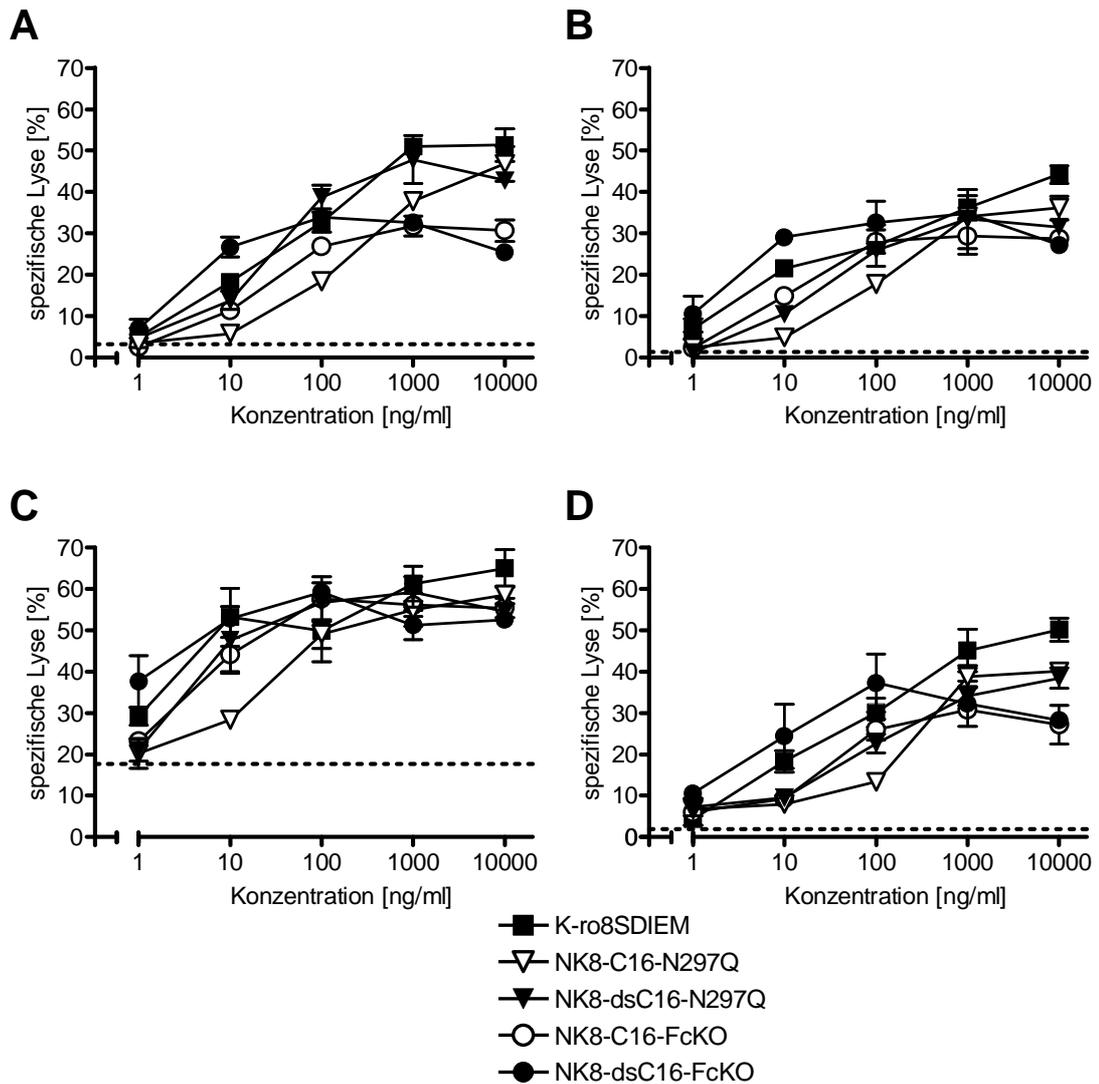


Abbildung 3.31: **ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro8-Familie.** ^{51}Cr -markierte NALM-16-Zellen wurden mit PBMC von vier gesunden Spendern (#005: A; #006: B; #031: C; #034: D) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen der bispezifischen Moleküle oder des Antikörpers K-ro8SDIEM, bzw. als Negativkontrolle nur mit RPMI-Komplettmedium (- -) inkubiert. Das Verhältnis zwischen PBMC und Zielzellen lag dabei bei 50:1. Die Zielzellyse wurde nach 4 Stunden durch die Quantifizierung der Radiokativität im Überstand bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten.

Grundsätzlich konnte unter Verwendung von NALM-16-Zellen und den PBMC

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

von vier gesunden Spendern (Abb. 3.31) vergleichbare biologische Aktivitäten aller untersuchten Moleküle nachgewiesen werden. Lediglich das bivalente Molekül NK-23-C16-N297Q zeigte eine deutlich ineffizientere Vermittlung der Zielzelllyse bezüglich der benötigten Konzentrationen. Weiterhin induzierten die tetravalenten Moleküle NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO in zwei Experimenten (Abb. 3.31 A und D), verglichen mit den übrigen Molekülen, deutlich verringerte maximale Lysewerte.

Die Abb. 3.32 zeigt die Ergebnisse von Experimenten unter Verwendung von REH-Zellen als Zielzellen, wobei die Effektorpopulationen dabei identisch mit den schon gezeigten Experimenten (vgl. Abb. 3.31) waren.

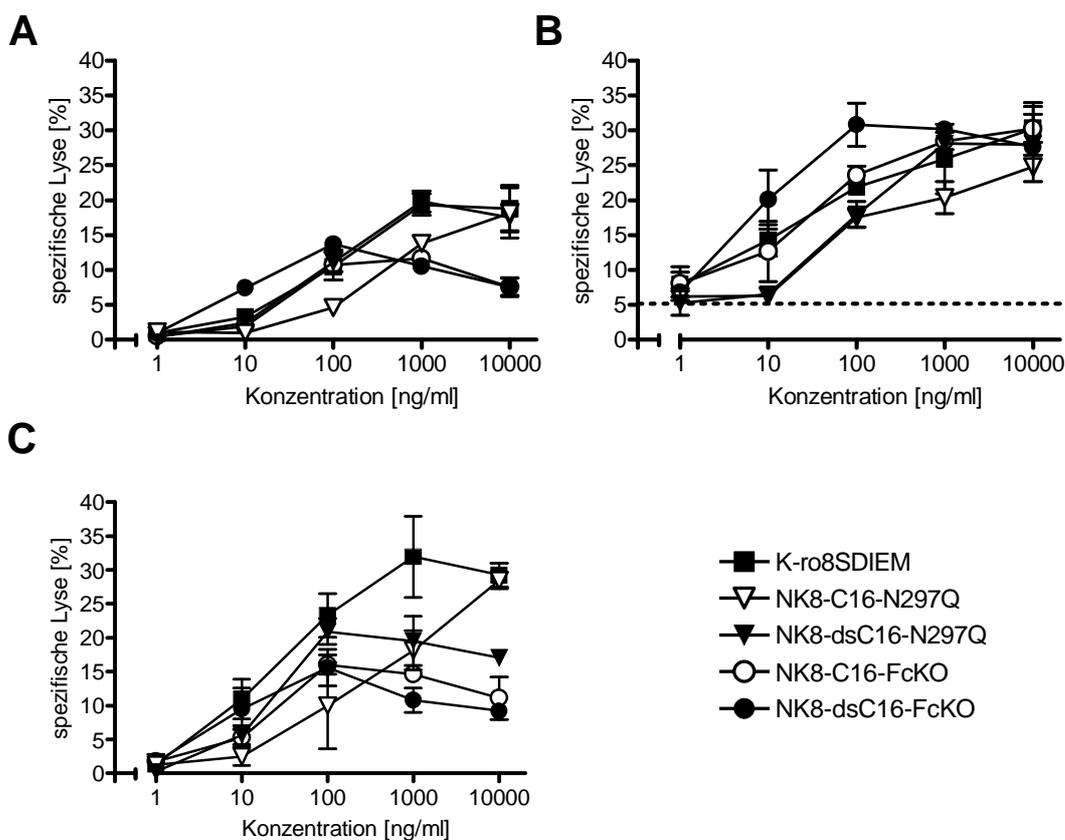


Abbildung 3.32: ADCC-Vermittlung der bispezifischen ENGxCD16-Moleküle der K-ro8-Familie. ⁵¹Cr-markierte REH-Zellen wurden mit PBMC von drei gesunden Spendern (#005: A; #006: B; #031: C) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen der Moleküle K-ro8SDIEM (■), NK8-C16-N297Q (▽), NK8-dsC16-N297Q (▼), NK8-C16-FcKO (●) und NK8-dsC16-FcKO (○), bzw. als Negativkontrolle nur mit RPMI-Komplettmedium (- -) inkubiert. Das Verhältnis zwischen PBMC und Zielzellen lag dabei bei 50:1. Die Zielzelllyse wurde nach 4 Stunden durch die Quantifizierung der Radiokativität im Überstand bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten.

Auch hier zeigten sich die REH-Zellen als deutlich resistenter gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse, was aus den geringeren maximal-erreichten Lysewerten ersichtlich war. Weiterhin lieferten diese Experimente vergleichbare Ergebnisse bezüglich der biologischen Aktivität der einzelnen Moleküle, wie die Versuche unter Verwendung

3.2. Generierung bispezifischer Antikörper mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

von NALM-16-Zellen.

Die bispezifischen Moleküle zeigten auch in diesen Experimenten eine mit dem Fc-optimierten Antikörper vergleichbare Potenz in der Vermittlung der Zielzellyse. Lediglich in einem Experiment (Abb. 3.32 C) konnte die durch K-ro8SDIEM induzierte Zielzellyse durch keines der bispezifischen Moleküle, mit Ausnahme von NK23-C16-N297Q, erreicht werden. Allerdings zeigte das bivalente Molekül NK23-C16-N297Q wiederum in allen Experimenten eine deutlich verminderte Aktivität bezüglich der konzentrationsabhängigen Zielzellyse.

3.3 Generierung monoklonaler, agonistischer α OX40-Antikörper

3.3.1 Generierung monoklonaler α OX40-Antikörper

Die Generierung von Hybridomen zur Produktion monoklonaler Antikörper setzt die Verfügbarkeit des Antigens zur Immunisierung von Mäusen voraus. Bei membranständigen Antigenen bestehen dabei prinzipiell die Möglichkeiten der Applikation von aufgereinigtem (zumeist rekombinant hergestelltem) Protein, bzw. von Antigen-exprimierenden Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden OX40-exprimierende Sp2/0-Ag14- (im folgenden Sp2/0 genannt), und CHO-Zellen generiert. Die für OX40-codierende cDNA-Sequenz (Acc.Nr.: BC105072) wurde dazu in den Expressionsvektor pcDNA3-InA kloniert und dieser Vektor OX40-pcDNA3-InA mittels Elektrottransfektion in die entsprechenden Zellen eingebracht und im Folgenden stabil-transfizierte Klone isoliert. Die OX40-Expression dieser Zellen wurde unter Verwendung des kommerziell-verfügbaren Antikörpers ACT35 durchflusszytometrisch analysiert und ist in Abb. 3.33 dargestellt.

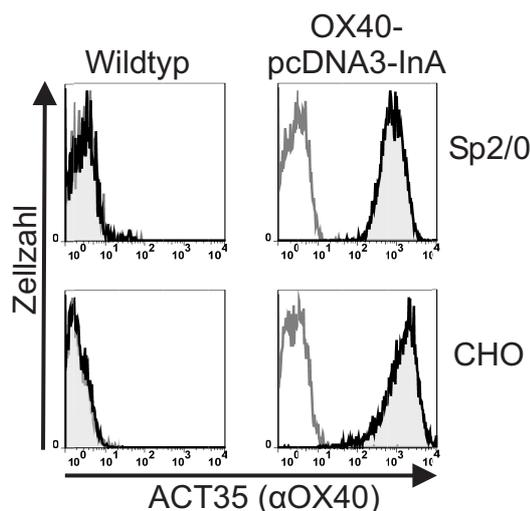


Abbildung 3.33: **OX40-Expression der transfizierten Sp2/0-Ag14 und CHO-Zellen.** Mit OX40-pcDNA3-InA transfizierte, sowie untransfizierte Sp2/0-Ag14 und CHO-Zellen wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ des Antikörpers ACT35, bzw. eines Kontrollantikörpers (mIgG1) inkubiert. Gebundener Antikörper wurde daraufhin durch die Inkubation der Zellen mit RPE-markierten Ziege- α Maus ($\text{Fc}\gamma$ - und $\text{Fc}\mu$ -spezifischen) F(ab)_2 -Fragmenten markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Bindung von ACT35 (schwarze Linien), bzw. der Isotypkontrolle (graue Linie) auf den untransfizierten (Wildtyp), bzw. den OX40-pcDNA3-transfizierten Zellen.

Im Rahmen der Immunisierungen von sieben BALB/c-Mäusen mit Sp2/0-OX40-Zellen und Fusionen der Milzen dieser Tiere konnten keine OX40-spezifischen Hybridome identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten unter Verwendung von C57BL/6-Mäusen und CHO-OX40-Zellen als Immunogen Hybridome, welche OX40-spezifische Antikörper sekretieren, generiert werden.

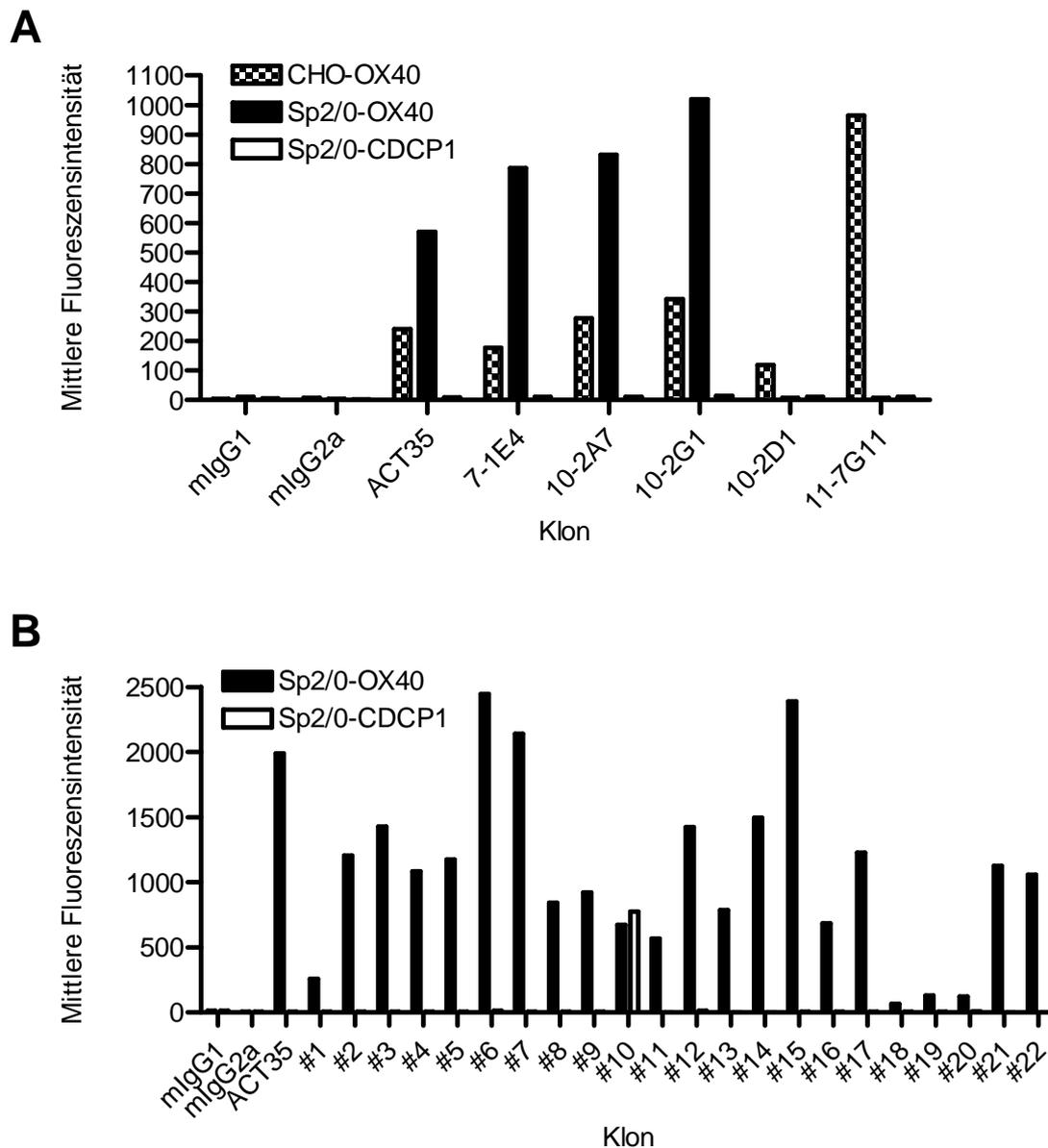


Abbildung 3.34: **Ergebnis der Fusionen 8 und 9.** Überstände von wachsenden Hybridomen aus Fusion 8 (A) und Fusion 9 (B) wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich Bindung auf den angegebenen Zelllinien untersucht. Gebundene Antikörpermoleküle wurde durch die Inkubation der Zellen mit RPE-markierten Ziege- α Maus ($Fc\gamma$ - und $Fc\mu$ -spezifischen) $F(ab)_2$ -Fragmenten markiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten viabler Zellen.

In einer ersten Analyserunde wurden die Überstände aller wachsenden Hybridomkolonien auf CHO-OX40-Zellen getestet. Die Spezifitäten der so identifizierten Klone wurden danach weiter durch Testung der Bindung auf CHO-OX40-, Sp2/0-OX40-, sowie auf Kontroll-transfizierten Sp2/0-Zellen (Sp2/0-CDCP1) bestimmt. Diese Analysen sind in Abb. 3.34 gezeigt, wobei in A) die in Fusion 8 und in B) die in Fusion 9 generierten Hybridome dargestellt sind.

In der achten Fusion konnten die OX40-spezifischen Hybridome 7-1E4, 10-2A7 und 10-2G1 generiert werden. Die Hybridome 10-2D1 und 11-7G11 sekretierten

3.3. Generierung monoklonaler, agonistischer α OX40-Antikörper

Antikörper, die andere durch CHO-Zellen exprimierte Antigene binden (Vgl. Abb. 3.34 A).

Die Immunisierung der neunten Maus und Fusion der Milz resultierte in der Generierung von 18 OX40-spezifischen Hybridomen (Vgl. Abb. 3.34 B).

Alle Hybridome, deren OX40-Spezifität so bestätigt werden konnte, wurden im Folgenden mindestens einmal subkloniert und diese, nun monoklonalen Hybridome weiter analysiert. Die Differenzierung der Isotypen der sekretierten Antikörper in $Ig\mu$ und $Ig\gamma$ erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung entsprechender Sekundärreagenzien. Der Subtyp von Antikörpern des $Ig\gamma$ -Isotyps wurde durch die Verwendung des IsoGoldTM Kits bestimmt. Eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit generierten OX40-Hybridome ist in der Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.2: Generierte α OX40-Hybridomen

| Generierte α OX40-Hybridome | | | |
|------------------------------------|----------|--------|---------------|
| Hybridomname | Klonname | Fusion | Isotyp |
| M-OX1 | 7-1E4 | 8 | $Ig\gamma 1$ |
| M-OX2 | 10-2A7 | 8 | $Ig\gamma 1$ |
| M-OX3 | 10-2G1 | 8 | $Ig\gamma 2a$ |
| M-OX4 | F9-#1 | 9 | $Ig\gamma 2a$ |
| M-OX5 | F9-#2 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX6 | F9-#3 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX7 | F9-#4 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX8 | F9-#5 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX9 | F9-#6 | 9 | $Ig\gamma 1$ |
| M-OX10 | F9-#7 | 9 | $Ig\gamma 2a$ |
| M-OX11 | F9-#8 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX12 | F9-#9 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX13 | F9-#11 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX14 | F9-#12 | 9 | $Ig\gamma 1$ |
| M-OX15 | F9-#13 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX16 | F9-#14 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX17 | F9-#15 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX18 | F9-#16 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX19 | F9-#17 | 9 | $Ig\mu$ |
| M-OX20 | F9-#21 | 9 | $Ig\gamma$ |
| M-OX21 | F9-#22 | 9 | $Ig\gamma$ |

Aus der Tabelle 3.2 geht hervor, dass von den insgesamt 21 generierten Hybridomen 15 Antikörper des $Ig\gamma$ -Isotyps sekretieren. Für eine weitere Charakterisierung wurden diese Antikörper mittels Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigt.

3.3.2 Bindung der α OX40-Antikörper des Ig γ -Isotyps

Das Bindungsverhalten wurde durchflusszytometrisch durch Titration der Antikörper auf Sp2/0-OX40-Zellen bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.35 dargestellt. Als Vergleich wurde der α OX40-Antikörper ACT35 mitgeführt.

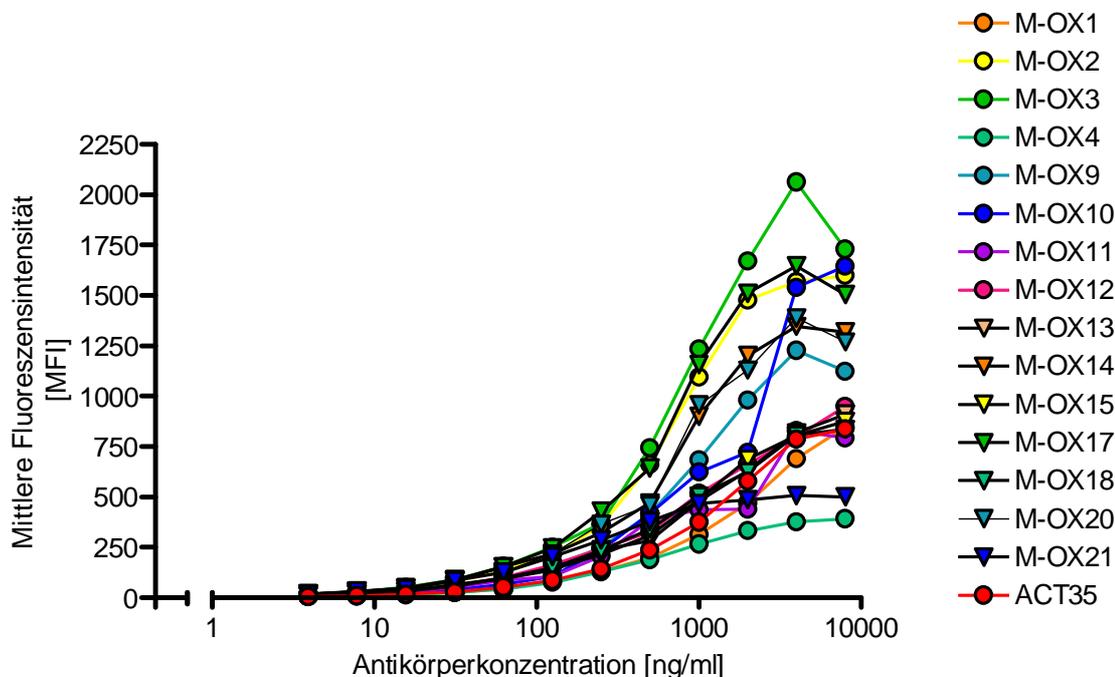


Abbildung 3.35: **Analyse der Bindung der M-OX-Antikörper an OX40.** Sp2/0-OX40-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der M-OX-Antikörper inkubiert. Gebundene Antikörper wurden daraufhin durch die Inkubation der Zellen mit RPE-markierten Ziege- α Maus ($Fc\gamma$ - und $Fc\mu$ -spezifischen) $F(ab)_2$ -Fragmenten markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität viabler Sp2/0-OX40-Zellen.

Dabei zeigen alle analysierten M-OX-Antikörper eine konzentrationsabhängige Bindung auf Sp2/0-OX40-Zellen. Gleichzeitig geht aus Abb. 3.35 jedoch hervor, dass sich die generierten Antikörper in Affinität und maximal-erreichter Fluoreszenz drastisch unterschieden. Die für eine halbmaximale Bindung benötigten Antikörperkonzentrationen rangieren dabei zwischen 180 ng/ml (M-OX21) und 1770 ng/ml (M-OX10). Im Vergleich dazu wird zum Erreichen der halbmaximalen Bindung des Kontrollantikörpers ACT35 eine Konzentration von 1128 ng/ml benötigt.

3.3.3 Expression von OX40 auf aktivierten T-Zellen

Im Vorfeld der funktionellen Untersuchung der M-OX-Antikörper wurde die OX40-Expression auf T-Zellen gesunder Spender durch panklonale Stimulation mittels Phytohämagglutinin (PHA), sowie immobilisiertem α CD3-Antikörper (χ UCHT-1) induziert und durchflusszytometrisch analysiert. Die CD3-vermittelte Stimulation erwies sich dabei als reproduzierbarer und schonender für die Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Abb. 3.36 zeigt die α CD3-induzierte Expression von OX40 auf den T-Zellen eines gesunden Spenders.

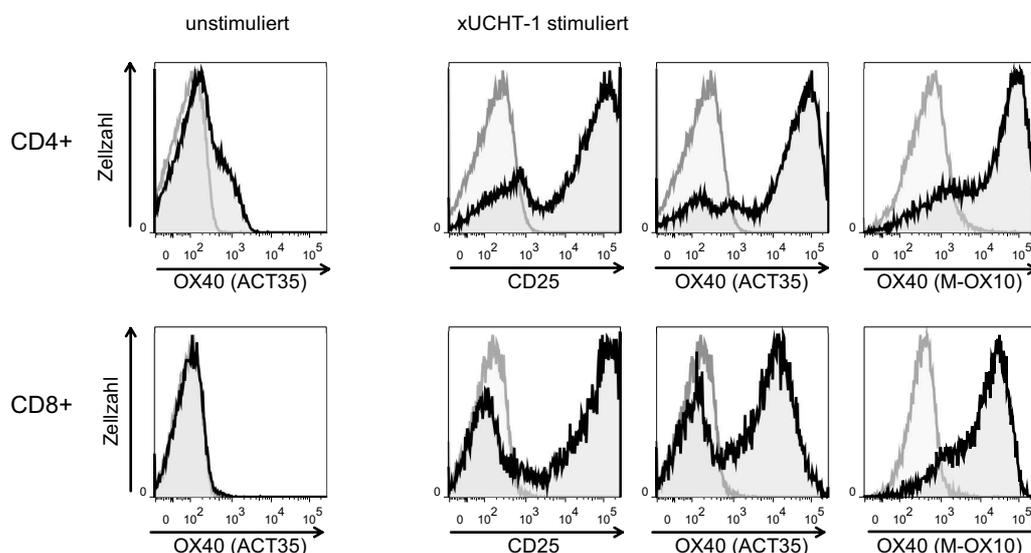


Abbildung 3.36: **OX40-Expression auf CD3-stimulierten T-Zellen:** Isolierte T-Zellen gesunder Spender (4×10^6 /ml) wurden für zwei Tage mit α CD3-Antikörper (χ UCHT-1, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, 16 Stunden bei 4°C immobilisiert) aktiviert und die OX40-, sowie CD25-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Bindung der α OX40-Antikörper ACT35 und M-OX10 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$, schwarze Histogramme) auf unstimulierten und stimulierten CD4^+ , sowie CD8^+ Zellen. Die Aktivierung der Zellen wurde durch einen α CD25-Antikörper nachgewiesen. Graue Histogramme zeigen die Signale der entsprechenden Isotypkontrollen.

Die verwendeten T-Zellen wurden durch Depletion mittels magnetischer Partikel aus PBMC isoliert und anschließend für 48 Stunden mit einer mitogenen Konzentration immobilisiertem α CD3-Antikörpers stimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen zeigt, im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle eine deutliche Expression von OX40 (nachgewiesen sowohl durch ACT35, als auch durch M-OX10 als Repräsentanten der neu generierten α OX40-Antikörper) auf der Oberfläche von CD4^+ als auch CD8^+ Zellen. Der Anteil aktivierter T-Zellen wurde durch den Nachweis von CD25 auf der Zelloberfläche bestimmt, und entsprach dem Anteil OX40-positiver Zellen.

3.3.4 Agonistische Effekte der generierten α OX40-Antikörper

Zur Identifikation agonistischer M-OX-Antikörper wurde die OX40-Expression von T-Zellen durch eine 48-stündige, mitogene CD3-Stimulierung induziert und die OX40-Expression gemäß Abb. 3.36 analysiert. Diese T-Zellen wurden im weiteren Versuchsverlauf mit den zu testenden Antikörpern, sowie submitogener Menge an immobilisiertem α CD3-Antikörper inkubiert. Als Vergleich dienten dabei ein agonistischer CD28-Antikörper (Klon 9.3), sowie rekombinanter OX40-Ligand (rOX40L). Die zu testenden Moleküle wurden sowohl in löslicher, als auch immobilisierter Form mitgeführt. Die Proliferation der T-Zellen wurde nach weiteren 5 Tagen Inkubation gemessen. Die Abb. 3.37 fasst die so generierten Ergebnisse von zwei bzw. vier unabhängigen Experimenten zusammen. Gezeigt sind Experimente, bei denen die kosimulatorischen Moleküle in löslicher Form (Abb. 3.37 A), als auch in immobilisierter Form (Abb. 3.37 B) bereitgestellt wurden. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Kostimulation durch CD28-Stimulierung bzw. durch löslichen rOX40L eine Proliferation der T-Zellen induziert. Ohne kostimulatorische Signale ist hingegen keine T-Zellstimulation nachweisbar.

Von den untersuchten M-OX-Antikörpern sind 4 Klone (M-OX9, M-OX10, M-OX14 und M-OX20) eindeutig in der Lage, die Proliferation der T-Zellen aller Spender zu induzieren. Dieser Effekt ist jedoch größtenteils abhängig von der Immobilisierung der Antikörper, was auch auf den α CD28-Antikörper 9.3 zutrifft. Aussagen über die Potenz der OX40-Agonisten M-OX9, M-OX10, M-OX14 und M-OX20, verglichen mit OX40L konnten allerdings aufgrund variabler Ergebnisse mit Zellen unterschiedlicher Spender nicht erfolgen.

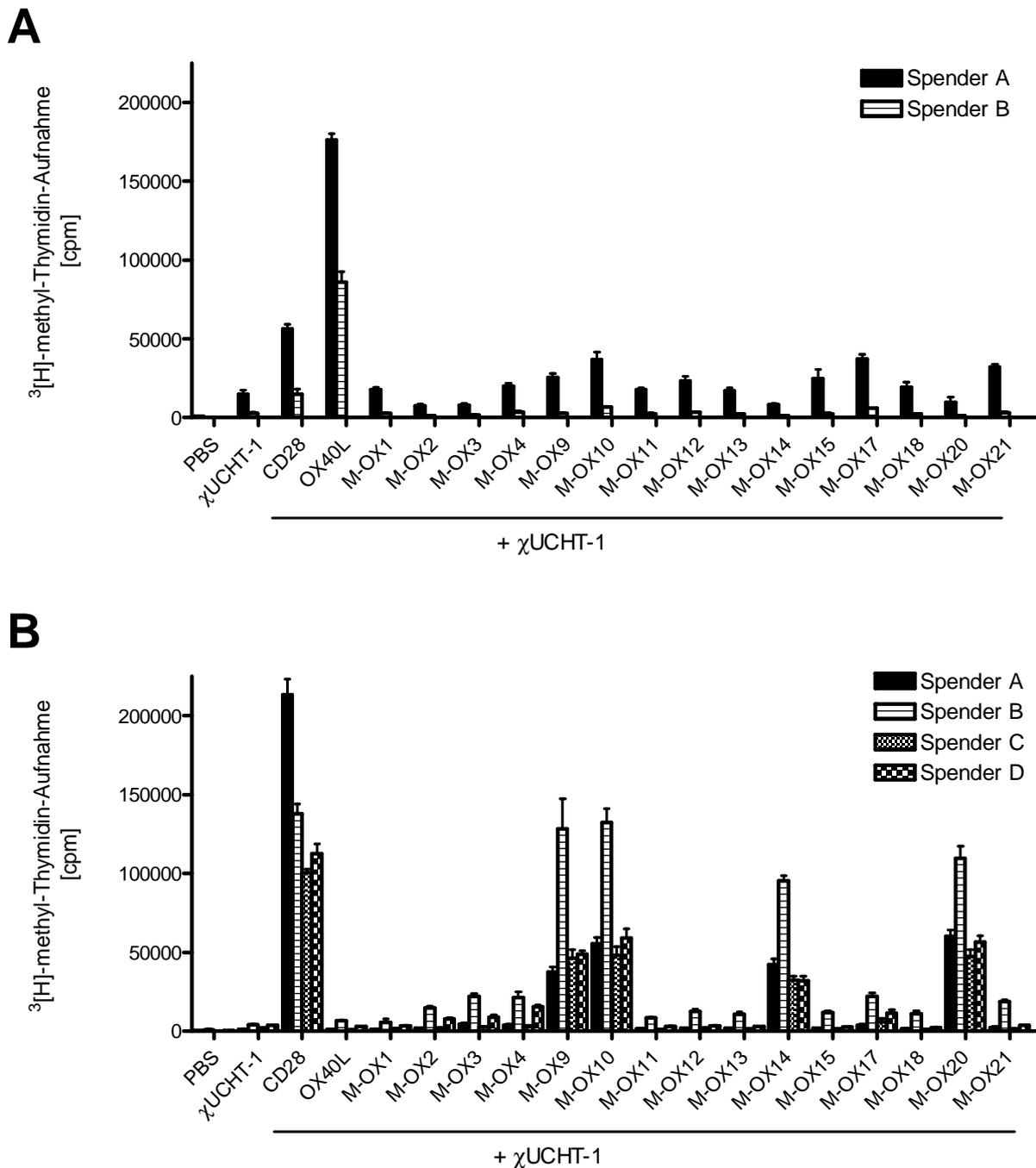


Abbildung 3.37: **Agonismus der generierten α OX40-Antikörper** Isolierte T-Zellen gesunder Spender (4×10^6 /ml) wurden für zwei Tage mit α CD3-Antikörper (χ UCHT-1, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, 16 Stunden bei 4°C immobilisiert) aktiviert. Danach wurden die Zellen auf 96well Platten mit submitogenen Dosen von α CD3 (χ UCHT-1, $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, 16 Stunden bei 4°C immobilisiert) überführt und für weitere 5 Tage inkubiert. Die Effizienz der Kostimulation durch α CD28-, oder α OX40-Antikörper (M-OX1 - M-OX21), bzw. rOX40L sowohl in löslicher (A), als auch in immobilisierter (B) Form wurde über die Menge des inkorporierten ^3H -methyl-Thymidins quantifiziert. Alle Antikörper wurden in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, rOX40L in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet.

Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von Triplikaten.

Kapitel 4

Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Generierung, Optimierung und Charakterisierung rekombinanter Antikörper zur Rekrutierung und Aktivierung immunologischer Effektorzellen.

Im ersten Teil der Arbeit wird die abschließende präklinische Charakterisierung eines optimierten, FLT3-spezifischen Antikörpers, welcher Fc γ -Rezeptor-tragende Effektorzellen rekrutiert und aktiviert, zur Therapie myeloischer Leukämien beschrieben.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die Optimierung der Rekrutierung und Aktivierung von CD16-positiven Effektorzellen des angeborenen Immunsystems durch die Generierung neuer bispezifischer Antikörper-Derivate.

Der dritte Teil beschreibt die Generierung monoklonaler Antikörper gerichtet gegen das von aktivierten T-Zellen exprimierte Antigen OX40. Die dabei identifizierten OX40-Agonisten können als Ausgangspunkt für neue, T-Zell-aktivierende Moleküle dienen.

4.1 Der SDIEM-optimierte α FLT3-Antikörper 4G8SDIEM

Die Therapie hämatologischer Tumorerkrankungen wurde durch monoklonale Antikörper maßgeblich beeinflusst. So revolutionierte die Zulassung des CD20-spezifischen Antikörpers Rituximab die Behandlung von CD20-positiven Lymphomen. Damit stellt dieser Antikörper den Prototypen der zweiten Generation therapeutischer Antikörper dar, welche chimärisierte bzw. humanisierte Moleküle umfasst. Die derzeit in präklinischen und ersten klinischen Studien getesteten Antikörper der dritten Generation zeichnen sich demgegenüber durch eine unterschiedliche Optimierung ihrer Effektorfunktionen aus. Zumeist sind diese Moleküle jedoch gegen Antigene lymphatischer Zellen gerichtet, wohingegen die Therapie myeloischer Leukämien bislang nicht von der Entwicklung solcher Antikörper profitieren konnte.

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 wird, neben hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen [Rosnet et al., 1996; Kikushige et al., 2008] auch von den blastären

Zellen der meisten AML-Patienten exprimiert. Gleichzeitig haben aktivierende Mutationen dieses Moleküls direkte Auswirkungen auf die Prognose des Krankheitsverlaufs, sowie auf die Therapie. Somit gilt FLT3 als potentiell Ziel für Antikörper-basierte Therapien der akuten myeloischen Leukämien. Als weitere AML-assoziierte Antigene, die Ziele für therapeutische Antikörper in präklinischer und klinischer Entwicklung darstellen, gelten CD33 [Gibson, 2002], CD123 [Jin et al., 2009] sowie CD318 [Buhring et al., 2004]. Ähnlich wie für FLT3 ist auch für alle diese Antigene eine Stammzell-Assoziation beschrieben. Im Vergleich mit diesen AML-assoziierten Antigenen weist FLT3 jedoch ein deutlich restringiertes Expressionsprofil auf.

So wird CD33 als pan-myeloisches Antigen sowohl von myeloischen Vorläuferzellen, als auch von reifen Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert.

Ähnliches, wenn auch weniger ausgeprägt, gilt für das Antigen CD123, welches zusätzlich zu der Expression von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auch auf Mastzellen, auf plasmazytoiden dendritischen Zellen und auf basophilen Granulozyten nachweisbar ist. Verglichen mit FLT3 zeigte der direkte durchflusszytometrische Vergleich im Rahmen dieser Arbeit eine deutlich stärkere Expression von CD123 (analysiert mittels des Antikörpers 7G3) auf Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks (Daten nicht gezeigt).

Das *CUB-domain containing protein 1* (CD318) kann zusätzlich zu hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auch auf vielen epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von CD318 durch AML-Blasten ist darüber hinaus beschränkt und konnte nur in einem Teil des Patientenkollektivs gezeigt werden [Hofmann, 2009].

Die restringierte Expression sowie die Assoziation von Mutationen des FLT3-Antigens mit der Prognose des Krankheitsverlaufs machen FLT3 damit zu einem vielversprechenden Zielantigen für neue Antikörper-basierte Therapieformen der AML.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die präklinische Charakterisierung zweier unterschiedlicher α FLT3-Antikörper mit optimiertem Fc-Teil als mögliche Kandidaten für eine Therapie akuter myeloischer Leukämien. Die Fc-Optimierung resultiert dabei aus der Mutation zweier die Fc/Fc γ R-Interaktion beeinflussenden Aminosäuren innerhalb der C_H2-Domäne. Im Gegensatz zur Glykooptimierung von Antikörpern sind diese Mutationen molekular definiert und ermöglichen eine einfache und homogene Expression in eukaryotischer Zellkultur.

Der durchflusszytometrische Vergleich des Bindungsverhaltens der Moleküle zeigte, dass die SDIEM-Mutationen erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Antigenbindung haben. Demgegenüber konnte in diesen Experimenten die leicht höheraffine Bindung der 4G8-Moleküle an FLT3, verglichen mit den BV10-Molekülen bestätigt werden (vgl. [Hofmann, 2009]).

Weiterhin konnten auch Unterschiede der Antikörper im Bezug auf ihre Interaktion mit dem FLT3-Liganden bestätigt werden. So blieb die Bindung von BV10SDIEM an FLT3 von FLT3L unbeeinflusst, wohingegen die Bindung von 4G8SDIEM durch

hohe Konzentrationen des Liganden teilweise inhibiert wurde. Begründen lässt sich dies theoretisch zum Einen durch Überlappung des von 4G8 gebundenen Epitops mit der Bindungsstelle des FLT3L. Zum Anderen könnte die Bindung von FLT3L an FLT3 eine Konformationsänderung des Proteins oder die Dimerisierung zweier Proteine induzieren und damit die Bindung des Antikörpers verhindern. Unter Berücksichtigung der durch Dr. Elwira Pyz generierten Daten bezüglich der Lage des von 4G8-gebundenen Epitops innerhalb des FLT3-Proteins erscheint die zweite Erklärung naheliegender. Durch die Generierung von Deletionsmutanten konnte hier das Epitop von 4G8 innerhalb der vierten Ig-Domäne von FLT3 lokalisiert werden [Hofmann et al., 2012], wohingegen die Liganden-Bindung durch die (Membran-ferne) zweite und dritte Domäne erfolgt. Gleichzeitig wurde das von BV10 erkannte Epitop innerhalb der zweiten Ig-Domäne identifiziert. Eine direkte Interaktion von FLT3L und 4G8 kann jedoch, begründet durch die Tertiärstruktur von FLT3, nicht ausgeschlossen werden.

Prinzipiell kann die Verdrängung eines therapeutischen Antikörpers durch einen löslichen Liganden dessen Effektivität vermindern. Die in diesen Experimenten eingesetzten Konzentrationen an löslichem FLT3L übersteigen die *in vivo* nachgewiesenen Serumkonzentrationen gesunder Menschen von max. 100 pg/ml jedoch deutlich [Wodnar-Filipowicz, 2003]. Lediglich im Verlauf einer durch Chemo- und Strahlentherapie induzierten Knochenmarksablation als Vorbereitung für eine Transplantation konnten stark erhöhte FLT3L-Konzentrationen von bis zu 2,5 ng/ml im Serum von Leukämiepatienten gemessen werden [Wodnar-Filipowicz et al., 1996]. Selbst diese Konzentrationen reichen *in vitro* jedoch nicht aus, um die Bindung von 4G8 an FLT3 zu blockieren und sollten somit keine Auswirkungen auf die therapeutische Effektivität des Antikörpers haben.

Die Lyse von FLT3⁺ leukämischen Blasten ist der primäre Wirkmechanismus der hier generierten Antikörper. Der direkte Vergleich zeigte dabei eine drastisch gesteigerte Effektivität der ADCC-Vermittlung durch die SDIEM-optimierten Versionen verglichen mit den chimären Molekülen. Gleichzeitig konnte wiederholt eine Überlegenheit von 4G8SDIEM gegenüber BV10SDIEM bezüglich der Antikörpervermittelten Lyse FLT3⁺ NALM-16-Zellen nachgewiesen werden. Inwieweit diese Überlegenheit auf die Membran-nahe Bindung von 4G8SDIEM oder die leicht höheraffine Bindung zurückzuführen ist, ist derzeit unklar.

Ausgehend von diesen bisher generierten Daten und Ergebnissen wurde der Fokus der weiteren Analysen auf den Antikörper 4G8SDIEM gelegt.

Die Evaluierung der ADCC-Aktivität von 4G8SDIEM gegenüber FLT3-positiven Zielzellen erfolgte in einer schrittweisen Annäherung an physiologische Bedingungen. Unter Verwendung der Zelllinie NALM-16 konnte hierbei gezeigt werden, dass der Prozess der Antikörpervermittelten Zielzellyse nicht nach 4 Stunden abgeschlossen ist.

Die Koexpression von FLT3 und CD19 durch diese Zellen erlaubte weiterhin den direkten Vergleich eines Fc-optimierten α CD19-Antikörpers mit 4G8SDIEM, wobei die Expression von CD19 auf diesen Zellen um das ca. fünf-fache höher war, als die

FLT3-Expression. Dementsprechend zeigte der α CD19-Antikörper nach 4 Stunden auch eine höhere Effektivität in der ADCC-Vermittlung. Nach einer Verlängerung der Inkubationszeit von 4 auf 20 Stunden konnten jedoch keine Unterschiede bezüglich der ADCC-Aktivität der Antikörper mehr festgestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass eine geringere Antigenexpression nicht zwangsläufig zu schlechterer ADCC-Vermittlung führen muss und zumindest *in vitro* durch längere Exposition der Zielzellen gegenüber Antikörper und Effektoren kompensiert werden kann.

Dies ist auch aus weiteren Experimenten zur Evaluierung der ADCC-Aktivität von 4G8SDIEM ersichtlich, wobei statt NALM-16-Zellen primäre AML-Blasten als Zielzellen verwendet wurden. Die effektive Antikörper-vermittelte Lyse dieser Zellen durch autologe PBMC konnte erst nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden nachgewiesen werden.

Der nächste Schritt in Richtung physiologischer Versuchsbedingung stellte die Verwendung autologer Ziel- und Effektorzellen dar, welche aus PBMC von AML-Patienten isoliert wurden. Allerdings konnte hier auch nach einer Inkubationszeit von acht Stunden nur in zwei von vier Experimenten die 4G8SDIEM-vermittelte Lyse blastärer Zellen nachgewiesen werden. Eine weitere Ausdehnung der Inkubationszeit war jedoch aufgrund der hohen Spontanlyse der Zielzellen nicht möglich. Außerdem beeinträchtigten weitere Faktoren dieses experimentelle System. So stellt die Separierung der Zellen in Ziel- und Effektorpopulationen eine Belastung für die Zellen dar. Gleichzeitig resultiert eine Kontamination der Effektorpopulation mit unmarkierten Zielzellen in nicht-nachweisbarer Zielzelllyse und einem deutlich ungünstigeren Effektor-Zielzell-Verhältnis.

Um diese Störfaktoren zu beseitigen wurde ein experimentelles System etabliert, welches die Analyse autologer Proben (auch *ex vivo*) hinsichtlich Antikörper-vermittelter Lyse und Aktivierung der Effektorzellen, erlaubt. Während in vier von fünf dieser Experimente die Aktivierung von NK-Zellen gezeigt werden konnte, wurde lediglich in einem Fall eine Verminderung blastärer Zellen nachgewiesen. Dies war jedoch nicht auf 4G8SDIEM-vermittelte Zelllyse zurückzuführen. Vielmehr scheint es sich in diesem speziellen Fall um eine 4G8SDIEM-induzierte Maturierung der malignen Zellen zu handeln.

Da diese *ex vivo* PBMC von AML-Patienten einen hohen Anteil maligner Zellen enthielten, wurde das experimentelle System modifiziert, um definierte Effektor:Zielzellen-Verhältnisse herstellen zu können. Erreicht wurde dies durch die Verwendung von frischen PBMC eines Spenders in Vollremission in Kombination mit zuvor kryokonservierten autologen Blasten. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der Begriff der Effektorzellen im Rahmen dieser Arbeit die Gesamtpopulation der PBMC bezeichnet. Tatsächlich exprimieren jedoch nur max. 20% dieser Zellen aktivierende $Fc\gamma$ -Rezeptoren und können dadurch als Effektoren Antikörper-vermittelter zellulärer Zytotoxizität dienen.

Im Zuge der Analyse dieser Kokulturen mit einem Blastenanteil von max. 5% konnte in drei der fünf Experimenten eine signifikante 4G8SDIEM-vermittelte Lyse der blastären Zellen nachgewiesen werden, wobei in einem Fall auch der Kontrollantikörper 9.2.27SDIE die Lyse maligner Zellen induzierte. Eine Bindung von 9.2.27SDIE an die Blasten des Patienten konnte jedoch durch vorangehende

FACS-Analysen ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 3.6, Teilabb. B). Dementsprechend konnte unter 9.2.27SDIE-Einfluss auch keine Aktivierung der NK-Zellen nachgewiesen werden. Ein weiteres der fünf Experimente resultierte in einer leichten Verminderung der Anzahl maligner Zellen sowohl unter 4G8SDIEM-, als auch unter 9.2.27SDIE-Inkubation. Der Anteil aktivierter NK-Zellen betrug dabei jeweils rund 40% der CD56⁺-Zellen, wobei die PBMC dieses Patienten nach Inkubation ohne Antikörper einen vergleichbar hohen Aktivierungsstatus aufwiesen.

Diese Experimente zeigten zusammengefasst, dass das Effektor/Zielzellverhältnis massiven Einfluss auf die ADCC-Aktivität von 4G8SDIEM hat. Die Gründe für die hohe Spendervariabilität konnten jedoch nicht abschließend geklärt werden. Als mögliche Erklärungen kommen in Betracht:

- i) zu geringe FLT3-Expression der untersuchten Blasten (max. 1500 Moleküle/Zelle)
- ii) hoher spontaner Zelltod der (kryokonservierten) Blasten
- iii) Expression von NK-Zell-inhibierenden Molekülen durch die Blasten
- iv) Spenderabhängige Schwankungen der CD16-positiven-Subpopulationen innerhalb der CD56-positiven-Zellen
- v) bereits *in vivo* aktivierte NK-Zellen einzelner Spender
- vi) Einfluss der Medikation (z.B. Immunsuppressiva nach KMT) der Patienten auf die Aktivität ihrer NK-Zellen

Die Relevanz dieser *in vitro* Ergebnisse im autologen System lässt sich jedoch auch aufgrund fehlender Vergleiche in der Literatur nicht eindeutig bewerten. Wird die Aktivität therapeutischer Antikörper zumeist unter Verwendung von Zelllinien oder primären Zellen in Kombination mit allogenen PBMC gesunder Spender bestimmt, so ist die Analyse der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität im autologen System *in vitro* bisher nur selten, bzw. im Fall der akuten myeloischen Leukämien gar nicht beschrieben.

Grundsätzlich identifizieren diese Experimente aber das Verhältnis zwischen Zielzellen und Effektoren als kritischen Parameter für eine effektive Antikörper-vermittelte Lyse der Zielzellen. Als Konsequenz ist für einen erfolgreichen klinischen Einsatz von 4G8SDIEM ein Krankheitsstadium mit einer geringen Anzahl maligner Zellen und möglichst vielen Effektoren Voraussetzung. Diese Anforderungen werden vom Stadium der Therapie-induzierten *minimal residual disease* einer AML-Erkrankung erfüllt.

Im Rahmen der oben diskutierten *ex vivo*-Experimente konnte bei einem Patienten die Veränderung des Immunphänotyps blastärer Zellen unter 4G8SDIEM-Einfluss beobachtet werden (vgl. Abb. 3.10). Die malignen Zellen dieses Patienten wurden als CD33⁺CD45^{dim}CD14⁻ definiert. Während der 24-stündigen Inkubation sowohl mit 9.2.27SDIE, als auch ohne Antikörper blieb dieser Immunphänotyp erhalten. Lediglich die Inkubation der Zellen mit 4G8SDIEM resultierte in einer veränderten Expression der Antigene CD45, CD33 und CD14, und in einer erhöhten Anzahl an CD33-positiven Zellen. Diese CD33-positiven Zellen zeigten dabei neben einer erhöhten Granularität (höheres SSC-Signal) eine leicht erhöhte CD33-Expression, sowie eine stark erhöhte Expression von CD45 und eine leicht

verstärkte Expression von CD14. Die durchflusszytometrischen Daten legten dabei den Schluss nahe, dass die ursprünglich CD33⁺CD45^{dim}CD14⁻-Zellen nun den Immunphänotyp von Monozyten aufwiesen.

Die Blasten dieses AML-Patienten wurden positiv auf eine ITD-Mutation innerhalb des *FLT3*-Gens diagnostiziert und stellten damit die einzigen Zellen mit einer bestätigten FLT3-Mutation im Rahmen dieser *ex vivo* Experimente dar.

Prinzipell kann durch FLT3, abhängig von weiteren Faktoren, die Proliferation von hämatologischen Vorläuferzellen induziert werden. Gleichzeitig wird durch diese Signale eine Differenzierung verhindert. Die Blockierung einer Differenzierung gilt als ein charakteristisches Merkmal maligner Zellen [Hanahan und Weinberg, 2000], insbesondere im Fall der akuten myeloischen Leukämien [Tenen, 2003]. Dabei wird mittlerweile vermutet, dass die ITD-Mutationen innerhalb des *FLT3*-Gens, bzw. die aberrante Signalweiterleitung durch den FLT3/ITD-Rezeptor maßgeblich an einer Blockierung der Differenzierung myeloischer Zellen beteiligt ist. Dementsprechend konnte erst kürzlich die hohe klinische Effektivität eines neuen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors (Quartizinib) auf die Differenzierung von AML-Blasten *in vivo* zurückgeführt werden [Sexauer et al., 2012]. Die malignen Zellen entwickelten sich dabei nach Quartizinib-Applikation in reife neutrophile Granulozyten, welche dann schlussendlich abstarben.

Analog zu diesem Wirkmechanismus wäre eine Wirkung von 4G8SDIEM auf FLT3/ITD denkbar. Auch wenn die Signaltransduktion über FLT3/ITD unabhängig von einer Bindung von FLT3L ist, ist jedoch die Dimerisierung zweier FLT3-Moleküle (FLT3 oder FLT3/ITD) weiterhin zwingend erforderlich [Zheng et al., 2002]. Der Zusammenhang von hohen Konzentrationen an FLT3L und der Blockierung der Bindung von 4G8SDIEM an FLT3 wurde bereits weiter oben diskutiert. Hypothetisch wäre *vice versa* demnach auch eine Inhibierung der Dimerisierung zweier FLT3-Moleküle durch die Bindung von 4G8SDIEM möglich. Somit würde 4G8SDIEM eine (FLT3L-unabhängige) *trans*-Phosphorylierung der FLT3/ITD-Moleküle und damit deren Signalweiterleitung verhindern.

Die Bestätigung dieser Hypothese erfordert allerdings die weitere Analyse von FLT3/ITD-positiven primären AML-Blasten unter 4G8SDIEM-Einfluss, sowie die Charakterisierung des Einflusses von 4G8SDIEM auf die Phosphorylierung verschiedener Moleküle der Signaltransduktionskaskade, wie z.B. *CCAAT/enhancer binding protein α* (C/EBP α) (vgl. [Sexauer et al., 2012]).

Die Expression von FLT3 konnte auf allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten AML-Blasten nachgewiesen werden. Dabei wurde die FLT3-Expression absolut quantifiziert, um intra-experimentelle Vergleiche zu ermöglichen. Anzumerken ist hierbei, dass die verfügbaren Referenzpartikel eine minimale Antikörperdichte von 1800 Molekülen pro Partikel aufwiesen, so dass niedrigere Antigen-Expressionen interpoliert wurden. Primäre AML-Blasten verschiedener Patienten wiesen dabei eine heterogene Expressionsdichte von 300 bis 5000 FLT3-Molekülen pro Zelle auf, welche jedoch nicht mit dem FAB-Typ der Blasten, oder dem Mutationsstatus des *FLT3*-Gens korrelierte.

Die bekannte Assoziation von FLT3 mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen machte genauere Studien dieser Zellen hinsichtlich Expressionsniveau

und 4G8SDIEM-vermittelter Lyse unumgänglich. Weiterhin musste eine, begründet durch den beschriebenen direkten Einfluss von FLT3-Ligand auf die Population der dendritischen Zellen [Maraskovsky et al., 1996; Arrighi et al., 1999], 4G8SDIEM-vermittelte Toxizität gegenüber diesen Zellen ausgeschlossen werden. Die durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen zeigte dabei jedoch nur eine marginale FLT3-Expression. Dementsprechend konnte auch keine 4G8SDIEM-vermittelte Lyse autologer dendritischer Zellen nachgewiesen werden. Zu begründen sind diese Ergebnisse mit der Tatsache, dass FLT3L nicht mit reifen dendritischen Zellen, sondern mit FLT3-exprimierenden Vorläuferzellen interagiert und so deren Differenzierung induziert. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Untersuchungen, durchgeführt von Kikushige *et al.*, die die FLT3-Expression im humanen System auf myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen nachwiesen [Kikushige et al., 2008].

Um weitere Aussagen über die Toxizität von 4G8SDIEM gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen treffen zu können, wurde ebenfalls die FLT3-Expression auf Zellen des Knochenmarks gesunder Spender quantifiziert.

Hierbei konnte FLT3 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen ($CD45^{dim}CD34^+$) nachgewiesen werden. Die Expressionsdichte war dabei auf CD38-negativen Zellen höher (max. 700 MpZ), als auf CD38-positiven Zellen (max. 600 MpZ). Prinzipiell bestätigen diese Ergebnisse die beschriebene FLT3-Expression auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen [Kikushige et al., 2008], wie auch auf monozytären Zellen (definiert als $CD45^{high}SSC^{int}$) [Rappold et al., 1997]. Allerdings wurden in vorangehenden Studien keine absoluten Quantifizierungen durchgeführt und erfahrungsgemäß ist ein Vergleich durchflusszytometrischer Daten, die auf unterschiedlichen Geräten generiert wurden, ohne die entsprechenden Normalisierungen oder Kalibrierungen schwer bis unmöglich.

Um trotz der niedrigen Expression von FLT3 auftretende 4G8SDIEM vermittelte Effekte gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nachweisen zu können, wurden zwei unterschiedliche experimentelle Systeme verwendet. Dabei konnte keine signifikante 4G8SDIEM-vermittelte Toxizität gegenüber hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Direkte Antikörper-vermittelte Zytotoxizität gegenüber dieser Zellen wurde nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation von Zellen des Knochenmarks mit 4G8SDIEM durchflusszytometrisch analysiert. Während unter Verwendung eines bispezifischen Moleküls die effektive Lyse hämatopoetischer Vorläuferzellen durch T-Zellen induziert wurde, hatte die Inkubation mit 4G8SDIEM keinen Einfluss auf CD34-positive Zellen. Auch konnte kein signifikanter Effekt der 4G8SDIEM-Inkubation auf die Koloniebildung von Zellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Auch deutete in diesen *colony forming unit*-Versuchen nichts auf ein agonistisches Potential von 4G8SDIEM hin. Während in den initialen Experimenten mit primären AML-Blasten keine weiteren Zytokine und Mediatoren vorhanden waren, konnte auch unter den Bedingungen der *CFU*-Experimente keine erhöhte Proliferation der FLT3-positiven Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesen werden.

Diese umfangreichen *in vitro* Studien zeigen, dass das Risiko einer 4G8SDIEM-vermittelten Toxizität gegenüber hämatopoetischen Stamm- und Vorläufer- wie

auch gegenüber dendritischen Zellen im Rahmen einer klinischen Applikation als gering eingeschätzt werden kann. Begründet ist dies primär durch die geringe Expression von FLT3 auf normalen Zellen im Vergleich zu einer zumeist erhöhten Expression auf Blasten der AML.

Ein weiterer, die klinische Applikation und Effektivität betreffender Parameter stellt der sog. *Antigen shift*, also die Modulation der Antigen-Expression bedingt durch die Bindung eines Antikörpers dar. Dieses Phänomen wurde im Zusammenhang mit der Wirksamkeit der CD20-spezifischen Antikörper Rituximab und Tositumomab beschrieben. Das Verschwinden des Antigens von der Zelloberfläche kann dabei zum Einen durch die proteolytische Abspaltung, zum Anderen durch Internalisierung des Antikörper/Antigen-Komplexes in das Zelllumen erfolgen. Letzteres ist die essentielle Voraussetzung für die klinische Wirksamkeit von Antikörper-Toxin-Konjugaten, wie z.B. Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg[®], produziert von Pfizer).

Im Zusammenhang mit ADCC-vermittelnden α CD20-Antikörpern bedingt das Verschwinden des Antigens von der Zelloberfläche, ungeachtet des zugrunde liegenden Mechanismus, eine verminderte therapeutische Wirkung [Beers et al., 2010]. Im Rahmen der präklinischen Charakterisierung wurde deshalb der 4G8SDIEM-induzierte *Antigen shift* sowohl auf der Zelllinie NALM-16, als auch auf primären AML-Blasten analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die Bindung von 4G8SDIEM an FLT3 einen Verlust des Antigens von der Zellmembran zur Folge hat. Dieser Verlust betrug dabei allerdings max. 40% der FLT3-Moleküle nach 24-stündiger Antikörper-Inkubation. Eine Verdopplung der Inkubationszeit erhöhte den Antigen-Verlust dabei nicht weiter, woraus geschlossen werden kann, dass diese Antigen-Modulation die therapeutische Effektivität von 4G8SDIEM nicht dramatisch beeinflussen wird.

Ein größeres Problem stellt in diesem Zusammenhang eine Vorbehandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib eines mit 4G8SDIEM zu behandelnden AML-Patienten dar. Sorafenib wurde ursprünglich zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zugelassen. Der Wirkstoff inhibiert dabei die Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen, wie c-KIT und PDGFR, was zur Apoptose maligner Zellen führt. Begründet durch die Inhibition von FLT3/ITD-vermittelten Signalen wird Sorafenib mittlerweile verstärkt zur Behandlung von Patienten mit rezidivierter FLT3/ITD-positiver AML eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass die Inkubation FLT3-exprimierender-Zellen mit Sorafenib neben der Apoptose der Zellen auch den fast vollständigen Verlust von membranständigem FLT3 induziert.

In wie weit dies auch für primäre AML Blasten gilt, und ob und nach welchem Zeitraum überlebende Zellen erneut FLT3 exprimieren, konnte jedoch noch nicht analysiert werden. Diese offenen Fragen sollten dringend in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4G8SDIEM als Therapeutikum zur Behandlung akuter myeloischer Leukämien

FLT3 ist nicht das einzige AML-assoziierte Zielantigen für therapeutische Antikörper in präklinischen Studien. Allerdings zeigten zwei gegen das pan-myeloische Antigen CD33 gerichtete Antikörper, das Antikörper-Toxin-Konjugat Gemtuzumab-Ozogamicin und der humanisierte Antikörper Lintuzumab, unbefriedigende Resultate in klinischen Studien. Ein humanisierter Fc-optimierter α CD123-Antikörper (CSL362) befindet sich derzeit in einer klinischen Phase-I-Studie [Clinicaltrials#: NCT01632852]. Die deutlich stärkere Expression von CD123 auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, sowie die Expression auf Mastzellen und basophilen Granulozyten könnten die Effektivität und Toxizität von CSL362 jedoch negativ beeinflussen.

4G8SDIEM ist nicht das einzige Molekül, das mit FLT3 oder der FLT3-Signalkaskade interagiert. Neben monoklonalen therapeutischen Antikörpern werden Rezeptortyrosinkinase-(RTK-) Inhibitoren entwickelt, die u.a. FLT3 als Ziel haben. Problematisch ist in diesem Fall die zumeist breite Wirkung auch auf andere RTK. Weiterhin konnte bislang eine Effektivität dieser Moleküle gegenüber FLT3 nur bei einer vorhandenen ITD-Mutation nachgewiesen werden, die nur bei ca. 30% der Patienten auftritt. Auch zeigen diese Moleküle ein hohes Maß an Nebenwirkungen und eine nur transiente anti-leukämische Wirkung.

4G8SDIEM ist nicht der einzige FLT3-spezifische therapeutische Antikörper. Der humane Antikörper IMC-EB10 (produziert durch ImClone LLC) konnte in Maus-Modellen das Anwachsen, sowie die Etablierung von Leukämien, durch Blockierung der FLT3L-Bindung, sowie durch die Vermittlung von ADCC verhindern. Dieser humane Ig γ 1-Antikörper besitzt allerdings keinen optimierten Fc-Teil. Eine klinische Phase-I-Studie mit IMC-EB10 wurde aus Mangel an Effektivität abgebrochen [NCT00887926].

4G8SDIEM stellt eine therapeutische Option zur Behandlung von AML-Patienten in einer *minimal residual disease* (MRD-) Situation dar. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten legen nahe, dass unter diesen Bedingungen, die sich durch eine hohe Anzahl an Effektoren gegenüber einer geringen Anzahl maligner Zellen definiert, die effiziente 4G8SDIEM-vermittelte Eliminierung persistierender Reste der AML-Blasten zu einem kurativen Effekt führen könnte.

4.2 Bispezifische Ig γ 1-Derivate mit Spezifitäten für Endoglin und CD16

Die dritte Generation therapeutischer Antikörper zeichnet sich durch eine gezielt-verbesserte Interaktion zwischen Antikörpermolekül und immunologischen Effektorzellen aus. Die Fc-Optimierung durch die SDIE-Modifikation ist eine von verschiedenen Strategien zur Steigerung der biologischen Aktivität therapeutischer Antikörper durch die Verbesserung der Fc:Fc γ -Rezeptor-Interaktionen. Zumeist resultieren diese Optimierungen jedoch auch in einer erhöhten Affinität des Fc-Teils zum inhibitorischen Fc γ -Rezeptor IIb. Im Gegensatz dazu ermöglichen bispezifische Antikörper die selektive Stimulierung aktivierender Fc γ -Rezeptoren. Der aktivierende Fc γ RIIIa (CD16) wird von NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert und gilt als verantwortlich für die Induktion Antikörper-vermittelter zelluläre Zytotoxizität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue bispezifische Antikörper-Derivate generiert, die, als Alternative zu der patentrechtlich-geschützten SDIE-Optimierung monoklonaler Antikörper, eine vergleichbare oder höhere Potenz hinsichtlich der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität mit einer hohen Produktivität in eukaryotischen Zellen, einer einfachen Reinigung, sowie einer geringen Tendenz zur Aggregation vereinen sollten.

In Verbindung mit CD16 als Effektorantigen diente hierbei Endoglin aus folgenden Gründen als Modellantigen.

Im Gegensatz zu hämatologischen Krebserkrankungen gestaltet sich die Antikörper-basierte Immuntherapie solider Tumoren schwieriger. Während maligne Zellen des hämatopoetischen Systems zumeist in direkter räumlicher Nähe zu immunologischen Effektorzellen zu finden sind, besteht bei soliden Tumoren die Notwendigkeit der Rekrutierung von Effektoren an die Tumorlokalität. Voraussetzung dafür ist die Penetration des Tumor-umgebenden Gewebes durch den Antikörper. Weiterhin tendieren Tumoren im Zuge evolutionärer Prozesse und *immune escape*-Mechanismen zur Etablierung von Varianten, welche das Zielantigen des Antikörpers vermindert oder nicht mehr exprimieren.

Eine Alternative zum direkten, Antikörper-vermittelten Angriff auf maligne Zellen stellt die gezielte Zerstörung Tumor-versorgender Blutgefäße dar, was schlussendlich auch das Absterben der malignen Zellen zur Folge hätte und die Infiltration des Tumors durch Effektorzellen ermöglicht. Als potentiell Zielantigen, dessen Überexpression auf aktivierten Endothelzellen Tumor-versorgender Gefäße ausgiebig beschrieben wurde, gilt Endoglin (ENG).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, ausgehend von den durch Dipl.-Biol. K. Schwartz generierten, ENG-spezifischen Antikörpern K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM, neue bispezifische Antikörper-Derivate generiert.

Basierend auf einem durch Dr. L. Grosse-Hovest und Dr. M. Durben entwickelten, neuen Antikörper-Format wurden somit bispezifische Moleküle mit N-terminalen Spezifitäten der K-ro-Antikörper und C-terminalen Bindungsstellen für CD16 in Form des 3G8-scF_V hergestellt.

Die so generierten Moleküle stellen entweder „halbierte“ Antikörper mit einer

einzelnen Bindungsstelle pro Spezifität (NK8-C16-N297Q, NK23-C16-N297Q), oder Ig γ -Derivate mit zwei Bindungsstellen pro Spezifität (NK8-C16-FcKO, NK23-C16-FcKO) dar. Gemeinsam weisen beide Formate Mutationen in der C_H2-Domäne auf, welche die Interaktion zwischen Fc-Teil und Fc γ -Rezeptoren minimieren [Durben, 2012].

Diese Moleküle wurden nach Transfektion von Sp2/0-Ag14-Zellen exprimiert und mittels Affinitätschromatographie an KappaSelect-Material aufgereinigt.

Die Reinheit und Integrität sowie endogene Tendenzen zur Aggregation der Moleküle wurden durch analytische Gelfiltration analysiert. Die Analyse der Moleküle der K-ro23-Familie zeigte dabei durchweg schlanke Einzelpeaks mit minimalen Kontaminationen durch Dimere (NK23-C16-N297Q). Im Gegensatz dazu erschwerte das aberrante Laufverhalten der Moleküle der K-ro8-Familie, welches wahrscheinlich auf eine besondere Struktur oder kompaktere Faltung der variablen Domänen des Maus-K-ro8-Antikörpers zurückzuführen ist, da es sich in den chimären Antikörpern χ K-ro8 und K-ro8SDIEM fortsetzt (K. Schwartz, unveröffentlichte Daten), die Interpretation der Ergebnisse. Eine eindeutige Zuordnung der Peaks, resultierend aus der analytischen Gelfiltration der Moleküle NK8-C16-N297Q und NK8-C16-FcKO, bezüglich Aggregaten, freien leichten bzw. schweren Ketten oder aber Konformationsvarianten war demnach nicht möglich. Die gelelektrophoretische Analyse dieser Moleküle unter reduzierenden Bedingungen zeigte jedoch typische Banden, welche den schweren und leichten Ketten der Moleküle eindeutig zugeordnet werden konnten.

Ausgehend von der Hypothese, dass die Aggregation der generierten Molekülen zumindest teilweise durch die C-terminalen *single chain*-F_V-Domänen induziert wird, wurde, basierend auf den Arbeiten von Reiter, Brinkmann und Pastan [Brinkmann et al., 1993; Reiter et al., 1994a; Reiter et al., 1994b] durch Mutation zweier Aminosäuren in den *framework regions* der V_H und V_L des 3G8-scF_V die Möglichkeit zur Bildung einer Disulfidbrücke zwischen diesen Domänen geschaffen. Besonders die bispezifischen Moleküle der K-ro8-Familie profitierten von dieser Stabilisierung des scF_V, was aus distinkten Einzelpeaks im Rahmen analytischer Gelfiltrationen ersichtlich wurde.

Weiterhin konnte auch die Homogenität der Moleküle NK23-dsC16-N297Q und NK23-dsC16-FcKO durch die stabilisierende Modifikation nochmals erhöht werden.

Die Analyse der Bindung der bispezifischen Moleküle erfolgte durchflusszytometrisch auf humanen Endoglin-positiven Zelllinien, bzw. auf einer eigens generierten, CD16-exprimierenden Maus-Zelllinie. Wie erwartet zeigten alle Moleküle eine Konzentrations-abhängige Bindung an Endoglin und CD16. Die Affinitäten der N-terminalen Spezifitäten der tetravalenten Moleküle NK8-dsC16-FcKO sowie NK23-C16-FcKO bzw. NK23-dsC16-FcKO entsprachen dabei den entsprechenden Fc-optimierten Antikörpern. Die verminderte Affinität von NK8-C16-FcKO gegenüber dem Antigen Endoglin ist wahrscheinlich durch die Bildung höhermo-

lekularer Aggregate begründet, die durch analytische Gelfiltration nachweisbar waren.

Im Gegensatz zu den tetravalenten Molekülen zeigten die „halben“ Moleküle deutlich schwächere Affinitäten gegenüber Endoglin. Auch unter Berücksichtigung des halbierten Molekulargewichts dieser Moleküle von ca. 98 kDa ist ihre Affinität im Vergleich zu den entsprechenden tetravalenten Molekülen um das vier-fache (NK8-dsC16-N297Q / NK8-dsC16-FcKO) oder sogar um das zehn-fache (NK23-dsC16-N297Q / NK23-dsC16-FcKO) vermindert. Prinzipiell ist der Verlust an Affinität durch Reduzierung der Bindungswerten innerhalb der K-ro8-Familie damit schwächer als innerhalb der K-ro23-Familie. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Moleküle der K-ro8- und der K-ro23-Familie bezüglich der simultanen Bindungswerten gegenüber dem gemeinsamen Antigen Endoglin unterscheiden.

Aussagen über die Affinitäten der einzelnen Moleküle gegenüber CD16 konnten, begründet durch die nicht-sättigende Bindung der untersuchten Moleküle, nur schwer getroffen werden. Allerdings zeigten die vorliegenden Daten einen massiven Verlust der Affinität der 3G8scF_V-Domänen gegenüber dem parentalen Maus-Antikörper m3G8 für alle rekombinanten Varianten. Dieser Effekt konnte auch in anderen Studien mit rekombinanten 3G8-F_Vs beobachtet werden [Moore et al., 2011], ist jedoch abhängig vom parentalen Antikörper. So zeigte beispielsweise ein scF_V-Fragment des α CD3-Antikörpers UCHT-1 nur einen marginalen Verlust der Bindungswerten [Dr. M. Durben, unveröffentlichte Daten].

In der vorliegenden Arbeit zeigten weiterhin die tetravalenten Moleküle (mit Ausnahme von NK8-C16-FcKO) erwartungsgemäß eine stärkere Bindung an CD16 als die „halbierten“ Moleküle. Gleichzeitig zeigten diese Experimente, dass die SDIEM-Optimierung der Fc-Teile der Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM den entsprechenden tetravalenten Molekülen NK8-dsC16-FcKO und NK23-C16-FcKO bzw. NK23-dsC16-FcKO und deren zwei C-terminalen scF_V-Domänen bezüglich der Affinität zu CD16 unterlegen waren.

Der Einfluss der Disulfid-Stabilisierung der scF_V-Domänen konnte zudem in weiteren Experimenten zur Bindungsanalyse auch funktionell bestätigt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die kurzzeitige Lagerung der tetravalenten Moleküle NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO bei erhöhten Temperaturen die Bindungsaktivität des Moleküls NK23-C16-FcKO an CD16 deutlich verminderte, wohingegen die Bindung von NK23-dsC16-FcKO an CD16 völlig unbeeinflusst blieb. Versuche mit den Molekülen NK8-C16-FcKO und NK8-dsC16-FcKO konnten diesen Effekt allerdings nicht bestätigen. Dies kann jedoch durch die schon vorhandenen kontaminierenden Aggregate in der NK8-C16-FcKO-Präparation erklärt werden. So war die Bindung von NK8-C16-FcKO an CD16 *per se* schon schwächer, verglichen mit dem Molekül NK8-dsC16-FcKO.

Interessanterweise konnte dieser Einfluss der scF_V-Stabilisierung nur im Zusammenhang mit den tetravalenten Molekülen der K-ro23-Familie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die „halbierten“ Moleküle NK23-C16-N297Q und NK23-dsC16-N297Q keine Unterschiede in ihren Affinitäten gegenüber CD16 nach der Inkubation bei 37°C. Dies legt die Vermutung der Bildung „intra-molekularer

Dimere“ zwischen zwei 3G8-scF_V-Domänen innerhalb des selben Moleküls nahe. Die artifizielle Disulfidbrücke würde in diesem Fall die Entfaltung und darauffolgende Zusammenlagerung von V_H und V_L innerhalb zweier *single chain*-Domänen verhindern. Unterstützt wird diese Hypothese durch die analytische Gelfiltration der Moleküle nach Inkubation bei 37°C, die keine Hinweise auf verstärkte Bildung von Dimeren oder höhermolekularen Aggregaten lieferte (Daten nicht gezeigt).

Ziel der Generierung dieser bispezifischen Moleküle mit ENGxCD16-Spezifitäten war der direkte Vergleich mit den entsprechenden SDIEM-optimierten Antikörpern bezüglich ihrer Effektivität in der Vermittlung der Lyse von Endoglin-positiven Zielzellen.

Im Experimenten mit der K-ro23-Familie konnte dabei die deutlich erhöhte Potenz der Moleküle NK23-C16-FcKO und NK23-dsC16-FcKO gegenüber den „halbierten“ Molekülen, als auch gegenüber dem Fc-optimierten Antikörper K-ro23SDIEM gezeigt werden. Die tetravalenten Moleküle wiesen dabei, bezogen auf die benötigte Konzentration zur Induktion vergleichbarer Lyseraten, eine gegenüber K-ro23SDIEM um das 10- bis 100-fache gesteigerte Effizienz auf, wobei die durch diese Moleküle maximal-induzierten Lyseraten vergleichbar waren.

Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen der ⁵¹Cr-Freisetzungsversuche mit den Molekülen der K-ro8-Familie keine Überlegenheit der bispezifischen Moleküle gegenüber dem Fc-optimierten Antikörper K-roSDIEM gezeigt werden. Hierbei zeigten alle Moleküle eine annähernd vergleichbare Aktivität. Lediglich das tetravalente Molekül NK8-dsC16-FcKO zeigte in einigen Experimenten eine, verglichen mit den übrigen Molekülen, höhere Aktivität in niedrigen Konzentrationen, wohingegen die durch dieses Molekül maximal-induzierte Zielzellyse, verglichen mit den Molekülen NK8-dsC16-N297Q und K-ro8SDIEM, zumeist geringer ausfiel.

Weitere Experimente, eventuell auch in einer anderen experimentellen Versuchsanordnung, wie z.B. dem xCelligence System, sind jedoch nötig, um die biologische Aktivität der neuen bispezifischen Moleküle der NK8-Familie genauer zu evaluieren. Gleichzeitig muss in weiteren Experimenten der Einfluss von Serum bzw. von physiologischen Konzentrationen an humanen Ig γ -Molekülen auf die Potenz der einzelnen Moleküle analysiert werden.

Diese Versuche müssen dann zeigen, ob mit den bispezifischen Ig γ -basierten Molekülen der NK8-Familie Alternativen zu der patentrechtlich-geschützten Fc-Optimierung des Antikörpers K-ro8SDIEM generiert werden konnten.

Optimierung von Antikörpern durch Generierung bispezifischer Derivate

Generell zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die generierten bispezifischen Antikörperderivate, neben einer einfachen Aufreinigung, vergleichbare oder gar höhere Potenz hinsichtlich der Induktion Antikörper-vermittelter Zielzellyse aufwiesen, und somit potentielle Alternativen zu Fc-optimierten Antikörpern darstellen.

Schon im Zuge der Generierung und Charakterisierung der Antikörper K-ro8SDIEM

und K-ro23SDIEM konnte durch Dipl.-Biol. Karolin Schwartz in Kreuzblockierungsexperimenten gezeigt werden, dass die beiden Antikörper an teilweise überlappende Epitope innerhalb des Endoglin-Proteins binden (unveröffentlichte Daten). Somit konnte unter Verwendung der α ENG-Antikörper K-ro8SDIEM und K-ro23SDIEM als Ausgangspunkt für die Generierung der bispezifischen Konstrukte gezeigt werden, dass das erkannte Epitop entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität bispezifischer bzw. Fc-optimierter Antikörper hat. Ähnliche Beobachtungen wurden schon im Zusammenhang mit dem CD20-Antigen und dagegen gerichteten therapeutischen Antikörpern gemacht [Beers et al., 2008; Klein et al., 2013]. Diese Erkenntnisse legen nahe, weitere potentiell-therapeutische Antikörpermoleküle mit einem Zielzellyse-vermittelnden Wirkmechanismus in allen diesen nun vorliegenden Formaten zu testen, um die maximal-mögliche biologische Aktivität dieser Moleküle zu erreichen.

4.3 Die Generierung von agonistischen α OX40-Antikörpern

Das Ziel einer effektiven Immuntherapie von Tumorerkrankungen liegt in der Induktion einer Immunantwort gegenüber malignen Zellen, bzw. in der Brechung der Suppression immunologischer Zellen durch den Tumor. In diesem Zusammenhang stellt der kostimulatorische Rezeptor aktivierter T-Zellen OX40 ein interessantes Antigen für agonistische Antikörper dar. *In vitro* Experimente im Mausmodell zeigten, dass die Stimulation von OX40 in zwei synergistischen Effekten resultiert. OX40-Agonisten induzierten dabei die Proliferation und das Überleben von Effektor-T-Zellen, wohingegen sie gleichzeitig die durch regulatorische T-Zellen vermittelte Suppression verhinderten.

Die Relevanz OX40-vermittelter Signale sowie von OX40-Agonisten konnte im humanen System jedoch bisher nicht eindeutig definiert werden. Zur Charakterisierung und möglichen Optimierung immuntherapeutischer Strategien durch eine gezielte Aktivierung von OX40 auf T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper mit agonistischen Eigenschaften hergestellt und initial untersucht.

Dazu wurden die Sp2/0-Ag14- und CHO-Zellen mit einem für das humane OX40-Protein kodierendem Expressionsvektor transfiziert. Die so generierten Zelllinien zeigten eine vergleichbare Expression von humanem OX40 auf der Zelloberfläche, welche durch Bindung des α OX40-Antikörpers ACT35 nachgewiesen wurde.

Während durch die Immunisierung von sieben BALB/c-Mäusen mit den syngenen Sp2/0-Ag14-OX40-Zellen keine OX40-spezifischen Hybridome generiert werden konnten, resultierte die Immunisierung zweier C57BL/6-Mäuse mit CHO-OX40-Zellen in der Etablierung von 21 Hybridomzelllinien welche OX40-spezifische Antikörper sekretieren. Inwieweit diese Tatsache auf die Verwendung xenogener Zellen als Immunogen oder verschiedener Mausstämme zurückzuführen ist, kann aus den vorliegenden Daten jedoch nicht erörtert werden.

Die weitere Charakterisierung der α OX40-spezifischen Antikörper beschränkte sich auf Antikörper des Ig γ -Isotyps, welche an Protein-A aufgereinigt wurden. Die Analyse der Konzentrations-abhängigen Bindung an OX40 dieser Moleküle zeigte dabei ein heterogenes Bild. So zeigten die Antikörper Unterschiede bezüglich ihrer Affinität gegenüber OX40, bestimmt über die benötigte Konzentration zum Erreichen einer halbmaximalen Sättigung des Antigens. Weiterhin konnten beträchtliche Unterschiede in den maximal-erreichten Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Zurückzuführen ist dies auch auf die verschiedenen Subtypen der M-OX-Antikörper und daraus resultierenden unterschiedlichen Interaktionen mit dem Sekundärreagenz. Allerdings zeigten auch Antikörper des gleichen Subtyps divergierende Sättigungssignale, was auf die Bindung unterschiedlicher Epitope innerhalb des OX40-Antigens hinweist.

Die Untersuchung der generierten M-OX-Antikörper des Ig γ -Isotyps hinsichtlich agonistischen Eigenschaften erfolgte unter Verwendung von T-Zellen gesunder Spender. Diese wurden durch negative Selektion mittels magnetischer Partikel isoliert, um Spender-abhängige Störfaktoren, wie beispielsweise Unterschiede in der endogenen Expression von OX40L auf den PBMC auszuschließen. Die Induktion der OX40-Expression dieser isolierten T-Zellen erfolgte durch 48-stündige Stimulation mit einer mitogenen Konzentration des immobilisierten α CD3-Antikörpers χ UCHT-1. So stimulierte T-Zellen wiesen eine deutlichen Expression von OX40 auf, wobei der Nachweis OX40-negativer Zellen, unter Berücksichtigung der CD25-Expression, auf nicht-, bzw. unzureichend-aktivierte T-Zellen zurückzuführen ist.

Der Einfluss löslicher, bzw. immobilisierter M-OX-Antikörper auf die Proliferation solcher prästimulierter T-Zellen wurde unter Verwendung von Zellen von gesunden Spendern bestimmt. Die Ergebnisse zeigten dabei eindeutig die agonistische Aktivität der neuen Antikörper M-OX9, M-OX10, M-OX14 und M-OX20. Die Potenz dieser agonistischen Effekte variierte dabei zwischen den einzelnen Spendern, erschien in drei der vier Experimente jedoch deutlich ineffizienter als die durch CD28 vermittelte Kostimulation der T-Zellen. Gemeinsam weisen die α OX40-Antikörper und der α CD28-Antikörper eine Abhängigkeit effizienter Kostimulation von einer Immobilisierung auf. So resultierten zwei Experimente mit löslichen Antikörpern in keiner signifikanten Proliferationsinduktion. Im Gegensatz dazu wirkte der rekombinante OX40-Ligand nur in löslicher Form aktivierend, was darauf schließen lässt, dass die Immobilisierung eine für die OX40-Aktivierung nötige Trimerisierung dieses Proteins unterbindet.

Die weitere Charakterisierung dieser neuen OX40-Agonisten, sowie vergleichende Analysen bezüglich Qualität und Effizienz dieser Moleküle mit anderen kostimulatorischen Signalen steht bisher jedoch noch aus.

4.4 Ausblick

Chimärisierte und humanisierte Antikörper konnten die Therapie und Prognose einzelner maligner Erkrankungen bereits maßgeblich verbessern. Für weitere Fortschritte ist, neben der Identifizierung und Charakterisierung neuer Zielantigene, eine optimierte Rekrutierung immunologischer Effektorzellen durch therapeutische Antikörpermoleküle essenziell.

Die hier beschriebene, präklinische Charakterisierung des Fc-optimierten Antikörpers 4G8SDIEM, der gegen die Rezeptortyrosinkinase FLT3 gerichtet ist, bildet die Basis für die klinische Applikation dieses Moleküls. Die GMP-konforme Produktion von 4G8SDIEM für klinische Studien erfolgt durch die SYNIMMUNE GmbH. In diesen Studien soll, neben der Verträglichkeit des Moleküls, die Wirksamkeit als Therapeutikum zur Eliminierung einer minimalen Resterkrankung bei AML-Patienten getestet und belegt werden.

Eine Alternative zur bereits etablierten SDIE-Optimierung therapeutischer Antikörper wurde hier in Form eines bispezifischen Antikörperderivats zur Rekrutierung und Aktivierung von CD16-exprimierenden Effektorzellen generiert. Dieses Format kann dabei, abhängig vom erkannten Epitop des Zielzellantigens, eine dem entsprechenden SDIE-modifizierten Antikörper überlegene biologische Aktivität aufweisen. Prinzipiell kann und sollte somit jeder neue therapeutische Antikörper, dessen Wirkmechanismus die Lyse der Zielzelle ist, in diesem Format getestet werden. Dies ermöglicht die Identifizierung des potentesten Formats des entsprechenden Antikörpers.

Zusätzlich zu diesen Molekülen, die auf die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems abzielen, wurden mit den OX40-Agonisten M-OX9, M-OX10, M-OX14 und M-OX20 neue T-Zell-aktivierende Antikörper generiert. Diese können, nach weiterer Charakterisierung, als Adjuvans im Rahmen von immuntherapeutischen Behandlungen (wie z.B. Vakzinierungen) eingesetzt werden. Weiterhin können diese Antikörper als Basis für die Generierung bispezifischer Moleküle dienen, die möglicherweise eine Zielzell-abhängige Stimulierung und Aktivierung von T-Zellen erlauben.

Kapitel 5

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich an erster Stelle herzlichst bei meinen Betreuern Prof. Dr. Gundram Jung und Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Dissertation sowie für die stets konstruktiven Diskussionen bedanken.

Auch möchte ich mich bei Dr. Ludger Große-Hovest für die Unterstützung im Bereich der molekularbiologischen Arbeiten herzlich bedanken.

Für die Einführung in eine buntere Welt der Durchflusszytometrie bedanke ich mich bei Dipl.-Biochem. Heiko Schuster und Dipl.-Biol. Karoline Laske.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Jung für die freundliche und unterstützende Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere danke ich dabei Dr. Elwira Pyz für die Klonierung der BV10-Moleküle und die Charakterisierung der gebundenen FLT3-Epitope, sowie Dipl.-Biol. Karolin Schwartz für die Bereitstellung der K-ro-Antikörper und mehr. Ebenfalls bedanke ich mich bei Beate Pömmel für die Hilfe bei tierexperimentellen Arbeiten.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Helmut Salih und Dr. Tina Nübling für die Bereitstellung von Patientenproben sowie Dr. Hans-Jörg Bühring und Sabrina Grimm für die Bereitstellung der FLT3-spezifischen Hybridome und die Durchführung der CFU-Experimente.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

- Agnes, F., Shamoon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D., and Galibert, F. (1994). Genomic structure of the downstream part of the human *flt3* gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (rtk) of subclass iii. *Gene*, 145(2):283–288.
- al Shamkhani, A., Birkeland, M. L., Puklavec, M., Brown, M. H., James, W., and Barclay, A. N. (1996). Ox40 is differentially expressed on activated rat and mouse t cells and is the sole receptor for the ox40 ligand. *Eur. J. Immunol.*, 26(8):1695–1699.
- Arrighi, J. F., Hauser, C., Chapuis, B., Zubler, R. H., and Kindler, V. (1999). Long-term culture of human cd34(+) progenitors with *flt3*-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a cd34(-)cd14(-) and a cd34(-)cd14(+) dendritic cell precursor. *Blood*, 93(7):2244–2252.
- Atkins, M. B., Lotze, M. T., Dutcher, J. P., Fisher, R. I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., Paradise, C., Kunkel, L., and Rosenberg, S. A. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.*, 17(7):2105–2116.
- Bacher, U., Haferlach, C., Kern, W., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2008). Prognostic relevance of *flt3*-tkd mutations in aml: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood*, 111(5):2527–2537.
- BALDWIN, R. W. (1955a). Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. *Br. J. Cancer*, 9(4):652–657.
- BALDWIN, R. W. (1955b). Immunity to transplanted tumour: the effect of tumour extracts on the growth of homologous tumours in rats. *Br. J. Cancer*, 9(4):646–651.
- Ball, E. D., Guyre, P. M., Mills, L., Fisher, J., Dinces, N. B., and Fanger, M. W. (1992). Initial trial of bispecific antibody-mediated immunotherapy of cd15-bearing tumors: cytotoxicity of human tumor cells using a bispecific antibody

- comprised of anti-cd15 (moab pm81) and anti-cd64/fc gamma ri (moab 32). *J. Hematother.*, 1(1):85–94.
- Beers, S. A., Chan, C. H., James, S., French, R. R., Attfield, K. E., Brennan, C. M., Ahuja, A., Shlomchik, M. J., Cragg, M. S., and Glennie, M. J. (2008). Type ii (tositumomab) anti-cd20 monoclonal antibody out performs type i (rituximab-like) reagents in b-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*, 112(10):4170–4177.
- Beers, S. A., French, R. R., Chan, H. T., Lim, S. H., Jarrett, T. C., Vidal, R. M., Wijayaweera, S. S., Dixon, S. V., Kim, H., Cox, K. L., Kerr, J. P., Johnston, D. A., Johnson, P. W., Verbeek, J. S., Glennie, M. J., and Cragg, M. S. (2010). Antigenic modulation limits the efficacy of anti-cd20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*, 115(25):5191–5201.
- Behring and Kitasato (1965). On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 90(49):2183.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. french-american-british (fab) co-operative group. *Br. J. Haematol.*, 33(4):451–458.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877):423–426.
- Birg, F., Courcoul, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tabilio, A., Mannoni, P., and Birnbaum, D. (1992). Expression of the fms/kit-like gene *flt3* in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*, 80(10):2584–2593.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid dna. *Methods Enzymol.*, 100:243–255.
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15(1):1–14.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., Korman, A. J., Parker, S. M., Agrawal, S., Goldberg, S. M., Pardoll, D. M., Gupta, A., and Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-pd-11 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.*, 366(26):2455–2465.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B., and Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(16):7538–7542.

- Buhring, H. J., Kuci, S., Conze, T., Rathke, G., Bartolovic, K., Grunebach, F., Scherl-Mostageer, M., Brummendorf, T. H., Schweifer, N., and Lammers, R. (2004). Cdc1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem Cells*, 22(3):334–343.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 13:1–27.
- Burrows, F. J., Derbyshire, E. J., Tazzari, P. L., Amlot, P., Gazdar, A. F., King, S. W., Letarte, M., Vitetta, E. S., and Thorpe, P. E. (1995). Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin. Cancer Res.*, 1(12):1623–1634.
- Calemma, R., Ottaiano, A., Trotta, A. M., Nasti, G., Romano, C., Napolitano, M., Galati, D., Borrelli, P., Zanotta, S., Cassata, A., Castello, G., Iaffaioli, V. R., and Scala, S. (2012). Fc gamma receptor iii polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-egfr antibodies and clinical outcome. *J. Transl. Med.*, 10:232.
- Carow, C. E., Kim, E., Hawkins, A. L., Webb, H. D., Griffin, C. A., Jabs, E. W., Civin, C. I., and Small, D. (1995). Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (flt3) to 13q12–q13. *Cytogenet. Cell Genet.*, 70(3-4):255–257.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-cd20 monoclonal antibody and polymorphism in igg fc receptor fcgammariii gene. *Blood*, 99(3):754–758.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 267(27):19027–19030.
- Chen, Z. and Freedman, M. S. (2008). Cd16+ gammadelta t cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.*, 128(2):219–227.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Buchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., Schiffer, C. A., Doehner, H., Tallman, M. S., Lister, T. A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R. A., Lowenberg, B., Sanz, M. A., Head, D. R., Ohno, R., and Bloomfield, C. D. (2003). Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 21(24):4642–4649.
- Choudhary, C., Schwable, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C., and Serve, H. (2005). Aml-associated flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with flt3 itd mutations. *Blood*, 106(1):265–273.

- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6(4):443–446.
- Coley, W. B. (1910). The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysipelas and the bacillus prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.*, 3(Surg Sect):1–48.
- Croft, M. (2009). The role of tnf superfamily members in t-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(4):271–285.
- Croft, M. (2010). Control of immunity by the tnfr-related molecule ox40 (cd134). *Annu. Rev. Immunol.*, 28:57–78.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory t cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.*, 10(9):942–949.
- Davies, D. R., Padlan, E. A., and Sheriff, S. (1990). Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:439–473.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., and Chen, L. (2002). Tumor-associated b7-h1 promotes t-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, 8(8):793–800.
- Dosil, M., Wang, S., and Lemischka, I. R. (1993). Mitogenic signalling and substrate specificity of the flk2/flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol. Cell Biol.*, 13(10):6572–6585.
- Drexler, H. G. (1996). Expression of flt3 receptor and response to flt3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10(4):588–599.
- Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988). Localization of the binding site for the human high-affinity fc receptor on igg. *Nature*, 332(6164):563–564.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, 3(11):991–998.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2):137–148.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004b). The three es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:329–360.

- Durben, M. (2012). *Entwicklung, Optimierung und präklinische Charakterisierung bispezifischer Antikörper zur Zielzell-vermittelten Aktivierung von T-Zellen für die Immuntherapie von Leukämie*. Thesis/dissertation, Universität Tübingen.
- Edelman, G. M., Gall, W. E., Waxdal, M. J., and Konigsberg, W. H. (1968). The covalent structure of a human gamma g-immunoglobulin. i. isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry*, 7(5):1950–1958.
- Edelman, G. M. and Gally, J. A. (1962). The nature of bence-jones proteins. chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J. Exp. Med.*, 116:207–227.
- Edelman, G. M. and POULIK, M. D. (1961). Studies on structural units of the gamma-globulins. *J. Exp. Med.*, 113:861–884.
- Ehrlich, P. (1900). On immunity with special reference to cell life. <http://ia700701.us.archive.org/30/items/philtrans05561826/05561826.pdf>.
- Ehrlich, P. (1908). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. <http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/institut/veroeffentlichungen-von-paul-ehrlich/1906-1914/1909-karzinomforschung.pdf>.
- Fagreaus, A. (1948). *Antibody production in relation to the development of plasma cells: In vivo and In vitro Experiments*. Thesis/dissertation, Stockholm.
- Flanagan, S. P. (1966). 'nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.*, 8(3):295–309.
- Frohling, S., Schlenk, R. F., Breitnick, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Dohner, H., and Dohner, K. (2002). Prognostic significance of activating fli3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the aml study group ulm. *Blood*, 100(13):4372–4380.
- Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., Lyman, S., and . (1995). Multi-level effects of fli3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*, 86(5):1661–1670.
- Gabriel, E. M. and Lattime, E. C. (2007). Anti-ctl-associated antigen 4: are regulatory t cells a target? *Clin. Cancer Res.*, 13(3):785–788.
- Gaidzik, V. and Dohner, K. (2008). Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin. Oncol.*, 35(4):346–355.
- Gao, Q., Qiu, S. J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X. Y., Xiao, Y. S., Xu, Y., Li, Y. W., and Tang, Z. Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic t

- cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.*, 25(18):2586–2593.
- Garcia-Pozo, L., Miquilena-Colina, M. E., Lozano-Rodriguez, T., and Garcia-Monzon, C. (2008). [endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis]. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 100(6):355–360.
- Ghesquieres, H., Cartron, G., Seymour, J. F., fau Larue, M. H., Offner, F., Soubeyran, P., Perrot, A., Brice, P., Bouabdallah, R., Sonet, A., Dupuis, J., Casasnovas, O., Catalano, J. V., Delmer, A., Jardin, F., Verney, A., Dartigues, P., and Salles, G. (2012). Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the prima study is not affected by fcgr3a and fcgr2a polymorphisms. *Blood*, 120(13):2650–2657.
- Gibson, A. D. (2002). Phase iii trial of a humanized anti-cd33 antibody (hum195) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma*, 3(1):18–19.
- Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T., and Stevenson, G. T. (1987). Preparation and performance of bispecific f(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked fab' gamma fragments. *J. Immunol.*, 139(7):2367–2375.
- Godfrey, W. R., Fagnoni, F. F., Harara, M. A., Buck, D., and Engleman, E. G. (1994). Identification of a human ox-40 ligand, a costimulator of cd4+ t cells with homology to tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 180(2):757–762.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1988a). Biochemical characterization of the 44g4 antigen from the hoon pre-b leukemic cell line. *J. Immunol.*, 141(6):1934–1940.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1988b). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44g4 produced against a pre-b leukemic cell line. *J. Immunol.*, 141(6):1925–1933.
- Grawunder, U., West, R. B., and Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(2):172–180.
- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S., and Jakobovits, A. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human ig heavy and light chain yacs. *Nat. Genet.*, 7(1):13–21.
- Grimm, E. A., Mazumder, A., and Rosenberg, S. A. (1982). In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. v. generation of allospecific cytotoxic lymphocytes to nonimmunogenic antigen by supplementation of in vitro sensitization with partially purified t-cell growth factor. *Cell Immunol.*, 70(2):248–259.

- Grosse-Hovest, L., Hartlapp, I., Marwan, W., Brem, G., Rammensee, H. G., and Jung, G. (2003). A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic cd28-stimulation and tumor cell killing. *Eur. J. Immunol.*, 33(5):1334–1340.
- Gusterson, B., Cowley, G., McIlhinney, J., Ozanne, B., Fisher, C., and Reeves, B. (1985). Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *Int. J. Cancer*, 36(6):689–693.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of fas(apo-1/cd95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274(5291):1363–1366.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- Harper, J. R., Bumol, T. F., and Reisfeld, R. A. (1982). Serological and biochemical analyses of monoclonal antibodies to human melanoma-associated antigens. *Hybridoma*, 1(4):423–432.
- Harris, L. J., Skaletsky, E., and McPherson, A. (1998). Crystallographic structure of an intact igg1 monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.*, 275(5):861–872.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichentopf, B., Kloft, M., and Pfreundschuh, M. (1997). Treatment of refractory hodgkin’s disease with an anti-cd16/cd30 bispecific antibody. *Blood*, 89(6):2042–2047.
- Heidelberger, M. and Avery, O. T. (1923). The soluble specific substance of pneumococcus. *J. Exp. Med.*, 38(1):73–79.
- Herberman, R. B. and Holden, H. T. (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.*, 27:305–377.
- Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. (1979). Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur. J. Immunol.*, 9(8):657–659.
- Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Jupudy, V., Ostberg, J., Oflazoglu, E., Huberman, A., Repasky, E., and Czuczman, M. S. (2003). Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-hodgkin’s lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin. Cancer Res.*, 9(16 Pt 1):5866–5873.
- Hjertson, M., Sundstrom, C., Lyman, S. D., Nilsson, K., and Nilsson, G. (1996). Stem cell factor, but not flt3 ligand, induces differentiation and activation of human mast cells. *Exp. Hematol.*, 24(6):748–754.

- Hofmann, M. (2009). *Diplomarbeit: Charakterisierung und Optimierung von monoklonalen Antikörpern gegen AML-assoziierte Antigene*. Thesis/dissertation, Universität Tübingen.
- Hofmann, M., Grosse-Hovest, L., Nubling, T., Pyz, E., Bamberg, M. L., Aulwurm, S., Buhning, H. J., Schwartz, K., Haen, S. P., Schilbach, K., Rammensee, H. G., Salih, H. R., and Jung, G. (2012). Generation, selection and preclinical characterization of an fc-optimized ftt3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*, 26(6):1228–1237.
- Hogarth, P. M. and Pietersz, G. A. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11(4):311–331.
- Hurvitz, S. A., Betting, D. J., Stern, H. M., Quinaux, E., Stinson, J., Seshagiri, S., Zhao, Y., Buyse, M., Mackey, J., Driga, A., Damaraju, S., Sliwkowski, M. X., Robert, N. J., Valero, V., Crown, J., Falkson, C., Brufsky, A., Pienkowski, T., Eiermann, W., Martin, M., Bee, V., Marathe, O., Slamon, D. J., and Timmerman, J. M. (2012). Analysis of fcgamma receptor iia and iia polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 18(12):3478–3486.
- Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O. A., Gilliet, M., Qin, F. X., and Liu, Y. J. (2006). Ox40 ligand shuts down il-10-producing regulatory t cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(35):13138–13143.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of pd-1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by pd-1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(19):12293–12297.
- Jin, L., Lee, E. M., Ramshaw, H. S., Busfield, S. J., Peoppl, A. G., Wilkinson, L., Guthridge, M. A., Thomas, D., Barry, E. F., Boyd, A., Gearing, D. P., Vairo, G., Lopez, A. F., Dick, J. E., and Lock, R. B. (2009). Monoclonal antibody-mediated targeting of cd123, il-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(1):31–42.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069):522–525.
- Jung, G., Honsik, C. J., Reisfeld, R. A., and Muller-Eberhard, H. J. (1986). Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-t3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-t3 conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(12):4479–4483.
- Kavanagh, B., O'Brien, S., Lee, D., Hou, Y., Weinberg, V., Rini, B., Allison, J. P., Small, E. J., and Fong, L. (2008). Ctla4 blockade expands foxp3+ regulatory and activated effector cd4+ t cells in a dose-dependent fashion. *Blood*, 112(4):1175–1183.

- Kazi, J. U. and Ronnstrand, L. (2012). Flt3 signals via the adapter protein grb10 and overexpression of grb10 leads to aberrant cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Mol. Oncol.*
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). Natural killer cells in the mouse. ii. cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.*, 5(2):117–121.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). Natural killer cells in the mouse. i. cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5(2):112–117.
- Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Iino, T., Mori, Y., Iwasaki, H., Niuro, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Harada, M., Ishikawa, F., and Akashi, K. (2008). Human flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J. Immunol.*, 180(11):7358–7367.
- Klein, C., Lammens, A., Schafer, W., Georges, G., Schwaiger, M., Mossner, E., Hopfner, K. P., Umana, P., and Niederfellner, G. (2013). Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting cd20 and their relationship to functional properties. *MAbs.*, 5(1):22–33.
- Kober, J., Leitner, J., Klausner, C., Woitek, R., Majdic, O., Stockl, J., Herndler-Brandstetter, D., Grubeck-Loebenstein, B., Reipert, B. M., Pickl, W. F., Pfistershammer, K., and Steinberger, P. (2008). The capacity of the tnf family members 4-1bbl, ox40l, cd70, gitrl, cd30l and light to costimulate human t cells. *Eur. J. Immunol.*, 38(10):2678–2688.
- Kochenderfer, J. N. and Rosenberg, S. A. (2013). Treating b-cell cancer with t cells expressing anti-cd19 chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*
- Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A. E., and de, H. M. (1997). Fc gammariia-158v/f polymorphism influences the binding of igg by natural killer cell fc gammariia, independently of the fc gammariia-48l/r/h phenotype. *Blood*, 90(3):1109–1114.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D. T., Burnett, A. K., Goldstone, A. H., and Linch, D. C. (2001). The presence of a flt3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (aml) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the united kingdom medical research council aml 10 and 12 trials. *Blood*, 98(6):1752–1759.
- Krupitskaya, Y. and Wakelee, H. A. (2009). Ramucirumab, a fully human mab to the transmembrane signaling tyrosine kinase vegfr-2 for the potential treatment of cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 10(6):597–605.

- Kurosawa, Y., von, B. H., Haas, W., Sakano, H., Trauneker, A., and Tonegawa, S. (1981). Identification of d segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in t lymphocytes. *Nature*, 290(5807):565–570.
- Kwon, E. D., Hurwitz, A. A., Foster, B. A., Madias, C., Feldhaus, A. L., Greenberg, N. M., Burg, M. B., and Allison, J. P. (1997). Manipulation of t cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 94(15):8099–8103.
- Ladoire, S., Arnould, L., Apetoh, L., Coudert, B., Martin, F., Chauffert, B., Fumoleau, P., and Ghiringhelli, F. (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory t cells. *Clin. Cancer Res.*, 14(8):2413–2420.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lafferty, K. J. and Cunningham, A. J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 53(1):27–42.
- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J. P., and Favero, J. (2001). Production of tnf-alpha by human v gamma 9v delta 2 t cells via engagement of fc gamma riiiia, the low affinity type 3 receptor for the fc portion of igg, expressed upon tcr activation by nonpeptidic antigen. *J. Immunol.*, 166(12):7190–7199.
- Latza, U., Durkop, H., Schnittger, S., Ringeling, J., Eitelbach, F., Hummel, M., Fonatsch, C., and Stein, H. (1994). The human ox40 homolog: cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the act35 antigen. *Eur. J. Immunol.*, 24(3):677–683.
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiya, B. I. (2006). Engineered antibody fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 103(11):4005–4010.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by ctla-4 blockade. *Science*, 271(5256):1734–1736.
- Leffers, N., Gooden, M. J., de Jong, R. A., Hoogeboom, B. N., ten Hoor, K. A., Hollema, H., Boezen, H. M., van der Zee, A. G., Daemen, T., and Nijman, H. W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating t-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 58(3):449–459.
- Leischner, H., Albers, C., Grundler, R., Razumovskaya, E., Spiekermann, K., Bohlander, S., Ronnstrand, L., Gotze, K., Peschel, C., and Duyster, J. (2012). Src is a signaling mediator in flt3-itd- but not in flt3-tkd-positive aml. *Blood*, 119(17):4026–4033.

- Levis, M. and Small, D. (2003). Flt3: It does matter in leukemia. *Leukemia*, 17(9):1738–1752.
- Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., and Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 284(5419):1534–1537.
- Lifely, M. R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M. J., and Phillips, J. (1995). Glycosylation and biological activity of campath-1h expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology*, 5(8):813–822.
- Luznik, L. and Fuchs, E. J. (2002). Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control*, 9(2):123–137.
- Lyman, S. D. (1995). Biology of flt3 ligand and receptor. *Int. J. Hematol.*, 62(2):63–73.
- Lyman, S. D. and Jacobsen, S. E. (1998). c-kit ligand and flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, 91(4):1101–1134.
- Lyman, S. D., James, L., Johnson, L., Brasel, K., de, V. P., Escobar, S. S., Downey, H., Splett, R. R., Beckmann, M. P., and McKenna, H. J. (1994). Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 83(10):2795–2801.
- Mallett, S., Fossum, S., and Barclay, A. N. (1990). Characterization of the mrc ox40 antigen of activated cd4 positive t lymphocytes—a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.*, 9(4):1063–1068.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Lyman, S. D., Shortman, K., and McKenna, H. J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.*, 184(5):1953–1962.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from t-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, 74:181–273.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. human antibodies from v-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 222(3):581–597.
- Marrack, J. R. (1934). Derived antigens as a means of studying the relation of specific combination to chemical structure: (section of therapeutics and pharmacology). *Proc. R. Soc. Med.*, 27(8):1063–1065.
- Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R., and E. Frei, I. (1994). Intensive

- postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. cancer and leukemia group b. *N. Engl. J. Med.*, 331(14):896–903.
- McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J., and . (1994). Endoglin, a tgf-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.*, 8(4):345–351.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of balb/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81(10):3180–3184.
- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De, S. T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E. R., Teepe, M., Lyman, S. D., and Peschon, J. J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*, 95(11):3489–3497.
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellstrom, K. E., Mittler, R. S., and Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1bb t-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat. Med.*, 3(6):682–685.
- Mellor, J. D., Brown, M. P., Irving, H. R., Zalcborg, J. R., and Dobrovic, A. (2013). A critical review of the role of fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 6:1.
- Miller, D. W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H. H., Muller, R., and Adamkiewicz, J. (1999). Elevated expression of endoglin, a component of the tgf-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 81(4):568–572.
- Molckovsky, A. and Siu, L. L. (2008). First-in-class, first-in-human phase i results of targeted agents: highlights of the 2008 american society of clinical oncology meeting. *J. Hematol. Oncol.*, 1:20.
- Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Muchhal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., and Lazar, G. A. (2011). A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. *MAbs.*, 3(6):546–557.
- Moreno, I., Martin, G., Bolufer, P., Barragan, E., Rueda, E., Roman, J., Fernandez, P., Leon, P., Mena, A., Cervera, J., Torres, A., and Sanz, M. A. (2003). Incidence and prognostic value of flt3 internal tandem duplication and d835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 88(1):19–24.
- Morris, N. P., Peters, C., Montler, R., Hu, H. M., Curti, B. D., Urba, W. J., and Weinberg, A. D. (2007). Development and characterization of recombinant

- human fc:ox40l fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Mol. Immunol.*, 44(12):3112–3121.
- Murillo, O., Arina, A., Hervas-Stubbs, S., Gupta, A., McCluskey, B., Dubrot, J., Palazon, A., Azpilikueta, A., Ochoa, M. C., Alfaro, C., Solano, S., Perez-Gracia, J. L., Oyajobi, B. O., and Melero, I. (2008). Therapeutic antitumor efficacy of anti-cd137 agonistic monoclonal antibody in mouse models of myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 14(21):6895–6906.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Lacabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M., and Ardizzoni, A. (2008). Immunoglobulin g fragment c receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with her-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 26(11):1789–1796.
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G., and Rabbitts, T. H. (1985). A hapten-specific chimaeric ige antibody with human physiological effector function. *Nature*, 314(6008):268–270.
- Ohshima, Y., Yang, L. P., Uchiyama, T., Tanaka, Y., Baum, P., Sergerie, M., Hermann, P., and Delespesse, G. (1998). Ox40 costimulation enhances interleukin-4 (il-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human cd4(+) t cells into high il-4-producing effectors. *Blood*, 92(9):3338–3345.
- Old, L. J. and Boyse, E. A. (1964). Immunology of experimental tumors. *Annu. Rev. Med.*, 15:167–186.
- Outzen, H. C., Custer, R. P., Eaton, G. J., and Prehn, R. T. (1975). Spontaneous and induced tumor incidence in germfree nudemice. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 17(1):1–9.
- Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, 217(5126):370–371.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., and Allison, J. P. (2009). Blockade of ctla-4 on both effector and regulatory t cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-ctla-4 antibodies. *J. Exp. Med.*, 206(8):1717–1725.
- Perez, P., Hoffman, R. W., Shaw, S., Bluestone, J. A., and Segal, D. M. (1985). Specific targeting of cytotoxic t cells by anti-t3 linked to anti-target cell antibody. *Nature*, 316(6026):354–356.
- Petersen, R. P., Campa, M. J., Sperlazza, J., Conlon, D., Joshi, M. B., D. H. Harpole, J., and E. F. Patz, J. (2006). Tumor infiltrating foxp3+ regulatory t-cells are associated with recurrence in pathologic stage i nslc patients. *Cancer*, 107(12):2866–2872.
- Piconese, S., Valzasina, B., and Colombo, M. P. (2008). Ox40 triggering blocks suppression by regulatory t cells and facilitates tumor rejection. *J. Exp. Med.*, 205(4):825–839.

- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified t cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 365(8):725–733.
- PORTER, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, 73:119–126.
- PORTER, R. R. (1963). Chemical structure of gamma-globulin and antibodies. *Br. Med. Bull.*, 19:197–201.
- PORTER, R. R. (1967a). The structure of antibodies. the basic pattern of the principal class of molecules that neutralize antigens (foreign substances in the body) is four cross-linked chains. this pattern is modified so that antibodies can fit different antigens. *Sci. Am.*, 217(4):81–87.
- PORTER, R. R. (1967b). The structure of immunoglobulins. *Essays Biochem.*, 3:1–24.
- Pross, H. F. and Jondal, M. (1975). Cytotoxic lymphocytes from normal donors. a functional marker of human non-t lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 21(2):226–235.
- Quackenbush, E. J., Gougos, A., Baumal, R., and Letarte, M. (1986). Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Immunol.*, 136(1):118–124.
- Rappold, I., Ziegler, B. L., Kohler, I., Marchetto, S., Rosnet, O., Birnbaum, D., Simmons, P. J., Zannettino, A. C., Hill, B., Neu, S., Knapp, W., Alitalo, R., Alitalo, K., Ullrich, A., Kanz, L., and Buhring, H. J. (1997). Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing flt3 (cd135) receptor tyrosine kinase. *Blood*, 90(1):111–125.
- Ratajczak, J., Marlicz, W., and Ratajczak, M. Z. (1995). [the effect of stk-1 receptor (flk2/flt3) ligand on human erythropoiesis in vitro. clinical implications]. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 94(5):418–424.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Ford, J., Kregenow, R., Marlicz, W., and Gewirtz, A. M. (1996). Flt3/flk-2 (stk-1) ligand does not stimulate human megakaryopoiesis in vitro. *Stem Cells*, 14(1):146–150.
- Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A. H., and Powrie, F. (2006). Blockade of ctla-4 on cd4+cd25+ regulatory t cells abrogates their function in vivo. *J. Immunol.*, 177(7):4376–4383.
- Redpath, S., Michaelsen, T. E., Sandlie, I., and Clark, M. R. (1998). The influence of the hinge region length in binding of human igg to human fcgamma receptors. *Hum. Immunol.*, 59(11):720–727.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Kreitman, R. J., Jung, S. H., Lee, B., and Pastan, I. (1994a). Stabilization of the fv fragments in recombinant immunotoxins by

- disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry*, 33(18):5451–5459.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Webber, K. O., Jung, S. H., Lee, B., and Pastan, I. (1994b). Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized fv. *Protein Eng*, 7(5):697–704.
- Restifo, N. P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F., and Rosenberg, S. A. (1993). Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class i. *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.*, 14(3):182–190.
- Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). Ox40 promotes bcl-xl and bcl-2 expression and is essential for long-term survival of cd4 t cells. *Immunity.*, 15(3):445–455.
- Rosen, L. S., Hurwitz, H. I., Wong, M. K., Goldman, J., Mendelson, D. S., Figg, W. D., Spencer, S., Adams, B. J., Alvarez, D., Seon, B. K., Theuer, C. P., Leigh, B. R., and Gordon, M. S. (2012). A phase i first-in-human study of trc105 (anti-endoglin antibody) in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 18(17):4820–4829.
- Rosenberg, S. A., Eberlein, T. J., Grimm, E. A., Lotze, M. T., Mazumder, A., and Rosenstein, M. (1982). Development of long-term cell lines and lymphoid clones reactive against murine and human tumors: a new approach to the adoptive immunotherapy of cancer. *Surgery*, 92(2):328–336.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., and . (1985a). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 313(23):1485–1492.
- Rosenberg, S. A., Mule, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M., and Schwarz, S. L. (1985b). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 161(5):1169–1188.
- Rosnet, O. and Birnbaum, D. (1993). Hematopoietic receptors of class iii receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev. Oncog.*, 4(6):595–613.
- Rosnet, O., Buhning, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainy, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C., and Birnbaum, D. (1996). Human flt3/flk2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 10(2):238–248.
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O., and Birnbaum, D. (1991). Murine flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the pdgfr/csf1r family. *Oncogene*, 6(9):1641–1650.

- Rottapel, R., Turck, C. W., Casteran, N., Liu, X., Birnbaum, D., Pawson, T., and Dubreuil, P. (1994). Substrate specificities and identification of a putative binding site for pi3k in the carboxy tail of the murine flt3 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 9(6):1755–1765.
- Rusten, L. S., Lyman, S. D., Veiby, O. P., and Jacobsen, S. E. (1996). The flt3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human cd34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood*, 87(4):1317–1325.
- Sabel, M. S., Hess, S. D., Egilmez, N. K., T. F. Conway, J., Chen, F. A., and Bankert, R. B. (2005). Ctla-4 blockade augments human t lymphocyte-mediated suppression of lung tumor xenografts in scid mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(10):944–952.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor alpha-chains (cd25). breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 155(3):1151–1164.
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., and Tonegawa, S. (1981). Identification and nucleotide sequence of a diversity dna segment (d) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature*, 290(5807):562–565.
- Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K. T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., and Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of flt3 (flt3/itd) induces increased ros production, dna damage, and misrepair: implications for poor prognosis in aml. *Blood*, 111(6):3173–3182.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 74(12):5463–5467.
- Sarmay, G., Lund, J., Rozsnyay, Z., Gergely, J., and Jefferis, R. (1992). Mapping and comparison of the interaction sites on the fc region of igg responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (adcc) through different types of human fc gamma receptor. *Mol. Immunol.*, 29(5):633–639.
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y. T., Ohtani, H., Old, L. J., and Odunsi, K. (2005). Intraepithelial cd8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high cd8+/regulatory t cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 102(51):18538–18543.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T., Haferlach, T., and Hiddemann, W. (2002). Analysis of flt3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, fab subtype, and prognosis in the amleg study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100(1):59–66.

- Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024):1565–1570.
- Schulz, G., Buchler, M., Muhrer, K. H., Klapdor, R., Kubel, R., Harthus, H. P., Madry, N., and Bosslet, K. (1988). Immunotherapy of pancreatic cancer with monoclonal antibody bw 494. *Int. J. Cancer Suppl*, 2:89–94.
- Sears, H. F., Atkinson, B., Mattis, J., Ernst, C., Herlyn, D., Steplewski, Z., Hayry, P., and Koprowski, H. (1982). Phase-i clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet*, 1(8275):762–765.
- Senovilla, L., Vacchelli, E., Galon, J., Adjemian, S., Eggermont, A., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Ma, Y., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2012). Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*, 1(8):1323–1343.
- Sexauer, A., Perl, A., Yang, X., Borowitz, M., Gocke, C., Rajkhowa, T., Thiede, C., Frattini, M., Nybakken, G. E., Pratz, K., Karp, J., Smith, B. D., and Levis, M. (2012). Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by flt3 inhibition in flt3/itd aml. *Blood*, 120(20):4205–4214.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). Ifngamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832):1107–1111.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human igg1 n-linked oligosaccharide improves binding to human fc gamma riii and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277(30):26733–26740.
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human igg1 for fc gamma ri, fc gamma rii, fc gamma riii, and fc gamma r and design of igg1 variants with improved binding to the fc gamma r. *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591–6604.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and . (1992). Rag-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate v(d)j rearrangement. *Cell*, 68(5):855–867.
- Siders, W. M., Shields, J., Garron, C., Hu, Y., Boutin, P., Shankara, S., Weber, W., Roberts, B., and Kaplan, J. M. (2010). Involvement of neutrophils and natural killer cells in the anti-tumor activity of alemtuzumab in xenograft tumor models. *Leuk. Lymphoma*, 51(7):1293–1304.
- Sigal, L. H. (2007). Basic science for the clinician 46. molecular biologic agents in development: possible clinical consequences to rheumatologists. *J. Clin. Rheumatol.*, 13(5):286–290.

- Sondak, V. K. and Sosman, J. A. (2003). Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin. Cancer Biol.*, 13(6):409–415.
- Staerz, U. D. and Bevan, M. J. (1986). Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector t-cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(5):1453–1457.
- Staerz, U. D., Kanagawa, O., and Bevan, M. J. (1985). Hybrid antibodies can target sites for attack by t cells. *Nature*, 314(6012):628–631.
- Stavenhagen, J. B., Gorlatov, S., Tuailon, N., Rankin, C. T., Li, H., Burke, S., Huang, L., Vijh, S., Johnson, S., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007). Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating fcgamma receptors. *Cancer Res.*, 67(18):8882–8890.
- Stockmeyer, B., Dechant, M., van, E. M., Tutt, A. L., Sundarapandiyam, K., Graziano, R. F., Repp, R., Kalden, J. R., Gramatzki, M., Glennie, M. J., van de Winkel, J. G., and Valerius, T. (2000). Triggering fc alpha-receptor i (cd89) recruits neutrophils as effector cells for cd20-directed antibody therapy. *J. Immunol.*, 165(10):5954–5961.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*, 183(4124):534–536.
- Svedberg, T. and Rinde, H. (1924). The ultra-centrifuge, a new instrument for the determination of size and distribution of size of particle in amicroscopic colloids. *J. Am. Chem. Soc.*, 46(12):2677–2693.
- Tallman, M. S. (2005). New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, pages 143–150.
- Tenen, D. G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: Aml shows the way. *Nat. Rev. Cancer*, 3(2):89–101.
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G., and Illmer, T. (2002). Analysis of flt3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with fab subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12):4326–4335.
- Thomas, D. A. and Massague, J. (2005). Tgf-beta directly targets cytotoxic t cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5):369–380.
- Tiselius, A. and Kabat, E. A. (1938). Electrophoresis of immune serum. *Science*, 87(2262):416–417.

- Tiselius, A. and Kabat, E. A. (1939). An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.*, 69(1):119–131.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., and Sharpe, A. H. (1995). Loss of ctla-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of ctla-4. *Immunity.*, 3(5):541–547.
- Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., and Pirrotta, V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 42 Pt 2:921–931.
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., and Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-pd-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 366(26):2443–2454.
- Travers, P. J., Arklie, J. L., Trowsdale, J., Patillo, R. A., and Bodmer, W. F. (1982). Lack of expression of hla-abc antigens in choriocarcinoma and other human tumor cell lines. *Natl. Cancer Inst. Monogr*, 60:175–180.
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M., and Tedder, T. F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes b lymphocytes through fc receptor-dependent mechanisms during anti-cd20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 199(12):1659–1669.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and den Eynde, B. J. V. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.*, 9(10):1269–1274.
- Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriel, A. B., Graziano, R. F., van den Herik-Oudijk IE, Repp, R., Deo, Y. M., Lund, J., Kalden, J. R., Gramatzki, M., and van de Winkel, J. G. (1997). Fc α h β (cd89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*, 90(11):4485–4492.
- Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A. D., and Colombo, M. P. (2005). Triggering of ox40 (cd134) on cd4(+)cd25+ t cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for ox40 and its comparison with gitr. *Blood*, 105(7):2845–2851.
- van der Bruggen P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De, P. E., den, E. B. V., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic t lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038):1643–1647.

- Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. (2002). The world health organization (who) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7):2292–2302.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Beau, M. M. L., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the world health organization (who) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5):937–951.
- Vu, M. D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N., and Li, X. C. (2007). Ox40 costimulation turns off foxp3+ tregs. *Blood*, 110(7):2501–2510.
- Wagner, A. D., Thomssen, C., Haerting, J., and Unverzagt, S. (2012). Vascular-endothelial-growth-factor (vegf) targeting therapies for endocrine refractory or resistant metastatic breast cancer. *Cochrane. Database. Syst. Rev.*, 7:CD008941.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P. Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., Pohla, H., Stanczak, J. J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Biedermann, T., Pawelec, G., Derhovanessian, E., Yamagishi, H., Miki, T., Hongo, F., Takaha, N., Hirakawa, K., Tanaka, H., Stevanovic, S., Frisch, J., Mayer-Mokler, A., Kirner, A., Rammensee, H. G., Reinhardt, C., and Singh-Jasuja, H. (2012). Multi-peptide immune response to cancer vaccine ima901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.*
- Wang, J. M., Kumar, S., van, A. A., Kumar, P., Pye, D., and Hunter, R. D. (1995). Irradiation induces up-regulation of e9 protein (cd105) in human vascular endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 62(6):791–796.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H., and Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in ctla-4. *Science*, 270(5238):985–988.
- Weidle, U. H., Tiefenthaler, G., Weiss, E. H., Georges, G., and Brinkmann, U. (2013). The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer. *Cancer Genomics Proteomics.*, 10(1):1–18.
- Weinberg, A. D., Rivera, M. M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J. T., Urba, W. J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the ox-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J. Immunol.*, 164(4):2160–2169.
- Weinberg, A. D., Thalhoffer, C., Morris, N., Walker, J. M., Seiss, D., Wong, S., Axtelm, M. K., Picker, L. J., and Urba, W. J. (2006). Anti-ox40 (cd134) administration to nonhuman primates: immunostimulatory effects and toxicokinetic study. *J. Immunother.*, 29(6):575–585.

- Weiner, L. M., Clark, J. I., Davey, M., Li, W. S., de P. Garcia, I., Ring, D. B., and Alpaugh, R. K. (1995). Phase i trial of 2b1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and fc gamma riii. *Cancer Res.*, 55(20):4586–4593.
- Williams, A. F. and Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily–domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 6:381–405.
- Wodnar-Filipowicz, A. (2003). Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol Sci.*, 18:247–251.
- Wodnar-Filipowicz, A., Lyman, S. D., Gratwohl, A., Tichelli, A., Speck, B., and Nissen, C. (1996). Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia. *Blood*, 88(12):4493–4499.
- Wu, T. T. and Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 132(2):211–250.
- Xie, F., Wang, Q., Chen, Y., Gu, Y., Shi, Q., Ge, Y., Yu, G., Wu, H., Mao, Y., Wang, X., Zhou, Y., and Zhang, X. (2006). Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human ox40: costimulation of t cells and expression on tumor as well as normal gland tissues. *Tissue Antigens*, 67(4):307–317.
- Zheng, R., Friedman, A. D., and Small, D. (2002). Targeted inhibition of flt3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32dcl3 cells caused by expression of flt3/itd mutations. *Blood*, 100(12):4154–4161.

Kapitel 7

Appendix

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| α | anti |
| ACDC | starke Rockband, vgl. TNT |
| ADCC | antibody-dependent cellular cytotoxicity |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| AS | Aminosäure |
| bp | basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | Cluster of differentiation |
| C_H | Konstante Domäne der schweren Kette |
| C_L | Konstante Domäne der leichten Kette |
| cDNA | komplementäre (complementary) DNA |
| CDR | complementary-determining region |
| CDC | complement-dependent cytotoxicity |
| Ci | Curie |
| cpm | counts per minute |
| Cr | Chrom |
| CTL | cytotoxic T-lymphocyte |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | 2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| E:T | Effektor:Target |
| FACS | Fluorescence activated cell sorter |
| FCS | fötale Kälberserum |
| g | Gramm |
| °C | Grad Celsius |
| h | Stunde |

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| HAMA | human anti-mouse antibody |
| kB | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| M | Mol |
| ml | Milliliter |
| min | Minute |
| μ l | Mikroliter |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cell(s) |
| PI | Propidiumiodid |
| <i>R</i> -PE | <i>R</i> -Phycoerythrin |
| SDS | Sodium-(Natrium-)dodecylsulfat |
| TNT | starker Rocksong, vgl. ACDC |
| U | Unit |
| v/v | volume per volume |
| w/v | weight per volume |
| <i>xg</i> | relative Erdbeschleunigung |

7.2 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| Name | Claus <u>Martin</u> Hofmann |
| Geburtstag | 21. Juli 1982 |
| Geburtsort | Stuttgart |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

SCHULISCHE AUSBILDUNG

| | |
|-------------|---|
| 1989 - 1993 | Grundschule Plüderhausen |
| 1993 - 2002 | Max-Planck-Gymnasium Schorndorf Abitur-Sonderpreis für sehr gute Leistungen in der SMV |

ZIVILDienst

| | |
|-------------|--|
| 2002 - 2003 | Zentral-OP des Kreiskrankenhaus Schorndorf |
|-------------|--|

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

| | |
|-------------------|--|
| 2003 - 2005 | Grundstudium Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim |
| 2005 - 2009 | Hauptstudium Biologie (Diplom) an der Eberhard Karls Universität Tübingen Hauptfach: Immunologie / Zellbiologie Nebenfächer: Humangenetik, Virologie |
| 12/2005 - 07/2007 | wissenschaftl. Hilfskraft am Institut für Humangenetik, Medizinische Genetik |
| 04/2008 - 01/2009 | Diplomarbeit an der Eberhard Karls Universität Tübingen Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie unter der Leitung von Prof. Hans-Georg Rammensee, betreut durch Prof. Gundram Jung mit dem Titel: <i>Charakterisierung und Optimierung von monoklonalen Antikörpern gegen AML-assoziierte Antigene</i> |
| 02/2009 - 04/2013 | Praktischer Teil der Promotionsarbeit an der Eberhard Karls Universität Tübingen Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie unter der Leitung von Prof. Hans-Georg Rammensee, betreut durch Prof. Gundram Jung mit dem Titel: <i>Von FLT3 über ENG bis OX40: Optimierung von anti-Tumor-Antikörpern durch verbesserte Rekrutierung immunologischer Effektorzellen</i> |

BERUFSTÄTIGKEIT

| | |
|------------|---|
| ab 05/2013 | Synimmune GmbH, Tübingen wissenschaftl. Angestellter im Bereich Forschung und Entwicklung |
|------------|---|

