

**Effektormechanismen eines rekombinanten,  
bisppezifischen Antikörpers, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16],  
im Tribody-Format**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

**Pia Glorius**

Kiel, 2012



Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas C. G. Bosch

Koreferent: Prof. Dr. Martin Gramatzki

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2011

Zur Druckreife genehmigt: 16. April 2012

Gezeichnet: Prof. Dr. Lutz Kipp (Dekan)



<b>Inhaltsverzeichnis</b>		Seite
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Lymphome und Leukämien</b>	<b>1</b>
1.1.1	Hodgkin-Lymphom	3
1.1.2	Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell Reihe	3
<b>1.2</b>	<b>Therapieverfahren von malignen Lymphomen und Leukämien</b>	<b>6</b>
1.2.1	Konventionelle Therapieansätze	6
1.2.2	Gezielte Therapien, <i>Targeted Therapies</i>	8
<b>1.3</b>	<b>Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie</b>	<b>8</b>
1.3.1	Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	10
1.3.1.1	Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	11
1.3.1.2	Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	12
<b>1.4</b>	<b>Zielstrukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen</b>	<b>14</b>
<b>1.5</b>	<b>CD20 als Zielstruktur auf Neoplasien der B-Zell Reihe</b>	<b>16</b>
<b>1.6</b>	<b>Limitierungen derzeitiger CD20-Antikörper (Rituximab)</b>	<b>19</b>
<b>1.7</b>	<b>Optimierung CD20-gerichteter Therapien</b>	<b>20</b>
1.7.1	Neue CD20-Antikörper mit Zulassung oder in klinischer Entwicklung	21
1.7.2	Optimierung der Antikörper-Eigenschaften	22
<b>1.8</b>	<b>Bispezifische Antikörper</b>	<b>23</b>
1.8.1	Bispezifische Antikörper-Formate zur Rekrutierung von Effektorzellen	24
1.8.2	Bispezifische Antikörper im Tribody-Format	28
<b>1.9</b>	<b>Fcγ-Rezeptoren als <i>Trigger</i>-Molekül auf Effektorzellen</b>	<b>29</b>
1.9.1	Der Fcγ-Rezeptor IIa (CD16a) als <i>Trigger</i> -Molekül	30
1.9.2	NK-Zellen als Effektorzellen in der antitumoralen Therapie	32
<b>1.10</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.2	Allgemeine Puffer, Lösungen und Medien	37
2.1.3	Vektoren	37
2.1.4	Enzyme	38
2.1.5	Kits	38
2.1.6	Oligonukleotide	39
2.1.7	Bakterienstämme	40
2.1.8	Zellkultur	40

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.8.1	Zelllinien	40
2.1.8.2	Zellkulturmedien	41
2.1.9	Antikörper	41
2.1.10	Mäuse	43
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>44</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1.1	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
2.2.1.2	Agarosegelelektrophorese	44
2.2.1.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	44
2.2.1.4	Ligationsreaktion	44
2.2.1.5	Transformation von Plasmid-DNA	45
2.2.1.6	Analyse von Klonierungen	45
2.2.1.7	DNA Sequenzanalyse	45
2.2.1.8	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	45
2.2.1.9	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	46
2.2.1.10	Klonierungen	46
2.2.2	Zellbiologische Methoden	47
2.2.2.1	Zellkultur	47
2.2.2.2	Proliferationsinhibitionsversuche	47
2.2.2.3	Expression von Antikörper-Derivaten in Säugerzellen	48
2.2.2.3.1	Liposomaler Gentransfer	48
2.2.2.3.2	Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation	48
2.2.2.4	Virale Transduktion	49
2.2.2.5	Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut	49
2.2.2.6	<sup>51</sup> Chrom-Freisetzungsversuche	50
2.2.3	Biochemische Methoden	51
2.2.3.1	Reinigung von Antikörper-Derivaten	51
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Antikörper-Chargen durch Kapillar- Elektrophorese	51
2.2.3.3	SDS-PAGE	52
2.2.3.4	Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen	53
2.2.4	Durchflusszytometrische Methoden	54
2.2.4.1	Analyse der spezifischen Bindung von Antikörper-Derivaten	54
2.2.4.2	<i>In vitro</i> B-Zell Depletion und NK-Zell Aktivierung	55
2.2.5	Tierversuche	56
2.2.5.1	Rekonstruktion eines humanen Immunsystems in Mäusen	56
2.2.5.2	B-Zell Depletion in „humansierten Mäusen“	56
2.2.5.3	<i>In vivo</i> Bildgebung von fluoreszierenden Tumorzellen in Mäusen	57
2.2.6	Graphische Darstellung und statistische Analysen	57

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]</b>	<b>59</b>
3.1.1	Konstruktion der Vektoren zur eukaryotischen Expression des bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	60
3.1.2	Produktion und Reinigung des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	61
3.1.3	Analyse der Bindungseigenschaften des bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	64
3.1.4	Effektormechanismen des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	66
3.1.4.1	Untersuchung zur Vermittlung von antiproliferativen Effekten durch den bispezifischen Tribody [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	66
3.1.4.2	Untersuchung zur Vermittlung von zellulärer Zytotoxizität durch den bispezifischen Tribody [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	67
3.1.4.3	Vergleich der Effektivität von [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] und dem monoklonalen Antikörper Rituximab	72
3.1.4.4	Analyse zu [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]-vermittelter, Zell-vermittelter Zytotoxizität gegenüber frisch isolierten Tumorzellen	73
3.1.4.5	<i>In vitro</i> Untersuchungen von B-Zell Depletion und NK-Zell Aktivierung durch den Tribody [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	77
3.1.4.6	<i>In vivo</i> Untersuchungen von B-Zell Depletion durch den Tribody [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	82
3.1.5	Einfluss des Epitops auf das zytotoxische Potential des Tribodies	84
3.1.5.1	Konstruktion, Expression und Reinigung des bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a]	85
3.1.5.2	Vergleich der Bindungseigenschaften von [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] und [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a]	88
3.1.5.3	Vergleichende Untersuchung zur lytischen Aktivität der bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a] und [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	89
3.1.5.4	Analyse der B-Zell Depletion durch [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a] und [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] im Vergleich	91
<b>3.2</b>	<b>Vorarbeiten zur Etablierung eines xeno-transplantierten Mausmodells</b>	<b>93</b>
3.2.1	Herstellung von Zelllinien mit stabiler Expression von Katushka	94
3.2.2	Stabilitätsnachweis der roten Fluoreszenz transduzierter Zellen	95
3.2.3	Einfluss der viralen Transduktion auf das Verhalten von Raji <sub>Kat</sub> in <sup>51</sup> Cr-Freisetzungsversuchen	97
3.2.4	Nachweis der fluoreszierenden Zellen in der Maus mittels <i>in vivo</i> Imaging	100

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Bispezifische Antikörper im Tribody-Format als geeignete Anti-Tumor-Wirkstoffe</b>	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>Immunogenität von Antikörpern</b>	<b>102</b>
<b>4.3</b>	<b>Effektormechanismen des Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]</b>	<b>103</b>
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der lytischen Kapazitäten von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und monoklonalen CD20-Antikörpern</b>	<b>105</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss des Polymorphismus von FcγRIIIa auf die ADCC-Aktivität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]</b>	<b>107</b>
<b>4.6</b>	<b>Rekrutierung von autologen Effektorzellen durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]</b>	<b>109</b>
<b>4.7</b>	<b>B-Zell Depletion in „humanisierten Mäusen“</b>	<b>110</b>
<b>4.8</b>	<b>Einfluss des Epitops auf das zytotoxische Potential des Tribodies</b>	<b>111</b>
<b>4.9</b>	<b>Pharmakokinetik des Tribodies</b>	<b>112</b>
<b>4.10</b>	<b>Grundlagen zur Etablierung eines xeno-transplantierten Mausmodells</b>	<b>114</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>PATIENTEN CHARAKTERISTIKA</b>	<b>136</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>141</b>



<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1    Prozentuale Verteilung der häufigsten Krebsformen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006	1
Abbildung 2    Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs B-lymphatischer Neoplasien	2
Abbildung 3    Schema der zeitlichen Entwicklung und Zulassung von modifizierten Antikörpern	9
Abbildung 4    Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	11
Abbildung 5    Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	13
Abbildung 6    Expressionsmuster von Differenzierungsantigenen in der B-Zell Entwicklung	15
Abbildung 7    Schematische Darstellung der Struktur von CD20	16
Abbildung 8    Klassische Formate bispezifischer Antikörper	24
Abbildung 9    Beispiele für rekombinante, bispezifische Antikörper zur Rekrutierung von Effektorzellen	27
Abbildung 10   Die humane Fcγ-Rezeptor Familie	29
Abbildung 11   Schema des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	59
Abbildung 12   Schema der Expressionskassetten des Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16]	60
Abbildung 13   Nachweis des gereinigten [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] mittels Kapillar-Elektrophorese	62
Abbildung 14   Nachweis des gereinigten [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] in Coomassie-gefärbten Gelen	63
Abbildung 15   Immundetektion des gereinigten [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] auf PVDF Membranen	64
Abbildung 16   Analysen der spezifischen Bindung von Antikörperderivaten	65
Abbildung 17   Analyse der Dosis-abhängigen Bindung von [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] an BHK-CD16a-F158 und BHK-CD16a-V158	66
Abbildung 18   Analyse antiproliferativer Effekte von Antikörpern	67
Abbildung 19   Untersuchung der zytotoxischen Kapazität des bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] mit Vollblut	68
Abbildung 20   Zytotoxizitätsexperimente mit unterschiedlichen Effektorpopulationen	69
Abbildung 21   Nachweis der CD16-abhängigen Vermittlung von ADCC	70
Abbildung 22   Einfluss des E:T Verhältnisses auf die spezifische Vermittlung von ADCC	71
Abbildung 23   Vergleich der lytischen Potentiale von [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] und Rituximab	72
Abbildung 24   Einfluss des CD16-Polymorphismus auf die Induktion der Zielzellyse	73

## Inhaltsverzeichnis

---

Abbildung 25	[(CD20) <sub>2</sub> xCD16] vermittelt signifikante Lyse von frisch isolierten Tumorzellen	74
Abbildung 26	Dosis-abhängige Lyse der Tumorzellen von zwei CLL-Patienten	75
Abbildung 27	ADCC von Tumorzellen durch autologe NK-Zellen	76
Abbildung 28	Dosis-abhängige Depletion von B-Zellen aus mononukleären Zellen	78
Abbildung 29	B-Zell Depletion in Vollblut mit inhibiertem Komplementsystem	79
Abbildung 30	Autologe B-Zell Depletion in Vollblut mit aktivem Komplementsystem	80
Abbildung 31	Nachweis der NK-Zell Aktivierung in Vollblut	81
Abbildung 32	Analyse des peripheren Blutes einer „humanisierten Maus“	83
Abbildung 33	B-Zell Depletion mit [(CD20) <sub>2</sub> xCD16] in „humanisierten Mäusen“	84
Abbildung 34	Schema des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a]	85
Abbildung 35	Konstruktion des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a]	86
Abbildung 36	Nachweis des gereinigten [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a] mittels Kapillar-Elektrophorese	86
Abbildung 37	Nachweis der erfolgreichen Reinigung und der korrekten Zusammenlagerung von [(CD20) <sub>2</sub> xCD16a]	87
Abbildung 38	Spezifische Bindungsmuster von CD16- und CD16a-gerichteten Tribodies	88
Abbildung 39	ADCC-Experimente zum Vergleich der lytischen Potentiale von CD20-gerichteten Antikörpermolekülen	90
Abbildung 40	Tribody-vermittelte Zytotoxizität in Vollblut im Vergleich	91
Abbildung 41	Vergleichende Analyse der B-Zell Depletion in Vollblut	92
Abbildung 42	Karte des lentiviralen Expressionsvektors	94
Abbildung 43	Nachweis der Fluoreszenz in transduzierten Zellen	95
Abbildung 44	Nachweis der stabilen Fluoreszenz in transduzierten Zellen <i>in vitro</i>	96
Abbildung 45	Nachweis der stabilen Fluoreszenz in HeLa <sub>Kat</sub> <i>ex vivo</i>	97
Abbildung 46	ADCC-Experimente zum Vergleich des lytischen Verhaltens verschiedener Raji Zellen	98
Abbildung 47	Optische Detektion von HeLa <sub>Kat</sub> Tumoren in einer Maus	99

<b>Verzeichnis der Tabellen</b>		Seite
Tabelle 1	Einteilung der NHL nach klinischem Verlauf	4
Tabelle 2	Risikogruppen nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Musshoff 1977)	5
Tabelle 3	Aktueller Status von CD20-Antikörpern und ihren Hauptwirkmechanismen	22
Tabelle 4	Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	35
Tabelle 5	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	37
Tabelle 6	Übersicht der verwendeten Vektoren	37
Tabelle 7	Übersicht der verwendeten Enzyme	38
Tabelle 8	Übersicht der verwendeten Kits	38
Tabelle 9	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	39
Tabelle 10	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	40
Tabelle 11	Übersicht der verwendeten Zelllinien	40
Tabelle 12	Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien	41
Tabelle 13	Übersicht der verwendeten Antikörper	41
Tabelle 14	Übersicht der verwendeten Mausstämme	43
Tabelle 15	Zusammensetzung von hergestellten 12%-igen SDS-Gelen, Ansatz für zwei Gele	52
Tabelle 16	Protokoll zur Immundetektion der schweren und leichten Ketten von Tribody-Molekülen auf PVDF-Membranen	53
Tabelle 17	B-Zell Depletion. Protokoll zum Nachweis von B-Zellen	55
Tabelle 18	NK-Zell Aktivierung. Protokoll zum Nachweis der CD69-Expression	56
Tabelle 19	Patienten Charakteristika	136

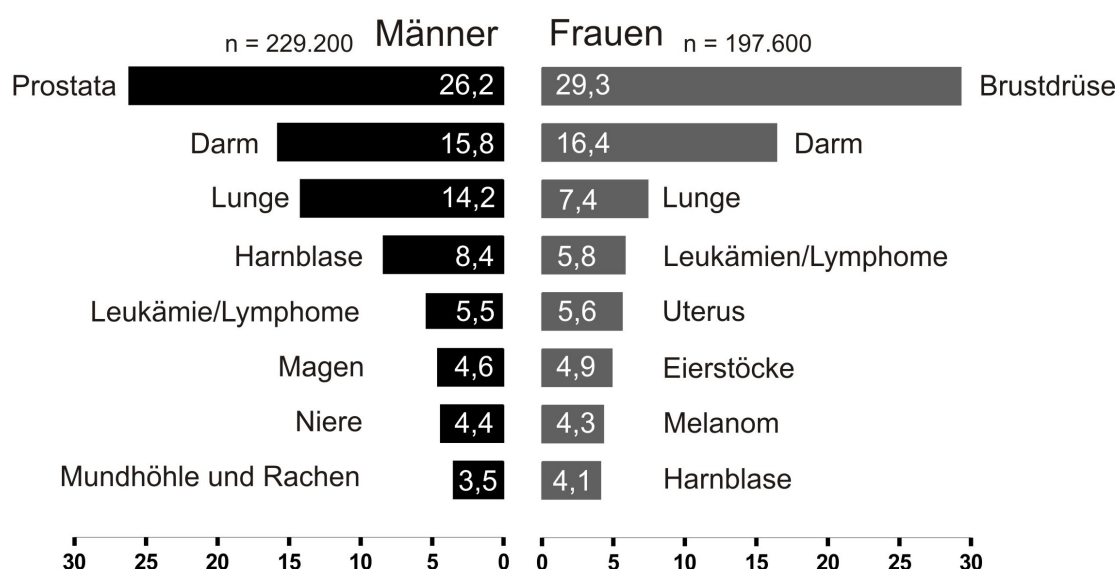


# 1 Einleitung

## 1.1 Lymphome und Leukämien

In 2008 traten weltweit geschätzte 12,7 Millionen Krebsneuerkrankungen auf und 7,6 Millionen Menschen starben an Krebs. Mit ca. 13% aller Todesfälle ist Krebs damit die häufigste Todesursache (Ferlay, *et al.* 2010). Die am häufigsten diagnostizierten Krebsarten sind Lungenkrebs (1,6 Millionen; 12,7%), Brustkrebs (1,4 Millionen; 10,9%) und Darmkrebs (1,2 Millionen; 9,7%). Weltweit machen hämatologische Erkrankungen 7,5% aller Krebserkrankungen bei Männern und 6,4% bei Frauen aus.

In Deutschland wurden für das Jahr 2006 vom Robert Koch-Institut mit 229.200 Fällen bei Männern und 197.600 Fällen bei Frauen insgesamt ca. 426.800 Krebsneuerkrankungen geschätzt (Abbildung 1). Im Mittel versterben Frauen mit 76 Jahren an Krebs, wobei die Wahrscheinlichkeit bei 38% liegt, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken. Bei Männern liegen das Krebsrisiko bei 47% und das durch Krebs verursachte Sterbealter im Mittel bei 72 Jahren. Die mit einem Anteil von über 26% häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen ist Krebs der Brustdrüse und bei Männern Prostatakrebs (Abbildung 1).

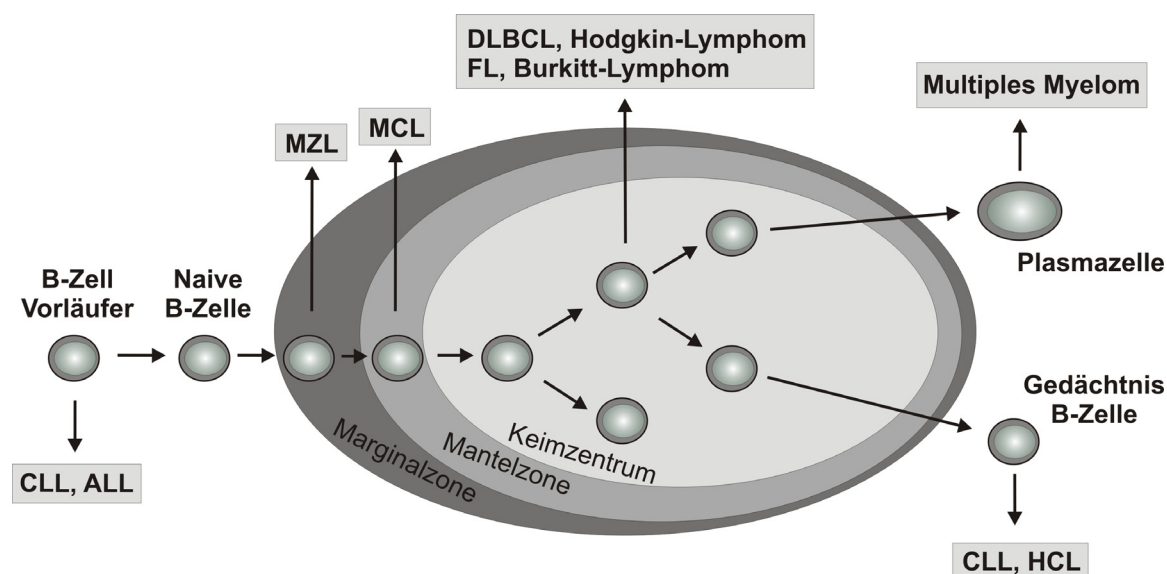


**Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der häufigsten Krebsformen aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006.** Leukämien und Lymphome liegen bei Männern und Frauen mit 5,5% an fünfter bzw. mit 5,8% an vierter Stelle der Häufigkeitsverteilung. Abgewandelt nach „Krebs in Deutschland“, Robert-Koch-Institut 2010.

## Einleitung

Im Jahr 2006 erkrankten insgesamt über 24.000 Erwachsene an einem Lymphom oder einer Leukämie. Damit liegen die hämatologischen Neoplasien bei Männern mit 5,5% an fünfter und bei Frauen mit 5,8% an vierter Stelle der Häufigkeitsverteilung aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland.

Leukämien und Lymphome sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die durch maligne entartete, hämatopoietische Zellen mit unkontrollierter Proliferation entstehen. Diese Zellen besitzen abhängig von ihrer Linienzugehörigkeit und dem Differenzierungsstadium charakteristisch klinische, morphologische, immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale, nach welchen sie von der *World Health Organization* (WHO) klassifiziert werden (Jaffe 2001). Maligne Neoplasien des lymphatischen Systems werden nach histologischen Gesichtspunkten in zwei Gruppen eingeteilt: Hodgkin-Lymphome und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), die chronisch oder aggressiv verlaufen können.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des zellulären Ursprungs B-lymphatischer Neoplasien.** CLL, chronisch lymphatische Leukämie; ALL, akute lymphatische Leukämie; MZL, Marginalzonelymphom; MCL, Mantelzelllymphom; DLBCL, diffuses, großzelliges B-Zell Lymphom; FL, follikuläres Lymphom; HCL, Haarzellleukämie. Abgewandelt nach Tiacci, *et al.* 2006.

Während Lymphome in der Peripherie entstehen, entstehen Leukämien im Knochenmark und werden entsprechend ihrer Verlaufsform und ihrer Ursprungszelle unterteilt (Abbildung 2; Tiacci, *et al.* 2006). Die Hauptgruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Epidemiologie und Prognose in akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronisch myeloische Leukämie (CML) und

chronisch lymphatische Leukämie (CLL). Lymphatische Leukämien und Lymphome können sowohl von B-Zellen als auch von T-Zellen abgeleitet werden. Die CLL wird als niedermalignes NHL klassifiziert. Da sich die malignen Zellen der CLL in Blut, Milz, Lymphknoten und Knochenmark finden lassen, wird die CLL als leukämisch verlaufendes Lymphom bezeichnet.

### 1.1.1 Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom wird nach seinem Erstbeschreiber Thomas Hodgkin benannt und lässt sich in der überwiegenden Zahl der Fälle von B-Lymphozyten ableiten. Typischerweise ist das Hodgkin-Lymphom monoklonal und histologisch an malignen Riesenzellen, den einkernigen Hodgkin- und mehrkernigen Sternberg-Reed-Zellen nachzuweisen (Küppers & Hansmann 2005). Die Inzidenz für Morbus Hodgkin beträgt 2-3/100.000 Einwohnern pro Jahr, wobei der Altersgipfel bei ca. 43 Jahren liegt (Robert-Koch-Institut 2010). Nach der WHO-Klassifizierung werden diese Lymphome in die häufiger auftretenden klassischen Hodgkin-Lymphome (95% aller Hodgkin-Lymphome) und in nodulare, Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphome gegliedert. Ursachen für diese Erkrankungen sind unklar. Bei der Hälfte aller Patienten wurde eine Infektion mit Epstein-Barr-Viren in den Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen gefunden, weshalb onkogene Viren Auslöser sein könnten. Aber auch Mutationen in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen kommen als mögliche Ursache in Betracht (Swerdlow 2003). Abhängig vom Stadium der Erkrankung werden die Patienten mit unterschiedlichen Regimen aus einer Kombination von Bestrahlung und Polychemotherapie (ABDV = Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbacin) behandelt, wodurch heute über 80% aller Patienten langfristig geheilt werden können (Ansen, *et al.* 2002). Trotzdem kommt es häufig zu Rezidiven mit schlechter Prognose, die eine Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation erfordern (Ekstrand & Horning 2002).

### 1.1.2 Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell Reihe

Unter Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) versteht man eine heterogene Gruppe maligner Lymphome, die mit einer Häufigkeit von 80% von B-Lymphozyten und seltener von T-Zellen oder natürlichen Killer-(NK-)Zellen ausgeht. Der maligne Klon entwickelt sich aus korrespondierenden Zellen der normalen Lymphogenese in verschiedenen Komparti-

## Einleitung

---

menten des Lymphknotens oder anderer lymphatischer Organe. Die Inzidenz für NHL beträgt 12-15/100.000 Einwohner pro Jahr mit steigender Tendenz (Robert-Koch-Institut 2010). Abhängig vom Verlauf der Erkrankung werden indolente und aggressive Formen unterschieden (Tabelle 1; Swerdlow 2008).

**Tabelle 1: Einteilung der NHL nach klinischem Verlauf (Swerdlow 2008)**

Indolente NHL	Aggressive NHL
Chronisch, lymphatische Leukämie (CLL)	Prolymphozytenleukämie
Lymphoplasmozytisches Lymphom	Multiples Myelom (Plasmozytom)
Haarzelleukämie	Diffuses, großzelliges B-Zell Lymphom
Mantelzell-Lymphom	Mediastinales B-Zell Lymphom
Marginalzonenlymphom, MALT-Lymphom	Lymphoblastisches Lymphom
Follikuläres Lymphom	Burkitt-Lymphom
	Plasmazelleukämie

Bei aggressiven NHL liegt das Ausmaß der Infiltration des Knochenmarks mit malignen Zellen unter 25%, während man bei einem darüber liegenden Wert von einer akuten, lymphoblastischen Leukämie spricht. Die häufigsten Formen der malignen B-Zell Lymphome sind CLL, follikuläres Lymphom und diffuses, großzelliges B-Zell Lymphom (Küppers 2005; Roman & Smith 2011).

Die Ätiologie der Erkrankung ist weitestgehend unbekannt, allerdings gibt es gesicherte Hinweise auf den Zusammenhang von Infektionen mit EBV (Burkitt-Lymphom) oder *Helicobacter pylori* (MALT-Lymphom; Parsonnet, *et al.* 1994; Brady, *et al.* 2007). Außerdem steigt das Risiko an einem NHL zu erkranken mit starker Strahlenbelastung, aggressiver Chemotherapie, Immunsuppression nach Organtransplantation, sowie Immundefizienzen und Autoimmunerkrankungen (Robert-Koch-Institut 2010). Umwelttoxinen, wie vermehrte Nitrataufnahme, Rauchen oder UV-Strahlung werden als Risikofaktoren diskutiert (Morton, *et al.* 2005; Armstrong & Krickler 2007; Boffetta & de Vocht 2007). Bei vielen NHL-Patienten sind strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, wie Translokationen, Deletionen und Trisomien, nachweisbar (Küppers 2005). Häufig davon betroffen ist der Genlocus der Immunglobulin schweren Kette (IgH) auf Chromosom 14q32. Durch Translokation geraten Proto-Onkogene unter die Kontrolle des IgH Promotors. Die Überexpression von c-myc (zum Beispiel in Burkitt-Lymphomen) spielt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation, während Bcl-1 (Überexpression in Mantelzell-Lymphomen) ein wesentlicher Kofaktor für die Zellzyklusregulation ist. Wird



Bcl-2 überexprimiert (in folliculären Lymphomen), kommt es zu einer Reduktion von Apoptose (programmierter Zelltod, *programmed cell death*, PCD; Staudt & Dave 2005). Für die Wahl der Therapie werden Patienten verschiedenen Risikogruppen nach der Ann-Arbor-Klassifikation zugeordnet (Tabelle 2; Musshoff 1977). Indolente Lymphome haben einen langjährigen Verlauf und werden in der Regel zunächst beobachtet. Patienten mit niedrigen NHL-Stadien (I/II) werden mit alleiniger Strahlentherapie behandelt und können so geheilt werden. Erst bei deutlicher Progression ist Immunchemotherapie, zum Beispiel R-CHOP (monoklonaler CD20-Antikörper Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon), die Therapie erster Wahl (Kahl 2008). Bei fortgeschrittenen, indolenten NHL (Stadium III/VI) gibt es keinen kurativen Ansatz und selten lassen sich komplette Remissionen erzielen. Die Anwendung von Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation wird hierfür zurzeit in Studien geprüft. Die mittlere Überlebensrate bei indolenten NHL liegt bei 9-10 Jahren (Michl 2010).

Im Gegensatz dazu führen die aggressiven NHL innerhalb von wenigen Monaten unbehandelt zum Tod. Das Plasmozytom, die CLL und das Mantelzelllymphom gelten als nahezu unheilbar. Trotzdem steht auch hier die Immunchemotherapie (R-CHOP) an erster Stelle (Robak, *et al.* 2011). Der Therapieansatz verlängert das Gesamtüberleben der Patienten, wobei das 5-Jahres-Überleben bei aggressiven NHL unter Therapie bei 25-85% liegt. Eine Stammzelltransplantation ist hier oft der einzige, kurative Ansatz (Michl 2010).

**Tabelle 2: Risikogruppen nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Musshoff 1977)**

Stadium	Lymphknotenbefall
I	Befall einer Lymphknotenregion (I/N) oder einer extranodalen Lokalisation (I/E)
II	Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen (II/N) oder 2 extranodalen Lokalisationen (II/E) auf einer Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen (III/N) oder extranodalen Lokalisationen (III/E) beidseits des Zwerchfells
IV	Disseminierter oder diffuser Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe (z. B. Knochenmark, Leber, Lunge, Haut) mit oder ohne Lymphknotenbefall

### 1.2 Therapieverfahren von malignen Lymphomen und Leukämien

Die Behandlung von malignen Neoplasien richtet sich nach der Art, dem Ausbreitungsgrad und der Aggressivität der Erkrankung. Um optimale Ergebnisse zu erzielen werden häufig verschiedene Therapieformen kombiniert. Für jeden Lymphomtyp wird diese Kombination individuell angepasst, so dass nicht von einer einzigen Standardtherapie gesprochen werden kann (Ansell & Armitage 2005).

#### 1.2.1 Konventionelle Therapieansätze

Bei langsam progredienten Erkrankungen ohne oder mit nur geringen Beschwerden besteht die Möglichkeit zunächst auf eine Therapie zu verzichten. In regelmäßigen Kontrollen wird das Fortschreiten der Erkrankung verfolgt, um eventuell später eine Behandlung, zum Beispiel eine Chemotherapie, durchzuführen. In der Regel wird eine Kombination verschiedener Zytostatika als so genannte Polychemotherapie verwendet. Mit diesem Ansatz können die Effekte einzelner Medikamente verstärkt und die Nebenwirkungen gering gehalten werden. Eine Chemotherapie, zum Beispiel mit Antimetaboliten, Anthrazyklinen oder Topoisomerase-Inhibitoren, wirkt in der Regel systemisch. Die induzierten Wirkmechanismen sind nicht Tumor-spezifisch, sondern wirken auch bei proliferierenden Zellen gesunder Gewebe. Gerade Knochenmark, Keimdrüsen, Mund- und Darmschleimhaut sowie Haarwurzeln sind betroffen (Michl 2010).

Nach einer Chemotherapie kann der Einsatz von hoch energetischen Strahlen den Therapieerfolg erhöhen. Mit der Bestrahlung können Tumorzellen abgetötet, der Tumor dadurch verkleinert oder in frühen Stadien sogar vollständig entfernt werden.

Sowohl bei der Strahlen- als auch bei der Chemotherapie können Spätfolgen und Langzeitschäden als Nebenwirkungen auftreten. Beispiele dafür sind Infertilität, Hypothyreose, koronare Herzerkrankungen und Organschäden an Niere, Leber oder Nervensystem. Außerdem ist das Risiko für Sekundärmalignome erhöht, welches lebenslang bestehen bleibt und abhängig von der kumulativen Dosis, Auswahl verabreichter Zytostatika sowie von Dosis und Feldgröße der Strahlentherapie ist (Ng, *et al.* 2011).

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Verabreichung von Zytokinen. Substanzen, wie zum Beispiel Interleukin-2, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interferon- $\alpha$ , können die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten induzieren und zytotoxische Zellen aktivieren (Michl 2010).

Bei aggressiven Lymphomen oder Rezidiven sind die Erfolgsaussichten mit einer Hochdosischemotherapie deutlich höher als mit konventionellen Chemotherapien (Robak, *et al.* 2011). In kurzer Zeit werden dem Patienten maximal tolerable Dosen an Chemotherapeutika verabreicht, die alle malignen Zellen eliminieren sollen. Allerdings wird damit auch der größte Teil des hämatopoietischen Systems im Knochenmark zerstört, weshalb eine Stammzelltransplantation zur Rekonstruktion des Immunsystems im Patienten häufig nötig ist (Schmitz, *et al.* 2007).

Stammzelltransplantationen können autolog (mit patienteneigenen Stammzellen) oder allogene (mit Stammzellen von fremden Spendern) erfolgen. Autologe Stammzelltransplantationen führen in der Regel zu geringeren Nebenwirkungen und verkürzen die Phasen der Knochenmarksaplasie bzw. Neutropenie nach der Transplantation. Ein Vorteil allogener Stammzelltransplantationen kann die so genannte *Graft versus Leukemia* Reaktion (GvL) sein (Horowitz, *et al.* 1990). Die entstehenden Immunzellen im Patienten können noch verbliebene Lymphomzellen als fremd erkennen und eliminieren. Dieser Effekt ist vermutlich dafür verantwortlich, dass nach der Transplantation mit allogenen Stammzellen Rezidive seltener auftreten als mit autologer Stammzelltransplantation. Andererseits kann sich die so genannte Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (*Graft versus Host Disease*, GvHD) nachteilig auf den Erfolg einer allogenen Transplantation auswirken (Lee 2010). Die T-Lymphozyten des neuen Immunsystems können gesunde, körpereigene Zellen des Patienten als fremdes Gewebe erkennen und bekämpfen. Die Übereinstimmung bestimmter Gewebemerkmale mittels humanes Leukozytenantigen-(HLA-)Typisierung ist entscheidend für den Erfolg der Transplantation und dem Ausbleiben bzw. der Eindämmung einer GvHD. Generelle Nebenwirkungen von Stammzelltransplantationen sind Übelkeit, Entzündung von Pankreas und Mundschleimhaut, sowie allergische Reaktionen, die schon während oder kurz nach der Reinfusion der hämatopoietischen Zellen auftreten können. Weitere Komplikationen stellen das erhöhte Infektionsrisiko in der Phase der Neutropenie nach einer Stammzelltransplantation und ein mögliches Transplantatversagen (< 1% der Fälle) dar. Spätfolgen von Hochdosischemotherapie mit anschließender Transplantation sind das hohe Risiko von Zweitmalignomen und Infertilität. Die therapieassoziierte Mortalität beträgt hier ca. 2% (Michl 2010).

Die hohen Risiken, Nebenwirkungen und auftretenden Spätfolgen von Stammzelltransplantation, Chemo- und Strahlentherapie zeigen, dass die Entwicklung alternativer Therapieansätze wünschenswert ist.

### 1.2.2 Gezielte Therapien, *Targeted Therapies*

Durch den Fortschritt in molekularbiologischer Forschung und das bessere Verständnis von Signalnetzwerken der Zelle kam ein sich ständig erweiterndes Spektrum an möglichen, spezifischen Angriffspunkten zur Behandlung von Krebserkrankungen in Betracht. Unter dem Begriff der „gezielten Therapien“ werden verschiedene Wirkstoffe zusammengefasst, die spezifisch gegen zytologische und biologische Charakteristika verschiedener Tumore gerichtet sind. Mit einer Tumor-spezifischen Wirkung ist die Effektivität einer solchen Therapie im Vergleich zu konventionellen Therapien erhöht. Ziel der Tumor-gerichteten Substanzen ist, das Wachstum und die Ausbreitung der Tumore zu inhibieren, indem zum Beispiel Stoffwechselwege gestört, Gefäßneubildung unterbunden oder Apoptose in den Tumorzellen induziert wird. Zu diesen Therapeutika zählen monoklonale Antikörper und so genannte *small molecules*, zu denen unter anderem Tyrosinkinase-Inhibitoren, Histon-Deacetylase-Inhibitoren und Proteasomen-Inhibitoren gehören (Mahadevan & Fisher 2011). In der Regel werden diese Substanzen mit den konventionellen Therapien kombiniert. Auch bei zielgerichteten Therapien gibt es Limitierungen. Das Potential, Resistenzen gegen die Substanzen zu entwickeln, wird dabei am häufigsten beobachtet.

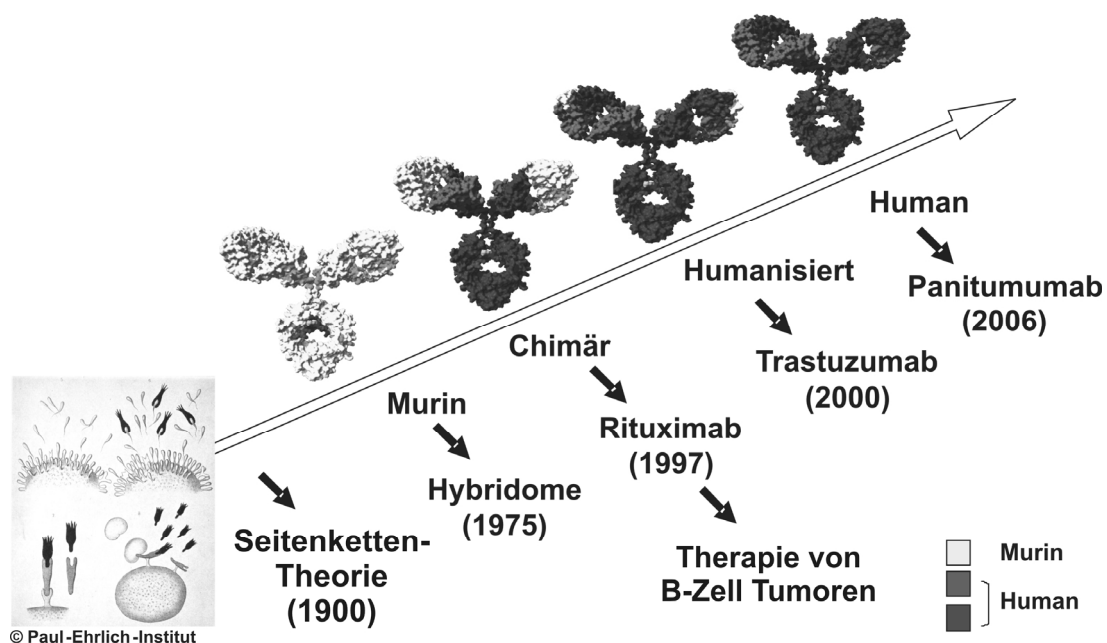
### 1.3 Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie

Mit dem Prozess der passiven Serotherapie war es erstmals gelungen, Resistenzen gegen infektiöse Krankheiten von einem Tier auf ein anderes durch ihr Serum zu übertragen. Die Immunisierung von Hunden mit humanem Sarkom und der Transfer ihres Serums auf Patienten bestätigten die Seitenkettentheorie von Paul Ehrlich aus dem Jahr 1900 (Ehrlich 1900). Die Theorie besagt, dass „Gifte“ (Antigene) zielgenau an Seitenketten (Rezeptoren) auf Zellen binden und ihre Wirkung entfalten können bzw. an Antitoxine im Serum binden und neutralisiert werden können. Ein halbes Jahrhundert später wurden Antikörper als diese Antitoxine identifiziert.

Mittlerweile ist der Einsatz monoklonaler Antikörper Standard in der Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen. Allerdings wurden klinische Studien erst möglich mit der Entwicklung der Hybridom-Technologie, durch welche monoklonale Antikörper in ausreichenden Mengen hergestellt werden konnten (Kohler & Milstein 1975). Die ersten, klinisch getesteten Antikörper in den frühen 80er Jahren waren murinen Ursprungs. 1987 wurde der erste, monoklonale Antikörper von der *Food and Drug Administration* (FDA)

für den klinischen Einsatz zugelassen: Muromonab-CD3 (Orthoklone OKT3®) zur immunsuppressiven Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen (Kung, *et al.* 1979; Smith 1996).

Trotz therapeutischer Erfolge mit murinen Antikörpern, waren Immunreaktionen gegen die verabreichten Antikörper ein häufig auftretendes Problem. Die Patienten bildeten neutralisierende Antikörper, so genannte humane Anti-Maus-Antikörper oder humane Anti-Ratte-Antikörper (HAMAs bzw. HARAs), die die Effizienz der Wirkstoffe minderten (Schroff, *et al.* 1985; Shawler, *et al.* 1985). Im Laufe der Zeit wurden Technologien entwickelt, um die Immunogenität von Antikörpern zu reduzieren (Clark 2000). Bei der Chimärisierung werden die konstanten Domänen eines murinen Antikörpers durch entsprechende, humane Domänen ersetzt (Boulianne, *et al.* 1984; Neuberger, *et al.* 1985). Humanisierte Antikörper besitzen dagegen lediglich die Komplementaritätsbestimmenden Regionen (*complementarity determining regions*, CDR) des ursprünglichen, murinen Moleküls, der Rest des Antikörpers ist humanen Ursprungs (Abbildung 3; Jones, *et al.* 1986). Durch Technologien zur Chimärisierung und Humanisierung von Antikörpern stellte sich zusätzlich heraus, dass humane *fragment crystallizable*-(Fc-) Domänen effektiver humane Effektorzellen zur Eliminierung von Zielzellen rekrutieren können als die parentalen, murinen Antikörper (Riechmann, *et al.* 1988).



**Abbildung 3: Schema der zeitlichen Entwicklung und Zulassung von modifizierten Antikörpern.** Im Laufe der Zeit wurden Technologien entwickelt, die es ermöglichten Antikörper mit zunehmend humanem Anteil bzw. vollständig human herzustellen. Abgewandelt nach Peipp, *et al.* 2011.

Mittlerweile ist es sogar möglich, *in vitro* und *in vivo* komplett humane Antikörper herzustellen. So können aus humanen Antikörperbanken mittels *Phage-Display* Technologie Antikörperfragmente mit gewünschter Spezifität isoliert und rekombinant mit humanen, konstanten Antikörperdomänen zu vollständigen Antikörpern fusioniert werden (Smith 1985; McCafferty, *et al.* 1990). Die Entwicklung von transgenen Tieren, bei welchen das endogene Immunglobulin G Gen-Repertoire teilweise oder vollständig gegen das humane ausgetauscht wurde, ermöglicht die Gewinnung von vollständig humanen Antikörpern *in vivo* (Tomizuka, *et al.* 2000). Durch Immunisierung produzieren diese Tiere humane IgG Antikörper.

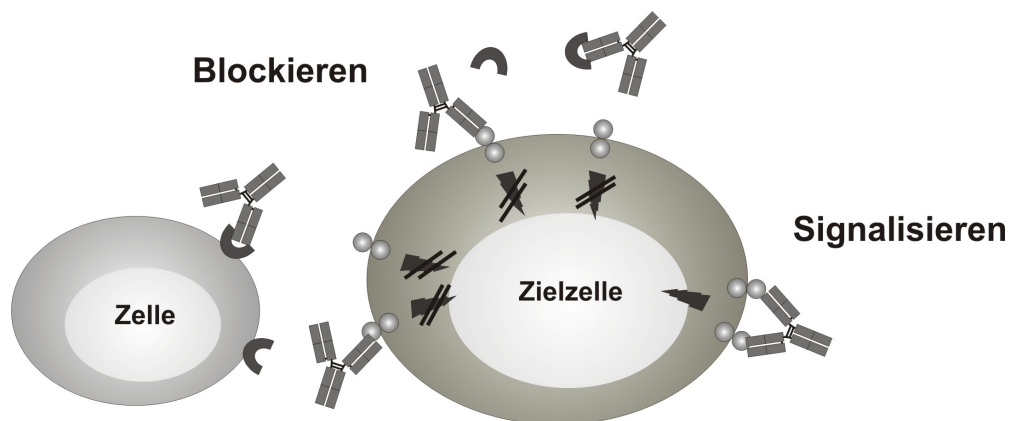
Der am häufigsten verwendete Isotyp bei therapeutischen Antikörpern ist IgG1, da er im Vergleich zu anderen IgG-Klassen die höchste Affinität zu allen FcγR-Klassen besitzt (Nimmerjahn & Ravetch 2005; Schroeder Jr & Cavacini 2010). Außerdem interagieren humane IgG-Moleküle mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), der von verschiedenen Zellen, wie vaskuläre Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen, exprimiert wird (Roopenian & Akilesh 2007). Neben der Aufgabe des FcRn, maternale Antikörper über die Plazenta zum Fötus zu transportieren, spielt der Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Homöostase von Immunglobulin G. Es wurde gezeigt, dass er die Serumretentionszeit von diesen Molekülen *in vivo* von einer bis zu mehreren Wochen verlängern kann (Roopenian & Akilesh 2007).

### 1.3.1 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Monoklonale Antikörper können direkte und indirekte Wirkmechanismen induzieren. Entweder markieren diese Moleküle Zielzellen, damit andere Komponenten oder Effektorzellen des körpereigenen Immunsystems die markierten Zellen zerstören, oder sie initiieren Signalmechanismen in den Zielzellen, die zur Proliferationsinhibition oder Apoptose führen (Glennie & Johnson 2000). Außerdem können Antikörper als Vehikel für Zytostatika, Toxine oder radioaktive Isotope genutzt werden, um diese gezielt zu malignem Gewebe zu transportieren (Allen, *et al.* 2002). Dabei haben die Wahl des Zielantigens, sowie die Eigenschaften und das Format des Antikörpers möglichen Einfluss auf den klinischen Erfolg.

### 1.3.1.1 Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Therapeutische Antikörper können durch die Bindung an Zielstrukturen direkte Effekte vermitteln, indem sie deren Interaktion mit einem Bindungspartner beeinträchtigen (Abbildung 4). Das Antigen kann ein löslicher Ligand sein, wie zum Beispiel das Zytokin TNF $\alpha$ , gegen welches die Antikörper Infliximab, Adalimumab und Certolizimab gerichtet sind. Durch die Bindung der Antikörper werden Entzündungsreaktionen blockiert (Bondeson & Maini 2001; Navarro-Sarabia, *et al.* 2006).



**Abbildung 4: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.** Antikörper können die Interaktion zwischen löslichen oder zellgebundenen Liganden mit dem Rezeptor auf der Zielzelle blockieren oder durch Bindung an den Oberflächenrezeptor antiproliferative oder pro-apoptische Signale in der Zielzelle auslösen. Abgewandelt nach Glennie & Johnson 2000.

Andrerseits können Antikörper gegen Rezeptoren auf Zelloberflächen gerichtet sein und die Interaktion mit einem Liganden blockieren, die Multimerisierung des Antigens stören, oder auch Apoptose in den Zielzellen induzieren. Beispiele für solche Antikörper sind Cetuximab, Panitumumab (beide gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor, EGFR, gerichtet) oder Trastuzumab (gegen den Rezeptor Her2 gerichtet). Durch die Bindung von Trastuzumab wird die Dimerisierung des Rezeptors Her2 blockiert und damit das Tumorstadium eingeschränkt (Harries & Smith 2002). Die Bindung eines Antikörpers an einen Rezeptor kann aber auch nachgeschaltete Signalkaskaden aktivieren, die antiproliferative Effekte besitzen oder Zellzyklusarrest bzw. Apoptose auslösen können. Die Kreuzvernetzung von zum Beispiel CD22, CD33 oder HLA Klasse II mit Antikörpern führt zu Signalen, die die Proliferation der Zellen beeinträchtigen (Vitale, *et al.* 1999; Dechant, *et al.* 2003; Meng, *et al.* 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass *death receptor* 5-(DR5-)Antikörper Apoptose in Tumorzellen induzieren können (Wilson, *et al.* 2011).

### 1.3.1.2 Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

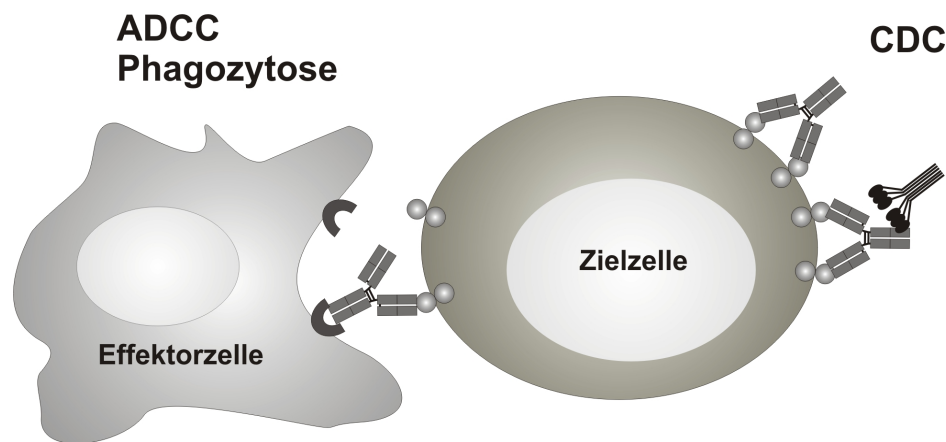
Das Auslösen von Immunreaktionen über den Fc-Teil eines Antikörpers ist ein indirekter Wirkmechanismus. Abhängig vom Isotyp des Antikörpers können diese Mechanismen unterschiedlich effektiv vermittelt werden.

Antikörper können Komplementkaskaden durch die Interaktion mit C1q auslösen, die zur Bildung von Poren in den Membranen der Zielzellen und dadurch zum Tod dieser Zellen führen (Abbildung 5). Dieser Mechanismus wird als Komplement-abhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) bezeichnet. Die CD20-Antikörper Rituximab und Ofatumumab sind in der Lage Zielzellen über CDC zu lysieren (Reff, *et al.* 1994; Golay, *et al.* 2000; Cragg, *et al.* 2003). Die Rolle der CDC als Effektormechanismus in Antikörper-basierter Therapie wird kontrovers diskutiert. In einigen Tumor-Mausmodellen wurde ein Zusammenhang zwischen CDC und Eliminierung von Tumoren gezeigt. Zum Beispiel wurde die therapeutische Aktivität von CD20-Antikörpern durch Inaktivierung des Komplementsystems reduziert (Cragg & Glennie 2004). Andererseits war in Komplementfaktor C3- oder C4-defizienten Mäusen die Aktivität von Rituximab im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht (Uchida, *et al.* 2004; Nimmerjahn & Ravetch 2006; Wang, *et al.* 2009). Daten aus anderen Mausmodellen wiederum zeigten, dass CDC vor allem für die Depletion von nicht zirkulierenden B-Zellen in der Milz ein wichtiger Mechanismus ist (Gong, *et al.* 2005). In aktuellen *in vivo* Studien wurde der Effekt der lokalen Tumorlast auf die von CD20-Antikörpern vermittelten Mechanismen untersucht (Boross, *et al.* 2011). Sowohl bei geringer als auch bei hoher Tumorlast spielte die Vermittlung von CDC eine Rolle für die antitumorale Aktivität der CD20-Antikörper. In Patienten wird Komplement durch die Applikation von Antikörpern aktiviert, denn es wurde nachgewiesen, dass die einzelnen Komplementkomponenten verbraucht werden (Kennedy, *et al.* 2004). Die Aktivierung könnte Ursache für die mit der Erstinfusion von Rituximab assoziierte Toxizität sein (van der Kolk, *et al.* 2001).

Das zelluläre Immunsystem kann über andere Mechanismen zur Tumoreliminierung von Antikörper aktiviert werden. Über die Interaktion der Fc-Domäne mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) können Effektorzellen rekrutiert werden, die entweder zytotoxisch oder phagozytotisch agieren (Abbildung 5). Zu den Effektorzellen des Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen, die verschiedene Fc $\gamma$ R exprimieren (Ravetch & Kinet 1991). Phagozytose kann über die Rekrutierung von dendritischen Zellen, Granulozyten und Makrophagen vermittelt werden (Brekke & Sandlie 2003). Auch wenn Phagozytose in verschiedenen Untersuchungen als Wirkmechanismus von Antikörpern *in vitro* gefunden wurde (Cartron, *et*



al. 2008; Shibata-Koyama, *et al.* 2009), fehlt ein eindeutiger Beweis für die klinische Relevanz.



**Abbildung 5: Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.** Mit dem Fc-Teil können Antikörper indirekte Mechanismen vermitteln. Über die Rekrutierung von Komplementfaktoren kann CDC induziert werden. Interaktionen zwischen Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen und dem Fc-Teil eines Antikörpers führen zur Vermittlung von ADCC und Phagozytose. Abgewandelt nach Glennie & Johnson 2000.

NK-Zellen können zum Beispiel durch die Interaktion des Fc $\gamma$ R1IIa mit dem Fc-Teil eines an eine Zielzelle gebundenen Antikörpers rekrutiert und aktiviert werden, so dass eine immunologische Synapse zwischen der NK-Zelle und der Zielzelle entsteht. Die Aktivierung von NK-Zellen führt zur Freisetzung lytischer Granula, die Perforine und Granzyme enthalten, welche letztendlich den Tod der Zielzelle herbeiführen und wird Antikörper-abhängige, zell-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) genannt.

Ergebnisse aus Studien mit verschiedenen Tiermodellen deuten darauf, dass die Fähigkeit einiger monoklonaler Antikörper (Rituximab, Trastuzumab), FcR-vermittelte Mechanismen zu induzieren, entscheidend für das therapeutische Potential dieser Antikörper ist (Nimmerjahn & Ravetch 2007). Zum Beispiel konnte in *in vivo* Analysen gezeigt werden, dass die Wirkung therapeutischer Antikörper in Abhängigkeit der Antikörper-Klasse von den unterschiedlichen Affinitäten zu aktivierenden und inhibitorischen FcR beeinflusst wurde (Nimmerjahn & Ravetch 2005). In anderen Tiermodellen wurde stark verringerte Aktivität von Antikörpern beobachtet, wenn keine funktionellen, aktivierenden Fc $\gamma$ R auf der Oberfläche von Effektorzellen exprimiert wurden (Clynes, *et al.* 2000). Bei den Tieren war die FcR-assozierte, gemeinsame  $\gamma$ -Kette genetisch ausgeschaltet, welche notwendig für die Zelloberflächenexpression aktivierender Fc $\gamma$ R ist. Auch in einem transgenen Mausmodell wurde gezeigt, dass die

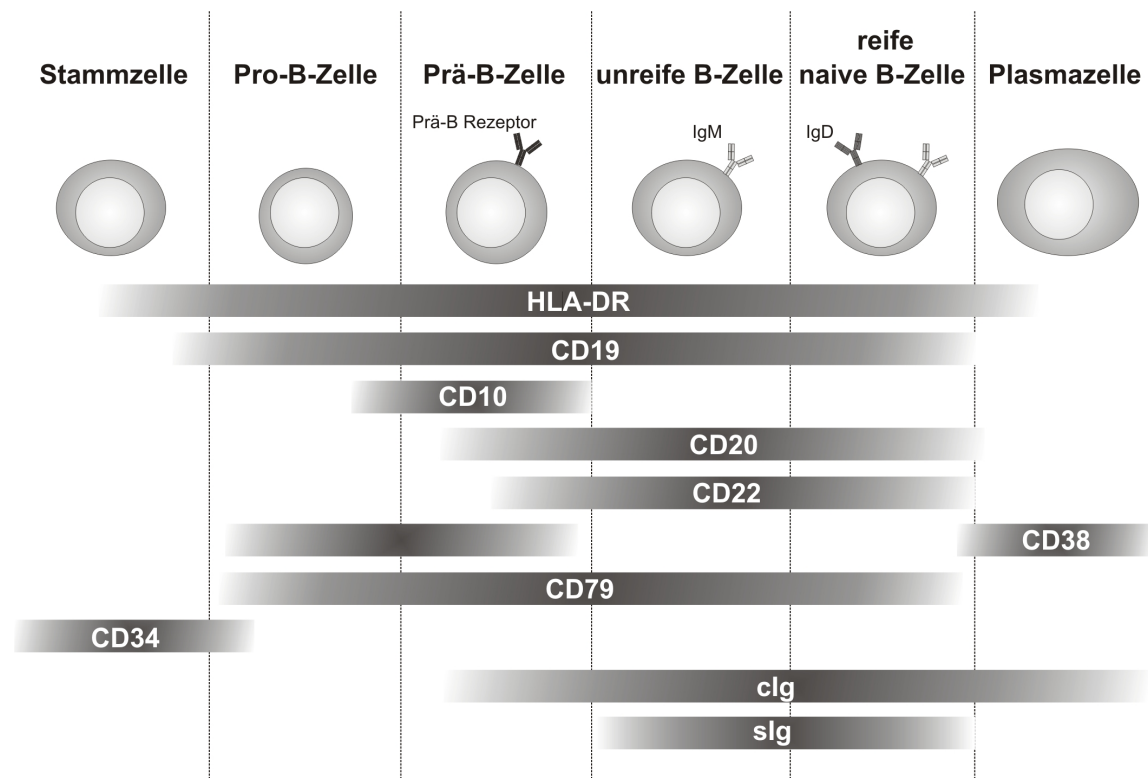
antitumorale Aktivität von CD20-Antikörpern verloren geht, wenn die Signalgebung durch aktivierende Fc $\gamma$ R mittels Mutation der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette verhindert wird (de Haij, *et al.* 2010).

In klinischen Studien konnte eine Abhängigkeit der therapeutischen Aktivitäten von Rituximab und Trastuzumab vom Fc $\gamma$ RIIIa-Polymorphismus beobachtet werden (Weng & Levy 2003; Musolino, *et al.* 2008). Bei einer homozygoten Expression der Variante Fc $\gamma$ RIIIa-V158 (CD16a-V158) waren bei den Patienten die Ansprechraten verbessert und das Überleben verlängert. Die CD16a-V158 Variante bindet humanes IgG1 mit einer höheren Affinität als die CD16a-F158 Variante, wodurch Effektorzellen mit der CD16a-V158 Variante auf der Oberfläche effizienter von monoklonalen Antikörpern zur Tumorlyse rekrutiert werden können (Cartron, *et al.* 2002). Insgesamt lassen diese Daten den Schluss zu, dass FcR-vermittelten Effektorfunktionen eine große Bedeutung in der Antikörper-basierten Therapie zukommt.

### 1.4 Zielstrukturen auf der Oberfläche von Tumorzellen

Für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in gezielten Therapien ist die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen auf Tumorzellen notwendig (Carter, *et al.* 2004). Diese sollten zur Vermeidung von Nebenwirkungen nicht auf den Oberflächen von anderen Geweben oder einem breiten Spektrum an Zellen zu finden sein. Vor allem die Expression auf Stammzellen wäre von Nachteil, wenn nach der Behandlung ohne Stammzelltransplantation ein funktionelles, hämatopoietisches System rekonstruiert werden soll. Dagegen wäre die Expression auf Tumorstammzellen oder Tumorstammzellvorläuferzellen vorteilhaft für den Erfolg der Behandlung (Hosen, *et al.* 2007; Park, *et al.* 2009). Mit der Eliminierung dieser Zellen könnten die Chancen auf die Entstehung von Rezidiven verringert oder sogar ganz ausgeräumt werden. Abhängig von der therapeutischen Strategie gibt es weitere Bedingungen, die ein Zielantigen erfüllen sollte. Bei der Verwendung von Antikörper-Konjugaten, die in die Zelle eingeschleust werden sollen, ist es notwendig, dass die Zielstruktur nach Bindung des Antikörpers stark internalisiert (Chari 2007).

Die linienrestringierten Differenzierungsmarker CD19, CD20 oder CD22 werden exklusiv auf B-Zellen exprimiert und stellen damit mögliche Zielstrukturen bei der Behandlung von B-Zell Neoplasien dar (Abbildung 6).



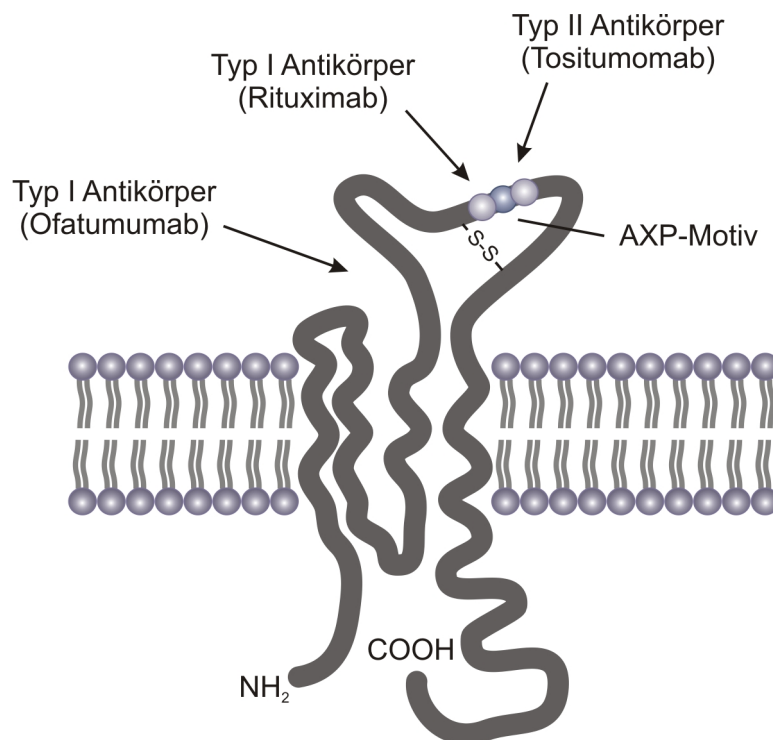
**Abbildung 6: Expressionsmuster von Differenzierungsantigenen in der B-Zell Entwicklung.** Abhängig vom Reifestadium der B-Zelle werden verschiedene Antigene zytoplasmatisch oder auf der Oberfläche exprimiert. Neoplasien der B-Zell Reihe können aufgrund der Differenzierungsantigene bestimmten Entwicklungsstadien zugeordnet werden. Die exprimierten Antigene können als Zielstrukturen für Antikörper-basierte Therapien dienen. clg, zytoplasmatisch exprimiertes Immunglobulin; slg, membranständiges Immunglobulin. Abgewandelt nach Rothe & Schmitz 1996.

CD19-gerichtete Antikörper zeigten in präklinischen Tiermodellen (Maus, Primat) Depletion von B-Zellen aus Knochenmark, Gewebe und der Peripherie (Tedder 2009). In klinischen Studien mit monoklonalen CD19-Antikörpern konnte bisher nur geringe antitumorale Aktivität beobachtet werden. CD22 ist eine attraktive Zielstruktur für Antikörper-Konjugate, da das Molekül über Endosomen internalisiert und wieder auf die Zelloberfläche gebracht werden kann (O'Reilly, *et al.* 2011).

### 1.5 CD20 als Zielantigen auf Neoplasien der B-Zell Reihe

CD20 wird spezifisch auf B-Zellen exprimiert. Die Expression ist zuerst auf Prä-B-Zellen im Knochenmark zu sehen und bleibt bis zur Plasmazelldifferenzierung bestehen (Abbildung 6; Stashenko, *et al.* 1980; Loken, *et al.* 1987).

CD20 ist ein unglykosyliertes Phosphoprotein mit vier Transmembrandomänen und gehört zur Familie der *membrane-spanning 4-A* (MS4A) (Einfeld, *et al.* 1988; Stamenkovic & Seed 1988; Ishibashi, *et al.* 2001; Liang, *et al.* 2001). Zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne befindet sich eine extrazelluläre Schleife von 44 Aminosäuren, während der Carboxyl- als auch der Amino-Terminus des Proteins auf der zytoplasmatischen Seite liegen (Abbildung 7; Tedder, *et al.* 1988). Außerdem befindet sich eine kleinere Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2. Es wurde gezeigt, dass CD20 als Homo-Multimer, vorwiegend als Tetramer, auf der Zelloberfläche vorliegt (Polyak & Deans 2002; Polyak, *et al.* 2008).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur von CD20.** CD20 weist vier Transmembrandomänen auf. Carboxyl- und Amino-Terminus liegen intrazellulär. Extrazellulär werden eine kleinere und eine größere Schleife gebildet. AXP-Motiv, Motiv aus den Aminosäureresten Alanin und Prolin, die durch eine beliebige Aminosäure getrennt sind. Dieses Motiv ist an der Bindung der meisten CD20-Antikörper beteiligt. Abgewandelt nach Cragg 2011.

Auch nach 30 Jahren intensiver Analyse ist die Funktion von CD20 nicht aufgeklärt, da noch kein natürlicher Ligand identifiziert wurde. Außerdem zeigen CD20-defiziente Mäuse keine merklichen Phänotypen (O'Keefe, *et al.* 1998; Uchida, *et al.* 2004). B-Zell Entwicklung, Gewebslokalisierung, Signaltransduktion, Proliferation, T-Zell abhängige Antikörperreaktionen und Affinitätsreifung sind in diesen Mäusen normal. Es gibt Hinweise darauf, dass CD20 als  $\text{Ca}^{2+}$  Ionenkanal funktioniert. Bei CD20-transfizierten Zellen wurde zum Beispiel eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$  Leitfähigkeit beobachtet (Bubien, *et al.* 1993). Die Assoziation des B-Zell Rezeptors (BCR) in *lipid rafts* spielt dabei wahrscheinlich eine Rolle, da es durch Ligandenbindung an den BCR zu einem Kationeneinstrom kommt (Li, *et al.* 2003). Außerdem wird vermutet, dass CD20-generierte Signale nach Bindung monoklonaler Antikörper von der Expression des BCR und dem damit verbundenen Signalweg abhängen (Walshe, *et al.* 2008). Gestützt wird diese Annahme durch die Stadien-spezifische Expression von CD20 auf B-Zellen, sowie der Beobachtung einer reduzierten Expression des BCR in CD20-defizienten Mäusen (Tedder & Engel 1994; Ernst, *et al.* 2005).

Obwohl bisher keine Kristallstruktur des vollständigen Antigens erzeugt werden konnte, wurden die frühen, topologischen Vorhersagen größtenteils durch proteolytische Analysen bestätigt (Polyak, *et al.* 1998). Die intrazellulären Regionen von CD20 besitzen zahlreiche Serin- und Threonin-Reste, welche während der Zellzyklusprogression und Proliferation phosphoryliert werden können (Clark, *et al.* 1989). Die unterschiedlichen Phosphorylierungen resultieren in verschiedene Isoformen von CD20 mit 33, 35 oder 37 kDa und können durch direkte Ligandbindung von CD20-Antikörpern verstärkt werden (Oettgen, *et al.* 1983; Tedder & Schlossman 1988).

Die größere, extrazelluläre Schleife von CD20 bietet Epitope für die Bindung der meisten CD20-Antikörper. Die Aminosäurereste von Alanin an Position 170 und Prolin an Position 172 stellen ein charakteristisches Motiv für die Bindung von Antikörpern dar (Polyak & Deans 2002; Teeling, *et al.* 2006). Außerdem wurde eine Disulfidbindung zwischen den Cysteinen 167 und 183 als wichtig für die effiziente Bindung von Rituximab identifiziert (Ernst, *et al.* 2005; Du, *et al.* 2007). Die Disulfidbindung dient vermutlich nach der Aufrechterhaltung der Schleifen-Struktur und der Epitop-Konformation. Kürzlich durchgeführte kristallographische Studien ergaben, dass manche CD20-Antikörper Eigenschaften besitzen, die ihnen eine Bindung an die kleinere Schleife von CD20 ermöglichen (Du, *et al.* 2009). Bei der kleineren, extrazellulären Schleife von CD20 ragen nur wenige Aminosäuren aus der hydrophoben Membranoberfläche heraus. Ofatumumab, ein humaner CD20-Antikörper, nimmt eine spezielle Konformation an der Antigenbindungsstelle ein (Teeling, *et al.* 2006), die dazu

## Einleitung

---

führt, dass sich ein Ring aus hydrophoben Aminosäureresten am Rand der Bindungstasche formt und den Antikörper dazu befähigt, Wechselwirkungen mit der hydrophoben Membranoberfläche einzugehen. Dadurch kann Ofatumumab die kleine, extrazelluläre Schleife von CD20 binden. Wie die verwandten Antikörper 11B8 und 7D8, erkennt er außerdem ein diskontinuierliches Epitop von CD20 und zeigt auffallend langsame Dissoziationsraten (Teeling, *et al.* 2006).

Trotz des fehlenden Wissens über die Funktion von CD20 ist es ein viel untersuchtes und genutztes Antigen für die Therapie mit Antikörpern, da es auf der Mehrzahl von humanen B-Zell Lymphomen exprimiert (Anderson, *et al.* 1984; Cragg, *et al.* 2005) und nach Antikörperbindung nur ineffizient internalisiert wird (Press, *et al.* 1989; Johnson & Glennie 2003). Eine Vielzahl von CD20-Antikörpern wurde entwickelt und untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese Antikörper in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden können (Cragg & Glennie 2004). Typ I monoklonale Antikörper, wie Rituximab und Ofatumumab, induzieren eine Umverteilung von CD20 in noch größere *lipid rafts*. Dem gegenüber besitzen Typ II monoklonale Antikörper, wie Tositumomab und Obinutuzumab, diese Eigenschaft nicht.

Die Mehrzahl aller CD20-Antikörper sind vom Typ I. Die Ansammlung von CD20 mit gebundenen monoklonalen Antikörpern vergrößert vermutlich die Bindungsmöglichkeiten von C1q, ein Effekt, der die wirkungsvolle Vermittlung von CDC zur Folge hat (Cragg, *et al.* 2003). Durch starke Quervernetzung der gebundenen CD20-Antikörper vom Typ I mittels Sekundärantikörper kann *in vitro* außerdem Apoptose in den Zielzellen ausgelöst werden (Holder, *et al.* 1995; Shan, *et al.* 1998). Bei Typ II Antikörpern ist das Potential, CDC zu induzieren, eher gering. Sie sind stattdessen in der Lage, starke homotypische Adhäsion und Apoptose ohne Quervernetzung der Antikörper zu vermitteln (Chan, *et al.* 2003; Ivanov, *et al.* 2009). Für die Induktion von Apoptose existiert die Hypothese, dass von Typ I und Typ II Antikörpern zwei verschiedene Signalwege genutzt werden (Meijer & Codogno 2004). Vermutet wird, dass Typ I Antikörper eher klassische Apoptose vermitteln und Caspasen aktivieren, während der Zelltod bei Typ II Antikörpern Caspase-unabhängig und lysosomal ausgelöst wird. Beide Antikörper-Typen sind dagegen gleich potent bei der Induktion indirekter, FcR-vermittelter Effektormechanismen.

Obwohl das AXP-Motiv der größeren, extrazellulären Schleife von CD20 in die Bindung beider Antikörper-Typen involviert ist, sind bei gesättigten Konzentrationen doppelt so viele Typ I Moleküle auf einer B-Zelle gebunden wie Typ II Antikörper (Teeling, *et al.* 2004). Die Ergebnisse kürzlich durchgeführter Studien lassen den Schluss zu, dass sterische Wechselwirkungen die Ursache für die charakteristische 2:1 Bindungsstöchiometrie und die unterschiedlichen Wirkmechanismen sein könnten. Es wurde gezeigt, dass Typ II Antikörper vorwiegend an der carboxyterminalen Seite des AXP-

Motivs binden, während Antikörper vom Typ I die Bindung eher aminoterminal am Motiv haben (Abbildung 7; Niederfellner, *et al.* 2011). Dadurch werden Bindungen mit verschiedenen Orientierungen der Antikörper eingegangen, welche die Unterschiede in den Wirkweisen der Antikörper erklären könnten.

### 1.6 Limitierungen derzeitiger CD20-Antikörper (Rituximab)

Rituximab (Rituxan<sup>®</sup>, Roche) ist ein human-murin chimärer CD20-Antikörper, der 1997 für Rezidive oder schwer behandelbare, nieder-gradige oder folliculäre Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) zugelassen wurde. Als Typ I CD20-Antikörper ist Rituximab in der Lage sowohl CDC, als auch ADCC zu vermitteln (Beers, *et al.* 2010). Aufgrund der Erfolge wurde er zum Standard in der Behandlung von B-Zell Neoplasien, so dass heute der überwiegende Anteil an Patienten im Laufe ihrer Therapie Rituximab verabreicht bekommen. In der Monotherapie spricht allerdings nur ungefähr die Hälfte aller Patienten auf Rituximab an (McLaughlin, *et al.* 1998). Wird Rituximab in Kombination mit konventioneller Chemotherapie verabreicht (R-CHOP), sind die Ansprechraten deutlich höher. Zudem wird in vielen Fällen ein langfristiges Überleben beobachtet (Cheung, *et al.* 2007). Die zugelassene Dosis von Rituximab bei NHL beträgt wöchentlich viermal 375 mg/m<sup>2</sup> bei intravenöser Applikation (McLaughlin, *et al.* 1999) mit einer Serumretentionszeit von ca. 20 Tagen (Edwards & Cambridge 2005).

Rituximab und andere monoklonale CD20-Antikörper können über die Fc-Domäne Komplementfaktoren binden und CDC induzieren. Ob der Vermittlung von CDC bei der Behandlung von Patienten eine bedeutende Rolle zukommt, wird diskutiert (Lim, *et al.* 2009). Einige Studien zeigten, dass Inhibition des Komplementsystems die Wirkung von Antikörpern im Tiermodell erhöhen kann (Wang, *et al.* 2009). In anderen *in vivo* Studien wurde Komplement als entscheidender Mechanismus zur Tumoreliminierung gezeigt (Gong, *et al.* 2005; Golay, *et al.* 2006).

Fc-Domänen von monoklonalen Antikörpern können Wechselwirkungen mit FcR auf nicht zytotoxischen Zellen (zum Beispiel FcγRIIIa auf Thrombozyten), mit inhibitorischen FcR (FcγRIIb auf Makrophagen und Monozyten) und auch nicht aktivierenden FcR (FcγRIIIb auf Granulozyten) interagieren. Dies könnte die therapeutische Wirkung von monoklonalen Antikörpern reduzieren. So wurde gezeigt, dass ADCC in FcγRIIb-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen gesteigert war (Clynes, *et al.* 2000). Das Verhältnis der Affinitäten von Fc-Domänen zwischen aktivierenden und inhibitorischen FcγR (A:I Ratio) spielte hier eine entscheidende Rolle (Nimmerjahn & Ravetch 2005). In

## Einleitung

---

Untersuchungen von isolierten Lymphomzellen wurde beobachtet, dass eine Co-Expression von FcγRIIb und CD20 auf Tumorzellen zu einer Internalisierung von Rituximab führt (Lim, *et al.* 2011). Dadurch sinkt die Plasmaretentionszeit der Antikörper und die Zeitspanne zur Vermittlung von antitumoralen Mechanismen wird möglicherweise verkürzt.

Des Weiteren besteht zwischen therapeutischen Antikörpern und der großen Menge endogener IgG im Plasma der Patienten eine Konkurrenz um die Bindung an FcγR (Preithner, *et al.* 2006). Die Rekrutierung von Effektorzellen kann durch diesen Umstand in ihrer Effizienz beeinträchtigt werden.

Außerdem haben diverse FcγR-Polymorphismen Einfluss auf die therapeutische Wirkung von Antikörpern. Die Affinitäten von Fc-Domänen verschiedener IgG für die polymorphen Varianten von FcγRIIIa-V/F158 und FcγRIIa-H/R131 variieren. Immunglobuline haben höhere Affinität sowohl für FcγRIIa-H131 als auch für FcγRIIIa-V158 (Cartron, *et al.* 2002; Shashidharamurthy, *et al.* 2009). Die homozygote Expression der Alloform FcγRIIIa-V158 wird mit besserem, klinischen Ansprechen von Patienten auf Immuntherapien mit Rituximab assoziiert (Weng & Levy 2003).

Die Anforderungen an neue, therapeutische Moleküle sind, dass Limitierungen monoklonaler Antikörper, wie die Konkurrenz zu endogenem IgG um die Bindung an FcγR und der Einfluss von FcγR-Polymorphismen auf das therapeutische Potential, überwunden werden.

### 1.7 Optimierung CD20-gerichteter Therapien

Mit Antikörpern konnten beachtliche therapeutische Erfolge bei einer Anzahl verschiedener Krebserkrankungen erzielt werden. Daten verschiedener Tiermodelle deuten darauf hin, dass die Fähigkeit monoklonaler Antikörper, FcR-vermittelte Mechanismen zu induzieren, entscheidend für das therapeutische Potential dieser Moleküle ist (Nimmerjahn & Ravetch 2007). Allerdings kann die antitumorale Aktivität monoklonaler Antikörper durch Veränderungen in den Eigenschaften der Fc-Domäne beeinflusst werden, so dass zum Beispiel FcγR-Polymorphismen keinen Einfluss mehr auf die therapeutische Wirkung von Antikörpern haben würden.

Die Herausforderung an neue therapeutische Moleküle liegt darin, eine Erhöhung des klinischen Potentials durch Veränderung der Antikörper-Eigenschaften zu erreichen. Zur Optimierung ist deshalb der Vergleich zwischen bereits erprobten, monoklonalen Antikörpern und neu entwickelten Molekülen notwendig.



Bei CD20-Antikörpern hat die Selektion des Epitops eine entscheidende Rolle für die induzierten Wirkmechanismen von Antikörpern. Über Typ I Antikörper wird verstärkt CDC vermittelt, während Typ II CD20-Antikörper stärker Apoptose induzieren können (Cragg & Glennie 2004). Über die Wahl des Antikörper Isotyps kann ebenfalls Einfluss auf die vermittelten Effektormechanismen genommen werden. Die vier humanen IgG Klassen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz der C<sub>H</sub>2-Domäne und besitzen unterschiedliche Affinitäten zu aktivierenden und inhibitorischen FcγR (Burton 1985; Bruhns, *et al.* 2009). Zum Beispiel ist die Kapazität C1q zu binden um CDC zu vermitteln von IgG3 höher als von IgG1. IgG1 dagegen besitzt höheres Potential ADCC zu vermitteln (Dechant, *et al.* 2002). IgG2 und IgG4 zeigen geringe Induktion von Effektormechanismen.

### **1.7.1 Neue CD20-Antikörper mit Zulassung oder in klinischer Entwicklung**

Die mit Rituximab erzielten Erfolge und das zunehmende Wissen über Struktur und Funktion von CD20 haben zu einer Reihe neuer CD20-Antikörper mit veränderten Eigenschaften geführt (Tabelle 3). Um die Mechanismen von CD20-Antikörpern zu verstärken, wurden neue Strategien entwickelt. Zum Beispiel wurde der vollständig humane CD20-Antikörper Ofatumumab (Arzerra<sup>®</sup>, HuMax-CD20) im Mai 2011 für die Behandlung von refraktären CLL-Patienten zugelassen (Teeling, *et al.* 2004; Teeling, *et al.* 2006).

Ofatumumab erkennt spezifisch die kleine, extrazelluläre Schleife von CD20 und verfügt möglicherweise deshalb über potentere CDC-Aktivität als Rituximab. Die Gesamtansprechraten der Patienten konnten durch Monotherapie mit Ofatumumab von unter 25% bei herkömmlichen Therapieoptionen auf über 47% erhöht werden (Wierda, *et al.* 2010). Die empfohlene Dosis beträgt 300 mg für die erste Infusion und 2000 mg für alle nachfolgenden. Im wöchentlichen Abstand werden insgesamt 8 aufeinanderfolgende Infusionen verabreicht.

Y<sup>90</sup>-Ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>) und I<sup>131</sup>Tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>) sind zugelassene Radioimmunkonjugate, die starke antitumorale Aktivität zeigen (Witzig, *et al.* 2002; Kaminski, *et al.* 2005). Obwohl sie murinen Ursprungs sind, können beide in geringem Maße Fc-vermittelte Effekte induzieren. Mit beiden Antikörpern werden hohe Ansprechraten erreicht, weshalb sie mittlerweile ebenfalls Standard in der Behandlung von NHL als Monotherapie oder in Kombinationstherapie sind. Radioimmunkonjugate

## Einleitung

können jedoch schädlich sein, weil das hoch sensitive Knochenmark ständig der Strahlung ausgesetzt ist und es zur Störung der normalen Hämatopoiese kommen kann. Deshalb muss häufig im Anschluss an eine Radioimmuntherapie eine Stammzelltransplantation erfolgen. Mit einer Limitierung der verabreichten Dosis kann dieser Effekt reduziert werden, womit aber auch der therapeutische Effekt gemindert wird.

**Tabelle 3: Aktueller Status von CD20-Antikörpern und ihren Hauptwirkmechanismen**

Antikörper	Typ	Format	Mechanismus	Status
Rituximab	I	Chimärer IgG1	CDC, ADCC	Zul. 1997
Y <sup>90</sup> -Ibritumomab tiuxetan	I	Muriner IgG1	Vehikel für Radioisotop; ADCC ↓	Zul. 2002
I <sup>131</sup> Tositumomab	II	Muriner IgG2a	Vehikel für Radioisotop; CDC ↓	Zul. 2003
Ofatumumab	I	Humaner IgG1	ADCC ↑, CDC ↑	Zul. 2011
Obinutuzumab	II	Humanisierter IgG1	PCD ↑, ADCC ↑, CDC ↓	Phase III
Ocrelizumab	I	Humanisierter IgG1		Phase III
TRU-015	n. d.	SMIP	ADCC ↑, CDC ↓	Phase I/II
Veltuzumab	I	Humanisierter IgG1	CDC, ADCC	Phase I/II
AME-133v	I	Humanisierter IgG1	ADCC ↑, CDC; PCD	Phase I/II
PRO131921 humanisiert	I	IgG1	ADCC ↑, CDC ↑	Phase I/II

SMIP, *Small modular immunopharmaceutical*, humaner IgG1-Fc mit *Hinge*-Region an einen CD20-*single-chain fragment variable* (scFv) verknüpft; ↓ niedrig; ↑ hoch; n. d., nicht definiert; Zul., Zulassung.

### 1.7.2 Optimierung der Antikörper-Eigenschaften

Monoklonale Antikörper können mit verschiedenen Methoden in ihren Eigenschaften verändert werden. Mit der *Phage Display* Technologie können Veränderungen der Affinität und Avidität eines Antikörpers erreicht werden (Thie, *et al.* 2009). Eine auf diese Weise veränderte Variante von Rituximab mit verstärkter Avidität zu CD20 zeigte *in vivo* auch stärkere antitumorale Aktivität (Li, *et al.* 2009). Die Fc-Domäne von Antikörpern

kann ebenfalls mittels verschiedener Methoden verändert werden. Da Konformation und Struktur der Fc-Domäne entscheidend für die Bindung an Komplementfaktoren und FcγRs sind, hat eine Veränderung der Struktur Auswirkungen auf die Vermittlung von Effektormechanismen der Antikörper. *Glyco-Engineering* und *Protein-Engineering* haben sich als zwei effektive Methoden herausgestellt, um Effektormechanismen von Antikörpern gezielt zu beeinflussen. Wurde zum Beispiel Fukose vom Glykosylierungsprofil eines Antikörpers entfernt, steigerte sich die Bindung des Antikörpers an FcγRIIIa auf NK-Zellen und damit die Induktion von ADCC (Shields, *et al.* 2002). Auch mit *Protein-Engineering* kann die Vermittlung von ADCC verbessert werden. So zeigte ein Antikörper mit der Kombination von drei Mutationen in einer Fc-Domäne (S298A/E333A/K334A) verstärkte Bindung an FcγRIIIa und verringerte Affinität an den inhibitorischen FcγRIIb (Shields, *et al.* 2001).

### 1.8 Bispezifische Antikörper

Eine weitere Option zur Steigerung therapeutischer Effekte von Antikörper-Molekülen ist die Verwendung von bispezifischen Antikörpern. Bispezifische Antikörper vereinen zwei Bindungsspezifitäten in einem Molekül und bieten eventuell eine attraktive Möglichkeit, Antikörper-basierte Therapien zu verbessern (Müller & Kontermann 2007). Eine Bindungsstelle ist gegen eine Zielstruktur auf Tumorzellen gerichtet, während über eine zweite Bindungsstelle selektiv Rezeptoren bestimmter Effektorzellpopulationen gebunden werden können. Mit der Auswahl des Antigens auf Effektorzellen können zum Beispiel FcR-exprimierende Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen, aktiviert werden. Aber auch die Rekrutierung von zytotoxischen Zellen, wie T-Zellen, die keine FcR exprimieren, wird ermöglicht. T-Zellen sind attraktive Effektorzellen und können durch bispezifische Antikörper über Anvisieren der Antigene CD28 oder CD3 zur Tumoreliminierung aktiviert werden (Müller & Kontermann 2007).

Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern können bispezifische Antikörper einzelne Wirkmechanismen verstärkt induzieren und damit hohes zytotoxisches Potential erreichen. Mit der Wahl des erkannten Epitops könnten einige Limitierungen monoklonaler Antikörper überwunden werden. Bispezifische Antikörper könnten FcR auf Effektorzellen außerhalb der normalen Bindungsstelle von Antikörpern anvisieren, indem sie andere Epitope als das der Fc-Domäne von monoklonalen Antikörpern erkennen (Tamm & Schmidt 1996). Damit bestünde möglicherweise keine Konkurrenz zu endogenem Immunglobulin und die Effektivität von bispezifischen Antikörpern wäre

## Einleitung

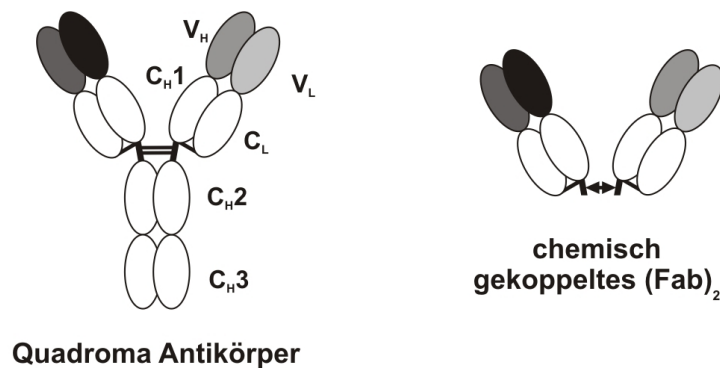
---

eventuell nicht von FcR-Polymorphismen beeinflusst, wie es bei monoklonalen Antikörpern der Fall sein kann. Gerade in Bezug auf den CD16a-Polymorphismus würden Patienten, die homozygot die ungünstige CD16a-F158 Variante besitzen, möglicherweise von der Verwendung bispezifischer Antikörper profitieren.

Da die Induktion von CDC kontrovers diskutiert wird, könnten bispezifische Antikörper so konstruiert werden, dass sie keine Komplementfaktoren binden und somit keine CDC vermitteln könnten. Einige Limitierungen konventioneller, Antikörper-basierter Therapien könnten mit bispezifischen Antikörpern überwunden werden.

### 1.8.1 Bispezifische Antikörper-Formate zur Rekrutierung von Effektorzellen

Bispezifische Antikörper zur Rekrutierung von Effektorzellen sind durch eine Vielzahl von Methoden und in verschiedenen Formaten konstruiert worden (Kellner 2011). Zu den ersten bispezifischen Antikörper-Formaten zählen so genannte Quadroma Antikörper oder chemische Konjugate von zwei Antikörpern oder zwei *fragment antigen binding*- (Fab-)Fragmenten (Abbildung 8; Milstein & Cuello 1983; Karpovsky, *et al.* 1984; Suresh, *et al.* 1986; Glennie, *et al.* 1987).



**Abbildung 8: Klassische Formate bispezifischer Antikörper.** Quadroma Antikörper werden durch die Fusion zweier Hybridome hergestellt und verleihen dem Molekül zwei verschiedene Spezifitäten. Bispezifische (Fab)<sub>2</sub>-Konjugate entstehen durch chemische Kopplung. V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>, variable Regionen der leichten/schweren Kette; C<sub>H</sub>1-3, konstante Regionen 1-3 der schweren Kette; C<sub>L</sub>, konstante Region der leichten Kette; Fab, *fragment antigen binding*. Abgewandelt nach Kellner, *et al.* 2011.

Die Herstellung klassischer, chemisch gekoppelter Fab-Fragmente war aufwendig und teuer. Obwohl diese Moleküle in ersten, klinischen Studien erfolgversprechende

Ergebnisse lieferten, waren weitere Untersuchung durch die geringe Verfügbarkeit limitiert (Valone, *et al.* 1995; Curnow 1997; Hartmann, *et al.* 1997; Posey, *et al.* 1999; James, *et al.* 2001; Borchmann, *et al.* 2002). Mittlerweile wurden die Technologien optimiert, so dass in den Herstellungsprozessen eine Verbesserung der Qualität und der Ausbeute möglich ist (Ellerman 2011).

Quadroma Antikörper werden durch die Fusion zweier Hybridome (Hybrid-Hybridom-Technologie) hergestellt. Obwohl diese Methode gut etabliert ist, wird die Produktivität durch mangelnde Qualität und Quantität limitiert. Auch wenn Daten aus klinischen Studien den Quadroma Antikörpern zytotoxisches Potential zuschreiben, wurde das Auftreten schwerer Nebenwirkungen beobachtet (Segal, *et al.* 1999). Es kam zu Zytokin-Freisetzungssyndrom und systemischen Aktivierungen von Effektorzellen. Außerdem konnte in Patienten häufig die Produktion neutralisierender HAMAs und humane Anti-Bispezifische-Antikörper (HABAs) als Reaktion auf die Behandlung beobachtet werden.

Durch die Optimierung der klassischen Quadroma Technik wurde die Produktion von so genannten Triomabs ermöglicht, die sich aus einer Kombination von Maus IgG2a und Ratte IgG2b zusammensetzen (Lindhofer, *et al.* 1995). Die Steigerung der Produktivität wird durch die Präferenz der Spezies-spezifischen Paarung der leichten und schweren Ketten gewährleistet, während die Verteilung von Maus-Maus-, Ratte-Ratte- bzw. Maus-Ratte-Antikörperkombinationen zufällig stattfindet. Interessanterweise wurde mit dem resultierenden, hybriden Fc-Teil der Triomabs bereits eine Limitierung von monoklonalen Antikörpern überwunden, da das Hybrid effizient mit aktivierenden humanen FcγR (CD64, CD16) und nicht mit inhibitorischem FcγRIIb interagiert (Zeidler, *et al.* 1999; Zeidler, *et al.* 2000). Catumaxomab, ein gegen EpCAM-(CD326-) und CD3-gerichteter Triomab, ist der erste, zugelassene bispezifische Antikörper (April 2009) und kann zur Behandlung von malignem Aszites bei Patienten mit EpCAM-positiven Karzinomen eingesetzt werden, wenn die Standardtherapien nicht anschlagen (Seimetz, *et al.* 2010). EpCAM ist eine attraktive Zielstruktur für die Tumorthherapie, weil es auf verschiedenen, humanen Karzinomen und auf Krebsstammzellen einiger Tumorentitäten exprimiert wird (Munz, *et al.* 2009). Über CD3 kann Catumaxomab humane T-Zellen rekrutieren, aber auch dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen werden über den hybriden Fc-Teil aktiviert (Zeidler, *et al.* 1999; Zeidler, *et al.* 2000). Der Antikörper zeigte in klinischen Studien signifikante Verbesserung des punktierungsfreien Überlebens der Patienten. Zudem beeinflussten die im Großteil der Patienten gebildeten HAMAs und HARAs die Effektivität von Catumaxomab nicht (Borges, *et al.* 2007; Parsons, *et al.* 2009). Weitere Triomabs gegen Her2 (Ertumaxomab) und gegen CD20 (Bi20) werden in klinischen Studien getestet (Kiewe, *et al.* 2006; Buhmann, *et al.* 2009). Die Problematik von Triomabs liegt im Auftreten des Zytokin-Freisetzungssyndrom in Patienten, auch bei der

## Einleitung

---

intraperitonealen Applikation des Moleküls (Seimetz, *et al.* 2010). Um systemische, antitumorale Aktivität zu zeigen, müssen im Vergleich zu einer intravenösen Applikation bei einer intraperitonealen Applikation höhere Dosen des Antikörpers verabreicht werden.

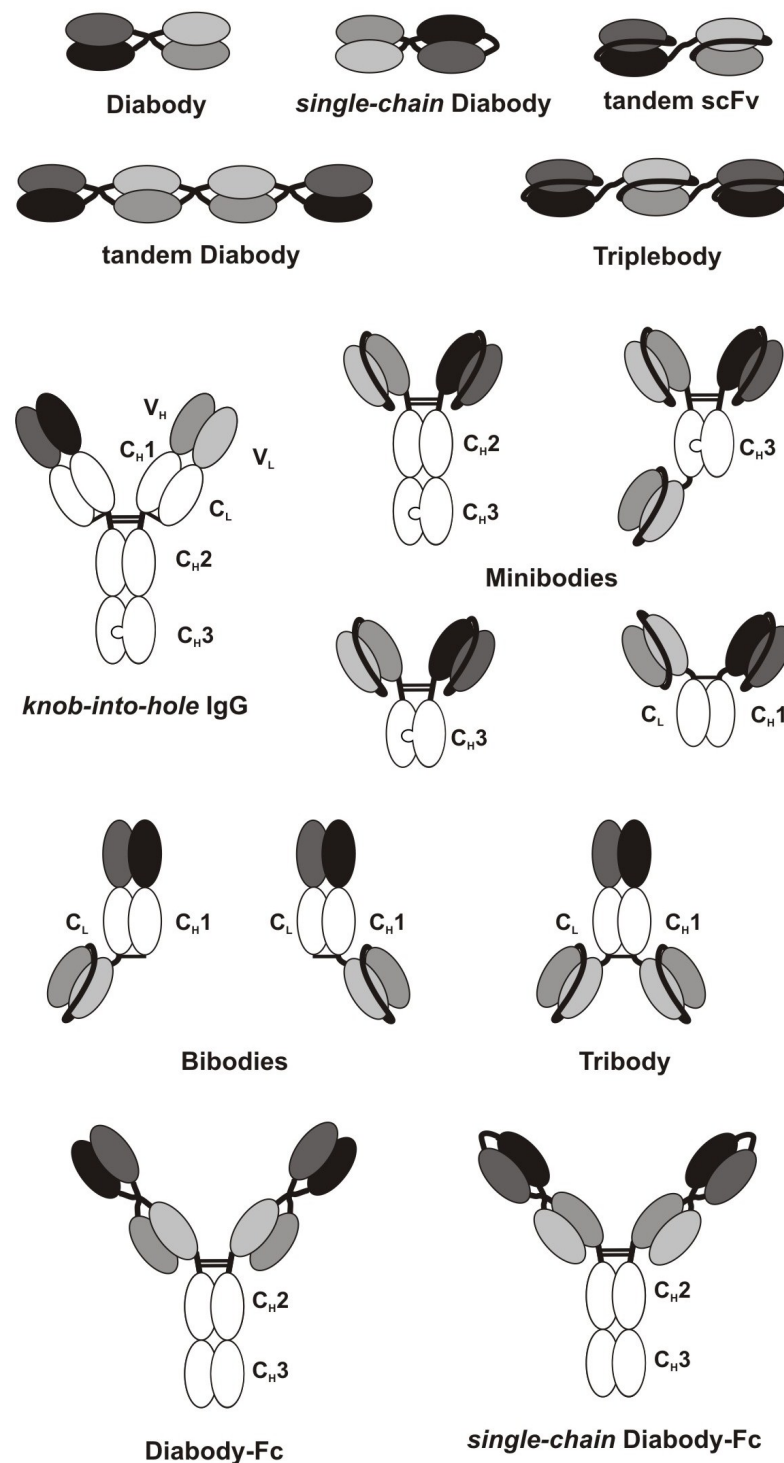
Mit der Entwicklung neuer Technologien erweiterte sich die Format-Vielfalt von bispezifischen Antikörpern (Abbildung 9). Vor allem die Herstellung von *single-chain fragment variable* (scFv) hat die Möglichkeiten deutlich vergrößert (Bird, *et al.* 1988). Ein scFv hat eine molekulare Masse von ca. 25 kDa und bezeichnet die genetische Fusion der schweren und der leichten variablen Domäne eines Antikörpers über eine flexible Peptidverknüpfung.

Rekombinante, bispezifische Antikörper-Formate mit geringer, molekularer Masse bestehen aus zwei scFvs, die auf einer Polypeptidkette liegen können oder Dimere aus zwei Polypeptiden darstellen, wie zum Beispiel tandem scFvs, Diabodies und *single-chain* Diabodies (Holliger, *et al.* 1993; Gruber, *et al.* 1994; Hayden, *et al.* 1994; Mack, *et al.* 1995; Johnson, *et al.* 2010). Abhängig von der Länge und der Sequenz der Peptidverknüpfung wird die Ausbildung eines bestimmten Formats erzwungen. Zahlreiche präklinische Studien demonstrierten das antitumorale Potential dieser Antikörper-Formate (Fischer & Leger 2007; Müller & Kontermann 2007; Kellner 2011). Aufgrund ihrer geringen molekularen Masse von ca. 55 kDa und dem fehlenden Fc-Teil sind diese Moleküle möglicherweise gewebeängiger als monoklonale Antikörper oder Quadroma Antikörper. Allerdings interagieren sie deshalb auch nicht mit dem neonatalen FcR und haben Plasmaretentionszeiten von wenigen Stunden (Kipriyanov, *et al.* 1999).

Ein bestimmter Typ von tandem scFvs, die CD3-spezifischen, *bispecific T cell engager* (BiTE), können T-Zellen über CD3 unabhängig von zusätzlichen Stimuli aktivieren und zeigten *in vitro* und *in vivo* hohe antitumorale Aktivität (Wolf, *et al.* 2005). Verschiedene BiTEs befinden sich zurzeit in klinischen Studien. Mit Blinatumumab, einem [CD19xCD3] BiTE Antikörper, wurden vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von NHL- und ALL-Patienten erreicht (Bargou, *et al.* 2008; Topp, *et al.* 2011). Der geringen Serumretentionszeit von nur  $5,3 \pm 0,4$  h wird mit einer Dauerinfusion von 4-8 Wochen entgegengewirkt (Schlereth, *et al.* 2005).

Durch Erweiterung von tandem scFvs zu Triplebodies (sctb) oder von Diabodies zu tandem Diabodies können bispezifische Antikörper konstruiert werden, die den Vorteil besitzen, dass sie bivalent Antigene auf Tumorzellen bzw. für tandem Diabodies auch bivalent Effektorzellen anvisieren können. *In vitro* Daten eines [CD19xCD16xCD19] sctb zeigten bereits, dass ein doppeltes Anvisieren auf Tumorzellseite einen Gewinn für die Effektivität gegenüber einem tandem scFv mit gleichen Spezifitäten bringt (Kellner, *et al.* 2008). Außerdem besteht bei diesen bispezifischen Antikörper-Formaten die Möglichkeit,

drei unterschiedliche Spezifitäten miteinander zu kombinieren und somit einen weiteren Tumorzellmarker für eine höhere Selektivität hinzuzufügen (Kügler, *et al.* 2010).



**Abbildung 9: Beispiele für rekombinante, bispezifische Antikörper zur Rekrutierung von Effektorzellen.** scFv, *single-chain fragment variable*; V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>, variable Regionen der leichten/schweren Kette jeweils als Paar in schwarz/dunkelgrau oder in grau/hellgrau mit unterschiedlichen Spezifitäten; C<sub>H</sub>1-3, konstante Regionen 1-3 der schweren Kette; C<sub>L</sub>, konstante Region der leichten Kette; Fc, *Fragment crystalizable*. Abgewandelt nach Kellner, *et al.* 2011.

Zusätzliche bispezifische Antikörper-Formate bieten sich durch diverse Möglichkeiten von Dimerisierungsdomänen. Unter dem Begriff Minibody sind alle Konstrukte zusammengefasst, bei denen ein oder mehrere scFv an Fc- oder C<sub>H</sub>3-Domänen fusioniert wurden (Shahied, *et al.* 2004; Xie, *et al.* 2005). Eine Strategie zur effizienten Produktion heterodimerer Moleküle ist die Insertion von *knobs-into-holes* Strukturen in Fc- oder C<sub>H</sub>3-Domänen (Ridgway, *et al.* 1996; Atwell, *et al.* 1997; Merchant, *et al.* 1998). Die Fusionsproteine Fab-scFv sind so genannte bispezifische Bibodies (Schoonjans, *et al.* 2000; Lu, *et al.* 2002). Durch Erweiterung dieser Formate um ein scFv werden Tribodies konstruiert (Schoonjans, *et al.* 2001). Tetravalente bispezifische Formate mit jeweils zwei Bindestellen für beide Antigene sind an ganze Immunglobuline oder Fab<sub>2</sub>-Fragmente fusionierte scFv (Coloma & Morrison 1997).

Die Format-Vielfalt von bispezifischen Antikörpern bietet viele Möglichkeiten vorteilhafte Moleküleigenschaften miteinander zu kombinieren um Antikörper-basierte Immuntherapien möglicherweise zu verbessern.

### 1.8.2 Bispezifische Antikörper im Tribody-Format

Tribodies sind bispezifische Antikörper, die durch Fusion von zwei scFv an Fab-Fragmente konstruiert werden (Abbildung 9). Abhängig von den unterschiedlichen Spezifitäten sind diese trivalenten Moleküle bispezifisch oder trispezifisch. Die Art der Konstruktion von Tribodies liefert in eukaryotischen Expressionssystemen effizient heterodimere Moleküle, die bis über 90% des gereinigten, rekombinanten Antikörper-Derivats ausmachen (Schoonjans, *et al.* 2001). In Vergleichen mit anderen bispezifischen Antikörper-Formaten wurde hohes zytotoxisches Potential beobachtet, wenn eine Valenz zur Rekrutierung von Effektorzellen dient, während mit den beiden anderen Valenzen Tumorzellen doppelt über die gleiche Antigen-spezifität oder zwei verschiedene Antigen-spezifitäten anvisiert werden (Shahied, *et al.* 2004; Kellner, *et al.* 2008; Kügler, *et al.* 2010).

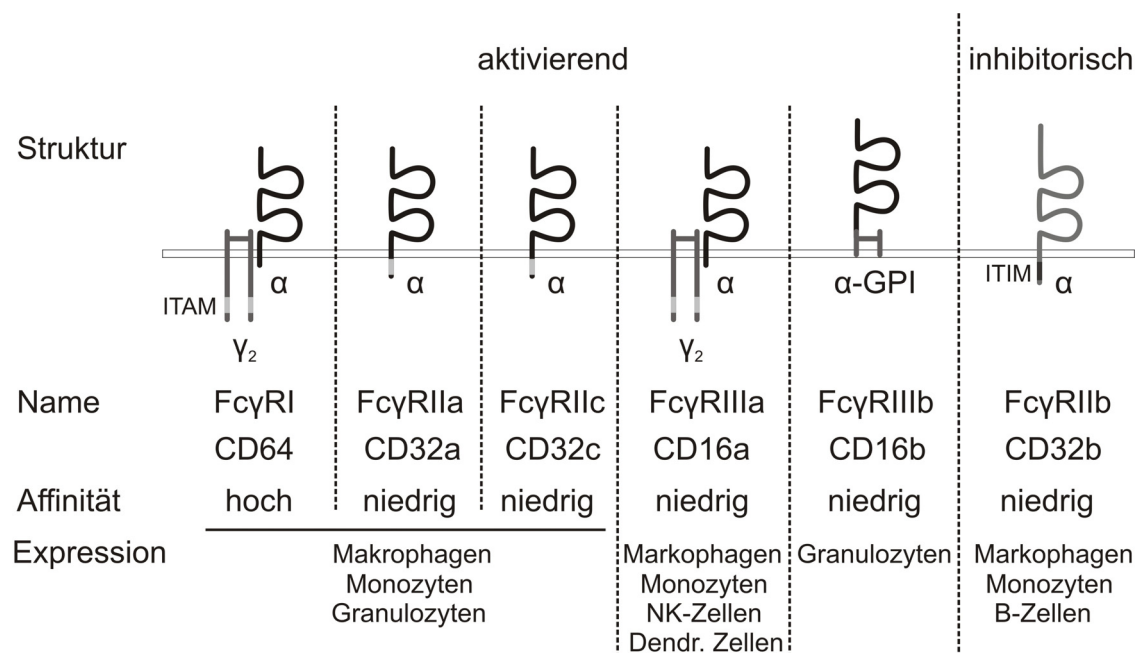
Tribodies besitzen mit ihrer intermediären Molekülmasse von ca. 110 kDa potentiell eine bessere Pharmakokinetik als bispezifische scFvs mit geringer, molekularer Masse von 55 kDa, die schnell aus dem Körper ausgeschieden werden, und sind trotzdem gewebebegängiger als vollständige, monoklonale Antikörper (Nugent & Jain 1984; Pluen, *et al.* 2001; Mertens 2011). Im Vergleich zu bispezifischen Antikörpern im Diabody- oder tandem scFv-Format könnten Tribodies durch ein Fab-Fragment, das vom gleichen



parentalen Antikörper abgeleitet wurde, wahrscheinlich eine höhere Affinität zum gewählten Antigen und damit verbunden eine höhere Zytotoxizität zeigen (Bird & Walker 1991; Quintero-Hernandez, *et al.* 2007).

### 1.9 Fcγ-Rezeptoren als *Trigger*-Molekül auf Effektorzellen

Ein wichtiger Mechanismus, durch welche IgG Antikörper das zelluläre Immunsystem rekrutieren können, ist die Interaktion zwischen Fc-Domäne und FcγR (Nimmerjahn & Ravetch 2007). Die humane FcγR-Familie setzt sich aus sechs bekannten FcγR in drei Klassen zusammen, die unterschiedliche Expressionsmuster auf hämatologischen Zellen zeigen (Abbildung 10). Während FcγRI starke Affinität zu konstanten Regionen von IgG1 und IgG3 zeigt, besitzen FcγRII und FcγRIII im Vergleich dazu niedrige Affinität für Fc-Domänen von IgG, aber mit einem breiteren Isotypen-Bindungsmuster (Bruhns, *et al.* 2009).



**Abbildung 10: Die humane Fcγ-Rezeptor Familie.** Die Fc-Rezeptoren für IgG (FcγR) können funktionell und aufgrund ihrer Affinitäten zu IgG unterschieden werden. Während die aktivierenden Rezeptoren entweder intrazellulär ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) besitzen oder mit ITAM-tragenden Dimeren der γ-Kette assoziiert sind, findet man bei dem einzigen inhibitorischen FcγR (FcγRIIb) ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes, inhibitorisches Motiv (ITIM). Die Ausnahme ist der aktivierende FcγRIIIb, welcher über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert ist und keine intrazelluläre Domäne besitzt. Dendr. Zellen, dendritische Zellen. Abgewandelt nach Nimmerjahn & Ravetch 2008.

## Einleitung

---

Funktionell können die FcγR in aktivierende und inhibitorische Rezeptoren unterteilt werden. FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a) und FcγRIIIa (CD16a) vermitteln Zellaktivierung durch ein intrazelluläres, Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM). Der inhibitorische Rezeptor FcγRIIb (CD32b) besitzt zytoplasmatisch entsprechend ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes, inhibitorisches Motiv (ITIM) (Ravetch & Lanier 2000). Mit einer Ausnahme, den NK-Zellen, liegt die Eigenschaft des FcγR-Systems darin, dass sowohl aktivierende und inhibitorische Rezeptoren auf einer Zelle co-exprimiert werden, und somit der Aktivierungszustand einer Zelle davon abhängt, welche funktionellen FcγR stärker von IgG angesprochen werden (Kalergis & Ravetch 2002; Nimmerjahn & Ravetch 2006).

CD64 und CD16 wurden auf ihr Potential als mögliche *Trigger*-Moleküle in der Antikörpertherapie in mehreren Studien untersucht (Curnow 1997; Deo, *et al.* 1997). Effektorzellen, die zur Tumoreliminierung über den hoch affinen CD64, sowie den niedrig affinen CD16 aktiviert werden können, sind Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen.

### 1.9.1 Der Fcγ-Rezeptor IIIa (CD16a) als *Trigger*-Molekül

FcγRIII (CD16) ist ein niedrig affiner Rezeptor für die Fc-Region von IgG Molekülen und wird auf Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und Untergruppen von Monozyten exprimiert (Abbildung 10). Extrazellulär weist CD16 eine Immunglobulin-ähnliche Domäne von 190 Aminosäuren auf, die sich in zwei stark glykosylierte C2-Domänen faltet, die wiederum jeweils eine Disulfidbrücke enthalten (Sondermann, *et al.* 2000). Durch das heterogene Glykosylierungsmuster kann FcγRIII eine molekulare Masse im Bereich von 50 bis 80 kDa besitzen (Ravetch & Perussia 1989). CD16 bindet IgG in Form von Immunkomplexen mit einer höheren Affinität für IgG1 und IgG3 und geringer Affinität von IgG4 und IgG2 (Gessner, *et al.* 1998; Bruhns, *et al.* 2009). Im Menschen kodieren zwei separate Gene auf Chromosom 1 q23-24 für FcγRIII, welche eine hohe gemeinsame Sequenzidentität von 97% besitzen (Ravetch & Perussia 1989; Gessner, *et al.* 1995). FcγRIIIa (CD16a) und FcγRIIIb (CD16b) zeigen in nur sechs Aminosäuren Unterschiede in ihrer Sequenz, die für individuelle, post-translationale Modifikationen, wie N-Glykosylierung und Membranverankerung, verantwortlich sind (Abbildung 10; Kurosaki & Ravetch 1989; Gessner, *et al.* 1998). Das Vorhandensein der Aminosäure Serin an Position 185 bei FcγRIIIb ist essentiell für die Anheftung eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Ankers auf Granulozyten. Durch Kreuzvernetzung

von CD16b werden Granulozyten zur Phagozytose aktiviert (Hundt & Schmidt 1992). FcγRIIIa wird auf NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Untergruppen von Monozyten exprimiert (Huizinga, *et al.* 1988; Ravetch & Perussia 1989). Die transmembranständige Isoform des Rezeptors, FcγRIIIa, die zytoplasmatisch ein 25 Aminosäure langes Ende besitzt, resultiert aus der Aminosäure Phenylalanin an Position 185. CD16a ist über den zytoplasmatischen Teil nicht-kovalent mit Homo- oder Heterodimeren der FcεRI γ-Kette oder der TCRζ-Kette assoziiert (Hibbs, *et al.* 1989; Lanier, *et al.* 1989), die ein ITAM tragen (Deo, *et al.* 1997). Bei Bindung von Immunkomplexen an CD16a spielt die Assoziation mit den Dimeren eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion und damit bei der Aktivierung der Effektorzellen. Die Aktivierung der Zellen führt zur Freisetzung von Zytokinen und zur Vermittlung von Phagozytose und/oder zellulärer Zytotoxizität.

Verschiedene Polymorphismen von humanem FcγRIII wurden beschrieben, die die Bindung von IgG beeinflussen. Auf Granulozyten werden zwei allele Formen von CD16b, CD16b-*neutrophil antigen*(NA)1 und CD16b-NA2, co-dominant exprimiert. Sie unterscheiden sich in vier Aminosäuren in der Membran-distalen Immunglobulin-Domäne (de Haas, *et al.* 1995). Die homozygote Expression der NA2 Variante ist mit geringerem phagozytischem Potential über FcγRIIIb verbunden als die homozygote Expression von NA1 (Salmon, *et al.* 1990).

Für FcγRIIIa sind auf NK-Zellen und Makrophagen zwei verschiedene Polymorphismen beschrieben (Koene, *et al.* 1997; Wu, *et al.* 1997). In der Membran-distalen Immunglobulin-Domäne befindet sich an Position 48 entweder die Aminosäure Leuzin, Arginin oder Histidin (Triallelismus). An Position 158 in der Membran-proximalen Immunglobulin-Domäne nahe der Ligandenbindungsstelle liegt entweder die Aminosäure Phenylalanin (F) oder Valin (V) vor. Verglichen mit der Variante FcγRIIIa-F158, bindet die Alloform FcγRIIIa-V158, unabhängig der Aminosäure an Position 48, IgG1 und IgG3 mit höherer Affinität (Koene, *et al.* 1997). Diese Differenzen haben auch klinische Auswirkungen. So beeinflusst der V/F158-Polymorphismus die therapeutische Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern wie Rituximab und Trastuzumab (Weng & Levy 2003; Musolino, *et al.* 2008). Die V158-Alloform wird dabei mit besserem Ansprechen und verlängerten Überlebensraten in Verbindung gebracht. *In vitro* Studien belegen, dass die niedrigere Affinität von Rituximab zu CD16a-F/F158 im Vergleich zu CD16a-V/V158 in direktem Zusammenhang mit Makrophagen- und NK-Zell Aktivierung und der Induktion von ADCC durch den Antikörper stehen (Cartron, *et al.* 2002).

### 1.9.2 NK-Zellen als Effektorzellen in der antitumoralen Therapie

NK-Zellen machen ca. 10 bis 15 % der peripheren, mononukleären Zellen aus. Sie sind aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber von Erregern befallenen oder entarteten Zellen für die Funktion des Immunsystems besonders wichtig (Trinchieri 1989). NK-Zellen exprimieren verschiedene inhibitorische und aktivierende Rezeptoren. Die aktuelle Hypothese der Regulation von NK-Zellen besagt, dass das Netto-Gleichgewicht von aktivierenden und inhibitorischen Signalen, welches aus Interaktionen mit Zielzellen über aktivierende und inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen resultiert, bestimmt, ob NK-Zellen aktiviert werden. Die Aktivierung führt zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Interferon- $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) und / oder zur Lyse von Zielzellen (Lanier 2005).

Über die inhibitorischen Rezeptoren, wie zum Beispiel Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) (Colonna & Samaridis 1995; Wagtmann, *et al.* 1995), erkennen NK-Zellen HLA Klasse I Moleküle auf körpereigenen Zellen. Dadurch werden inhibitorische Signale erzeugt, welche die Aktivierung von NK-Zellen verhindern. Zellen, die kein oder wenig körpereigenes HLA Klasse I exprimieren, erzeugen keine bzw. nur wenige inhibitorische Signale und sind deshalb sensitiv für NK-Zell Zytotoxizität (*missing self*-Hypothese; Ljunggren & Karre 1990).

Neben inhibitorischen Rezeptoren exprimieren NK-Zellen verschiedene aktivierende Rezeptoren. Beispiele dafür sind *natural-killer group 2 member D* (NKG2D) und *natural cytotoxicity receptors* (NCRs), die ebenfalls eine Rolle bei der NK-Zell Regulation spielen (Moretta, *et al.* 2001; Lanier 2005). Durch Bindung der auf Tumorzellen exprimierten Liganden, können diese in manchen Fällen für eine Aktivierung von NK-Zellen ausreichen, obwohl gleichzeitig inhibitorische Signale durch das körpereigene HLA Klasse I Molekül erzeugt werden. Beispiele für Liganden sind die HLA Klasse I ähnlichen Moleküle (*MHC class-I-chain-related protein*, MIC-A, MIC-B, *UL16-binding protein*- (ULBP-) Moleküle). Beide sind Liganden für NKG2D (Bauer, *et al.* 1999; Cosman, *et al.* 2001; Steinle, *et al.* 2001). Ihre Expression wird durch Zellstress sowie virale und bakterielle Infektion induziert und ist mit einer malignen Transformation von Zellen assoziiert (Groh, *et al.* 1999; Groh, *et al.* 2001; Raulet 2003; Gasser, *et al.* 2005).

Bei der Verwendung von bispezifischen Antikörpern hat sich CD16 bisher als geeignetes *Trigger*-Molekül zur Rekrutierung von Effektorzellen gezeigt. Daten aus *in vitro* Studien für bispezifische [EGFRxCD16] und [Her2xCD16] Antikörper wurden Tumorzellen effizient lysiert (Stockmeyer, *et al.* 1997; Elsasser, *et al.* 1999). In einem Tumor-Maus-Modell zeigte ein [Her2xCD16]-gerichteter Tribody therapeutische Aktivität (Lu, *et al.* 2008). Trotz *in vitro* und *in vivo* Analysen wurde noch kein bispezifischer CD16-

gerichteter Antikörper zugelassen. Mit dem [Her2xCD16] Quadroma Antikörper (2B1) konnte in Phase I Studien nur geringes, klinisches Ansprechen in einzelnen Patienten beobachtet werden (Weiner, *et al.* 1993; Weiner, *et al.* 1993; Borghaei, *et al.* 2007).

NK-Zellen eignen sich aufgrund ihres hohen, zytotoxischen Potentials gut als Effektorzellen in der antitumoralen Therapie. Bisher wurden rekombinante, bispezifische CD16-Antikörper nicht in klinischen Studien getestet. Mit den neuen Formaten bispezifischer Antikörper wäre eine verstärkte Aktivierung von NK-Zellen *in vivo* eventuell möglich.

### 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher entwickelten CD20-Antikörper haben die Therapien von Leukämie- und Lymphompatienten erheblich verbessert (Cheung, *et al.* 2007). Trotzdem sprechen nicht alle Patienten auf eine Behandlung an, und es zeigen sich Rezidive oder Resistenzen. Die Verwendung bispezifischer Antikörper stellt möglicherweise eine vielversprechende Weiterentwicklung von Antikörper-basierten Immuntherapien dar, weil über diese Moleküle zelluläre Zytotoxizität oder Phagozytose verstärkt induziert werden können.

In dieser Arbeit sollten die Effektormechanismen und das zytotoxische Potential eines rekombinanten, bispezifischen CD20-Antikörpers im Tribody-Format im Vergleich zu einem monoklonalen CD20-Antikörper analysiert werden. Das Anvisieren der Zielzellen sollte dabei bivalent über CD20 erfolgen, während Effektorzellen über eine Spezifität des Tribodies für CD16 rekrutiert werden sollten. Grundlegende Hypothese war, dass ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteter Tribody über die selektive Rekrutierung CD16-positiver Effektorzellen effektiver Zielzellen lysieren kann, als monoklonale Antikörper, die mehrere Wirkmechanismen induzieren können.

Im Einzelnen sollte analysiert werden, ob die Vermittlung von ADCC ausreichend ist, um effektiv antitumorale Effekte zu erzielen, oder ob es von Vorteil für das therapeutische Potential eines Antikörpers ist, wenn das Molekül eine Kombination von CDC, Proliferationsinhibition und ADCC als Wirkmechanismen vermitteln kann. Das Arbeitsprogramm umfasste die Herstellung eines bispezifischen Antikörpers im Tribody-Format, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], und die funktionelle Charakterisierung des Moleküls. Besondere Beachtung sollte dabei das Potential des Tribodies in Bezug auf die Vermittlung von ADCC sowohl mit Tumorzelllinien als auch mit isolierten Tumorzellen gelegt werden. Analog konstruierte Tribody-Moleküle, [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] bzw. [(CD20)<sub>2</sub>xCD89], sollten als Kontrollen dienen.

## Einleitung

---

Des Weiteren sollte ein Vergleich des neu entwickelten Tribodies mit dem konventionellen, monoklonalen Antikörper Rituximab und dem parentalen 7D8-IgG1 *in vitro* angestellt werden. Hier sollte außerdem untersucht werden, welchen Einfluss der FcγRIIIa-V/F158 Polymorphismus auf die Vermittlung von ADCC durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab in Vergleich hat.

Ferner sollte der Einfluss des CD16-Epitops auf das zytotoxische Potential des Tribodies analysiert werden. Dazu sollte ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-gerichteter Tribody hergestellt werden, um in vergleichenden Untersuchungen mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] die Frage zu klären, ob die Rekrutierung von CD16b-positiven Effektorzellen die Vermittlung von ADCC beeinträchtigt oder ob eine selektive Rekrutierung von CD16a-positiven Effektorzellen für eine effektive Tumorzelllyse ausreichend und von Vorteil sein könnte.

Letztendlich sollten mit Analysen im Tiermodell erste Anhaltspunkte für die *in vivo* Aktivität des Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] gewonnen werden. Dazu sollten B-Zell Depletionsanalysen in Mäusen mit rekonstruiertem, humanem Immunsystem durchgeführt werden. Um weitere *in vivo* Studien mit dem rekombinanten, bispezifischen [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zukünftig durchführen zu können, sollten zudem die Grundlagen zur Etablierung eines xeno-transplantierten Mausmodells geschaffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
100 Bp-DNA Leiter EXTENDED	Carl Roth GmbH
2,2'-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolinsulonat (6)] Diammoniumsalz (ABTS)	Roche, Grenzach-Wyhlen
2x YT Agar	Carl Roth GmbH
2x YT Medium	Carl Roth GmbH
6x Gelladepuffer (für DNA-Proben)	Carl Roth GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Aceton	J.T. Baker, Griesheim
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Merck KGaA, Darmstadt
Agar-Agar	Carl Roth GmbH
Agarose	Bio-Rad, München
Akutase	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Merck KGaA
CaptureSelect® Fab Kappa Affinitätsmatrix	BAC BV, Naarden, Niederlande
CaptureSelect® Fab Lambda Affinitätsmatrix	BAC BV
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Di-Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH
Ethanol	Merck KGaA
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA
Geneticin (G418 Sulfat)	Invitrogen
Glyzerin	Merck KGaA
Glyzin	Carl Roth GmbH
Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)	CellGenix, Freiburg

## Material und Methoden

---

Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Heparin	Ratiopharm GmbH, Ulm
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH
Hexadimethrinbromid	Sigma-Aldrich
Hygromycin B	Invitrogen
Imidazol	Carl Roth GmbH
Intratect	Biotest, Dreieich
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH
Lepirudin (Refludan®)	Celgene GmbH, München
Lipofectamine™ LTX Reagenz	Invitrogen
Magermilchpulver (MMP)	Bio-Rad
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH
Methotrexathydrat (MTX)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Merck KGaA
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen
OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Groningen, Niederlande
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin /Streptomycin	Invitrogen
Percoll	Biochrom AG, Berlin
PLUS™ Reagenz	Invitrogen
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio-Rad
Puromycin	Invitrogen
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Merck KGaA
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH
Tween 20	Merck KGaA
Quick Start™ Bradford Dye Reagenz	Bio-Rad



## 2.1.2 Allgemeine Puffer, Lösungen und Medien

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x HBS	50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,05
5x Probenpuffer (für Proteine, reduzierend)	313 mM Tris, 10% w/v SDS, 0,05% w/v Bromphenolblau, 50% v/v Glycerin, 0,5 M DTT
Bindepuffer (α-hu-kappa/lambda)	1x PBS, pH 7,5
Bindepuffer (6x His-Markierungen)	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer (α-hu-kappa/lambda)	0,1 M Glyzin, pH 2,0
Elutionspuffer (6x His-Markierung)	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% w/v SDS, pH 8,3
PBA	1x PBS, 5% w/v BSA
SOC Medium	2% w/v Trypton, 0,5% w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glukose
TAE Laufpuffer (50x)	2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 mM Eisessig, pH 8,0
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 100 mM Tris, pH 7,6
TBS-T	TBS (1x), 0,1% v/v Tween 20
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% v/v Methanol, pH 8,3

## 2.1.3 Vektoren

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Vektoren**

Vektor	Hersteller
pSecTag2/Hygro C	Invitrogen
pTurboFP635-C	Evrogen Joint Stock Company, Moskau, Russland
pLVX-Puro	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

## Material und Methoden

---

### 2.1.4 Enzyme

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>AfeI</i>	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>EcoNI</i>	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
<i>NheI</i>	New England Biolabs
<i>NdeI</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>SfiI</i>	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	New England Biolabs
T4-Ligase	Roche

### 2.1.5 Kits

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
<i>Experion™ Pro260 Reagents and Supplies + Pro260 Chips</i>	Bio-Rad
<i>NK-cell isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec GmbH
<i>NucleoBond® Xtra Maxi</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
<i>NucleoSpin® Plasmid Quick Pure</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
<i>SuperSignal® West Dura Extended Duration Chemiluminescent</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>VersaLyse™ lysing solution plus IOTest 3 fixative solution</i>	Beckman Coulter

### 2.1.6 Oligonukleotide

Für Sequenzierreaktionen wurden folgende Oligonukleotide (Primer) verwendet, welche von Sigma-Aldrich (München) synthetisiert wurden.

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide**

Primer	Sequenz	Orientierung
p1 Katushka	TTAAAGAAATTGTATTTGTTAAATATGTA CTAC	Forward
p2 Katushka	TTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGAC	Forward
p3 Katushka	CTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACC	Forward
p4 Katushka	CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG	Forward
p5 Katushka	GAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGAC	Forward
p6 Katushka	ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC	Forward
p7 Katushka	GCCTCGCACACATTCCACATCCACC	Forward
p8 Katushka	TCGCCGCCGCGTTCGCCGACTACCC	Forward
p9 Katushka	GCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCC	Forward
p10 Katushka	TGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC	Forward
p11 Katushka	GTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAG	Forward
p12 Katushka	TCTACCTTATCTGGCTCAACTGGTACTAGC	Reverse
p13 Katushka	AGGACGTCCCGCGCAGAATCCAGGTG	Reverse
p14 Katushka	TCCAGAGGTTGATTGTTCCAGACGCGG	Reverse
p15 Katushka	GGTGCGTACGGCCCTGGGGACGTCG	Reverse
p16 Katushka	AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC	Reverse
p17 Katushka	CAAGTGCCCAGCGGGGCTGCTAAAGC	Reverse
p18 Katushka	TTCTCTCTGCACCACTCTTCTCTTTGCC	Reverse
p19 Katushka	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTCTACAG	Reverse
P20 Katushka	CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGC	Forward
pSEC CH1	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Forward
pSEC ckappa	AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG	Forward
pSEC CMV	GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG	Forward
pSEC polyA Rev	TTCCTCATT TTA TTAGGAAAGGACAGTGGG	Reverse
pSEC Rev	CCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG	Reverse

## Material und Methoden

### 2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Lieferant
One Shot <sup>®</sup> Mach1 <sup>™</sup> -T1 <sup>R</sup>	Invitrogen

### 2.1.8 Zellkultur

#### 2.1.8.1 Zelllinien

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Referenz
Lenti-X <sup>™</sup> 293T	Subklon der 293T Zelllinie, humane Nierenfibroblasten, stabil transfiziert mit SV40 large T Antigen	Clontech	(Pear, <i>et al.</i> 1993)
BHK-21 CD16a F158	Nierenfibroblasten des syrischen Hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> Stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für die FcR gemeinsame gamma Kette und die humane FcγRIIIa-F158 cDNA	-	(Dechant, <i>et al.</i> 2002)
BHK-21 CD16a V158	Nierenfibroblasten des syrischen Hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> Stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für die FcR gemeinsame gamma Kette und die humane FcγRIIIa-V158 cDNA	-	(Dechant, <i>et al.</i> 2002)
CHO CD16b NA1	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters Stabil transfiziert mit einem Expressionkonstrukt für die humane FcγRIIIb-NA1 cDNA	-	Dechant, nicht publiziert
CHO CD16b NA2	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters Stabil transfiziert mit einem Expressionkonstrukt für die humane FcγRIIIb-NA2 cDNA	-	Dechant, nicht publiziert
Raji	Humane Burkitt Lymphom Zellen, EBV positiv	DSMZ	(Pulvertaft 1964)

Daudi	Humane Burkitt Lymphom Zellen, EBV positiv	DSMZ	(Klein, <i>et al.</i> 1968)
Ramos	Humane Burkitt Lymphom Zellen, EBV negativ	DSMZ	(Klein, <i>et al.</i> 1975)
HeLa	Humane Zervix-Karzinom Zellen	DSMZ	(Scherer, <i>et al.</i> 1953)
SK-BR-3	Humane Brust Adenokarzinom Zelllinie	ATCC	(Trempe 1976)

### 2.1.8.2 Zellkulturmedien

**Tabelle 12: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien**

Medium	Für die Zelllinien	Zusammensetzung
R10 <sup>+</sup>	BHK-21 CD16a F158, BHK-21 CD16a V158, CHO CD16b NA1, CHO CD16b NA2, Raji, Daudi, Ramos, HeLa	Roswell Park Memorial Institute 1640-Glutamax-I (Invitrogen) 10% fetales Kälberserum (Invitrogen) 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin (Invitrogen)
D10 <sup>+</sup>	Lenti-X™ 293T, SK-BR-3	Dulbecco´s Modified Eagle Medium Glutamax-I (Invitrogen) 10% fetales Kälberserum (Invitrogen) 100 µg/ml Penicillin / Streptomycin (Invitrogen)

### 2.1.9 Antikörper

**Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Antikörper**

Antikörper	Klonalität, Spezifität	Hersteller / Referenz
3G8	Muriner, monoklonaler CD16 IgG1	(Fleit, <i>et al.</i> 1982)
7D8-IgG1	Humaner monoklonaler CD20 IgG1	Genmab, Utrecht, Niederlande
α-β-Actin	Muriner, monoklonaler IgG1	Sigma-Aldrich

## Material und Methoden

---

α-human kappa (F+B) FITC	Ziege; polyklonaler IgG; FITC gekoppelt	Invitrogen
α-human kappa leichte Kette-HRP	Ziege; polyklonaler IgG; HRP gekoppelt	Biozol, Eching
α-human lambda leichte Kette-HRP	Ziege; polyklonaler IgG; HRP gekoppelt	Biozol
α-Kaninchen-HRP	Ziege; HRP gekoppelt	Jackson Immuno Research, Newmarket, England
α-Maus-HRP	Ziege; HRP gekoppelt	Jackson Immuno Research
α-Pentahistidin	Muriner, monoklonaler IgG1	Qiagen
α-RFP	Kaninchen; polyklonaler IgG	Invitrogen
CD3-FITC	Muriner IgG1, Klon SK7; FITC gekoppelt	Becton Dickinson
CD16-FITC	Muriner IgG1, Klon 3G8; FITC gekoppelt	Beckman Coulter
CD19-PE	Muriner IgG1; Klon J3-119; PE gekoppelt	Beckman Coulter
CD20-FITC	Muriner IgG2a, Klon B9E9; FITC gekoppelt	Beckman Coulter
CD32-PE	Muriner, monoklonaler IgG1; erkennt die Isoformen FcγRIIa und FcγRIIb; PE gekoppelt	Invitrogen
CD45-PE	Muriner IgG1, Klon J.33; PE gekoppelt	Beckman Coulter
CD56-PC7	Muriner IgG1; Klon N901 (NKH-1); PC7 gekoppelt	Beckman Coulter
CD69-PE	Muriner IgG2b, Klon TP1.55.3; PE gekoppelt	Beckman Coulter
Cetuximab	Erbix <sup>®</sup> , chimärer, monoklonaler EGFR IgG1	Merck KGaA
Trastuzumab	Herceptin <sup>®</sup> , humanisierter, monoklonaler Her2/neu IgG1	Roche
HLADR-PC7	Muriner IgG1, Klon Immu-357; PC7 gekoppelt	Beckman Coulter
IgG-FITC	Muriner IgG1, Klon 679.1 Mc7; FITC gekoppelt	Beckman Coulter
IgG-PE	Muriner IgG1, Klon 679.1 Mc7; PE gekoppelt	Beckman Coulter
IgG-PC7	Muriner IgG1, Klon 679.1 Mc7; PC7 gekoppelt	Beckman Coulter

Rituximab	MabThera <sup>®</sup> , chimärer, monoklonaler CD20 IgG1	Roche
Myc	Muriner IgG1, Klon 9E10	ATCC
Penta-His <sup>™</sup> Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Muriner IgG1, Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Konjugat	Qiagen
TH-69	Muriner, monoklonaler CD7 AK	(Baum, <i>et al.</i> 1996)

### 2.1.10 Mäuse

**Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Mausstämme**

Mausstamm	Lieferant
NOD scid gamma c <sup>-/-</sup> Mäuse	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

##### 2.2.1.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Pro Reaktionsansatz wurden 20 Einheiten Enzym zusammen mit 2 µg DNA und mit den Herstellern empfohlenen Puffern in 30 µl Gesamtvolumen für 2 h bei 37°C bzw. 50°C inkubiert.

##### 2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese können DNA-Fragmente abhängig von ihrer Molekülgröße getrennt werden. Das Agarosegel dient dabei als Molekularsieb, so dass die Beweglichkeit von kleinen Fragmenten höher ist, als die von größeren Fragmenten.

Für die Gelelektrophorese wurden 1%-ige w/v Agarosegele mit 1x TAE Laufpuffer verwendet. Mit 6x Gelladepuffer versehene DNA-Proben und parallel dazu eine standardisierte DNA-Leiter wurden auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 80-100 V für 30-50 min aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad für 20 min gefärbt, um die DNA bei Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar zu machen. Die Gele wurden unter einem UV-Transilluminator (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch) betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

##### 2.2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach der enzymatischen Spaltung von DNA, wurde die DNA-Bande entsprechender Größe mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerinstruktion aus dem Gelstück extrahiert. Die DNA wurde entweder direkt in Ligationsreaktionen eingesetzt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

##### 2.2.1.4 Ligationsreaktion

Für einen Ligationsansatz wurden 7 µl des linearisierten Vektors und 10 µl des Inserts mit 1 µl Ligase (5 Einheiten/µl) und 2 µl 10x Ligase-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert.



### 2.2.1.5 Transformation von Plasmid-DNA

*One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup>-T1<sup>R</sup>* (Invitrogen) sind chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien, die für das Vervielfältigen von DNA verwendet werden.

50 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien wurden mit 4 µl eines Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Die Zellen wurden anschließend in 250 µl SOC Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C im Inkubator geschüttelt (200 U/min). 10 µl, 50 µl und der restliche Ansatz wurden auf 2x YT Agarplatten mit sterilen Spateln verteilt und bei 37°C im Inkubator über Nacht inkubiert. Zur Selektion der Plasmid-tragenden Klone enthielten die Agarplatten 100 µg/ml Ampicillin.

### 2.2.1.6 Analyse von Klonierungen

Um eine erfolgreiche Klonierung zu überprüfen, wurde Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien präpariert. Dazu wurden Einzelklone von den Platten isoliert und in 2 ml 2x YT Medium mit Antibiotikum für ca. 6 h bei 37°C angezogen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus den Bakterien mit dem *NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Quick Pure* (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die DNA wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20°C gelagert. Im letzten Schritt wurde der Erfolg der Klonierung mittels Restriktionsanalysen überprüft.

### 2.2.1.7 DNA Sequenzanalyse

Die Sequenzen der konstruierten DNA-Plasmide wurden nach erfolgreicher Klonierung und Vervielfältigung auf mögliche Fehler überprüft. Die dazu notwendigen Sanger Sequenzierungen wurden im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die verwendeten Primer (siehe Tabelle 9) wurden bei der Firma Sigma-Aldrich hergestellt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *Vector NTI Advance 10* (Invitrogen).

### 2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Vervielfältigung klonierter DNA wurden die Plasmid-tragenden Bakterien in einer Übernachtkultur vermehrt. Die Plasmid-DNA wurde mittels *NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Maxi Kit*

## Material und Methoden

---

(Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben präpariert. Für die Übernachtskultur wurden jeweils 300 ml 2x YT Medium mit 10 mg/ml Antibiotikum mit einem Bakterienklon oder einer Bakteriensuspension beimpft und diese über Nacht bei 37°C und 200 U/min geschüttelt.

### 2.2.1.9 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde mit dem *BioPhotometer* (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit wurde mit der  $\text{Ratio}_{260/280}$  abgeschätzt. Für diesen Zweck wurden *UVetten* (220-1600 nm) von Eppendorf verwendet.

### 2.2.1.10 Klonierungen

Zur Konstruktion der rekombinanten, bispezifischen Antikörper-Derivate wurden die kodierenden Sequenzen für die variablen Regionen des CD16-Antikörpers (Klon 3G8), des CD16a-Antikörpers (Genbanken-Zugangsnummer: CS464766) bzw. des CD89-Antikörpers (Guettinger, *et al.* 2010) und für die C<sub>K</sub>-C<sub>H</sub>1-Domäne des humanen IgG1 nach den publizierten Sequenzen [Genbanken-Zugangsnummer: AY173025 (schwere Kette) und AY173024 (leichte Kette)] von Entelechon GmbH, Regensburg, *de novo* synthetisiert. Dabei wurden durch Codon- und Sequenzoptimierung seltene Codons ausgeschlossen und unerwünschte Motive oder Sekundärstrukturen vermieden. Dieser Prozess verbessert in der Regel die Genexpression in heterologen Expressionssystemen. Außerdem wurden Verknüpfungssequenzen und Restriktionsendonuklease-Stellen eingesetzt um die Klonierung von scFv-Fragmenten als *Sfi*I-Kassette zu ermöglichen (Peipp, *et al.* 2002). Für die eukaryotische Expression der schweren und leichten Ketten-Derivate wurden zwei Expressionsvektoren, pSecTag2-HC-CD16-V<sub>H</sub>-7D8scFv und pSecTag2-LC-CD16-V<sub>L</sub>-7D8scFv, kloniert. Die scFv-Fragmente mit Spezifität für CD20 (Klon 7D8) (Teeling, *et al.* 2004; Teeling, *et al.* 2006) oder für Her2 (Klon 4D5) (Carter, *et al.* 1992) wurden nach den publizierten Sequenzen durch Standardmethoden in V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> Orientierung generiert (Peipp, *et al.* 2002). Um die Polypeptidketten des Tribodies unterscheiden zu können, wurde bei dem Vektor für das Derivat der schweren Kette kodierende Sequenzen für eine Polyhistidin-Markierung und ein *c-myc* Epitop an das 3'-Ende angefügt.

Die Klonierung der kodierenden Sequenz für das rot fluoreszierende Protein Katushka (Turbo-FP635) aus dem Expressionsvektor pTurboFP635-C in den viralen Vektor pLVX-Puro wurde mit den Restriktionsenzymen *AfeI* und *XbaI* durchgeführt.

### **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Zellkultur**

Alle Zellkulturen wurden bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Adhärenente Zelllinien wurden zuerst mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA oder Akutase behandelt, bevor die abgelösten Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:20 in frische Kulturflaschen ausgesät wurden. Suspensionszelllinien wurden im Verhältnis 1:3 passagiert. Die Zelllinien und die entsprechenden Medien sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt.

#### **2.2.2.2 Proliferationsinhibitionsversuche**

In diesem Versuch kann der Effekt von Substanzen bzw. Antikörpern auf die Proliferation von Zellen untersucht werden. Das Prinzip des Tests (*Cell Proliferation Kit I (MTT)* von Roche) beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu violetten Formazan-Kristallen durch Succinat-Dehydrogenase. Diese zelluläre Reduktion benötigt die Co-Faktoren NADH und NADPH und wird ausschließlich von metabolisch aktiven Zellen durchgeführt. Die entstandenen Formazan-Kristalle werden anschließend gelöst und die Konzentration der resultierenden, gefärbten Lösung wird photometrisch im ELISA Reader quantifiziert. Die Zellen werden dazu in Mikrotiter-Platten (96 well) zu  $2 \times 10^5$  Zellen/well in 100 µl Kulturmedium ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von Antikörpern oder PBS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach drei Tagen Inkubationszeit werden die Zellen in je 100 µl MTT-Lösung (1:10 verdünnt mit Kulturmedium) aufgenommen. Die Reaktion wird nach 4 h mit 10% SDS-Lösung gestoppt. Weitere 24 h später bei 37°C haben sich die Formazan-Kristalle gelöst. Die Proben werden daraufhin bei 550 nm im ELISA Reader gemessen (Referenz-Wellenlänge 650 nm).

### 2.2.2.3 Expression von Antikörper-Derivaten in Säugerzellen

Für die transiente Expression von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen wird die entsprechende DNA in Form von Expressionsvektoren mit Hilfe von Transfektionsreagenzien in die Zellen eingebracht. Bei der transienten Transfektion wird die DNA dabei nicht in das Zellgenom integriert, sondern innerhalb weniger Tage von den Zellen abgebaut.

#### 2.2.2.3.1 Liposomaler Gentransfer

Für die Transfektion mit *Lipofectamine*<sup>™</sup> LTX Reagenz (Invitrogen) wurden am Vortag  $5 \times 10^5$  Lenti-X<sup>™</sup> 293T Zellen im 6-well Format ausgesät. Die Durchführung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers mit 500  $\mu$ l *Opti-MEM*<sup>®</sup> / *Reduced Serum* Medium, 6,25  $\mu$ l *Lipofectamine*<sup>™</sup> LTX Reagenz und 2,5  $\mu$ l *PLUS*<sup>™</sup> Reagenz. Pro Transfektionsreaktion wurden 2,5  $\mu$ g DNA eingesetzt und nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand gesammelt.

#### 2.2.2.3.2 Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation

Zur Expression größerer Mengen rekombinanter Antikörper eignet sich die Transfektion der Expressionszelllinien mittels Kalziumphosphat-Präzipitation (Sambrook 1989). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA an ausfallendes Kalziumphosphat bindet und diese Komplexe von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden.

Es wurden  $2,5-3 \times 10^6$  Lenti-X<sup>™</sup> 293T Zellen pro 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und am darauffolgenden Tag bei einer Konfluenz von 50-70% transfiziert. Der 2 ml Ansatz pro Schale enthielt 20  $\mu$ g DNA, 125 mM  $\text{CaCl}_2$  und 2,5 mM Chloroquin in 1x HBS. Die Suspension des Kalzium-DNA-Präzipitats wurde vorsichtig zum frisch gewechselten Medium auf die Zellen geträufelt. Nach 8-10 h wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellkulturüberstände wurden danach alle 48 h für 6 Tage gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.4 Virale Transduktion

Um Zellen stabil mit einem rot fluoreszierenden Protein zu markieren, wurden verschiedene Zelllinien mit Lentiviren, die den Expressionsvektor pLVX-Puro-TurboFP635 enthielten, transduziert. Lentiviren eignen sich sehr gut zur stabilen Integration von genetischem Material in Zellen. Mit dem vesikulären Stomatitisvirus G Glykoprotein (VSV-G) als Hüllprotein können Lentiviren humane und murine Zellen infizieren. Der in dieser Arbeit hergestellte Vektor wurde von der Firma Capital Biosciences (Rockville, MD, USA) in Lentiviren verpackt. Für die Transduktion von adhärennten Zellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen im 6-well Format am Tag zuvor ausgesät, und mit 3 ml frischem Kulturmedium plus Polybrene (Endkonzentration 8  $\mu\text{g/ml}$ ) versehen. Suspensionszelllinien wurden am selben Tag in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen im 6-well Format verwendet. Der Virenstock wurde frisch aufgetaut und die Viren in einem Verhältnis von Anzahl der infektiösen Viruspartikel zu Zellzahl betrug 5:1 (MOI, *multiplicity of infection* = 5). Zur Steigerung der Transduktion von Suspensionszelllinien wurden diese nach Zugabe der Viruspartikel für 90 min bei 1.200 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Außerdem wurde eine zweite Transduktion mit einer MOI von 5 durchgeführt. Danach wurden die Proben für 24 h bei angefeuchteter Atmosphäre und 6%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach einer weiteren Inkubationszeit von mindestens 48 h wurden die Zellen unter Puromycin-Selektion kultiviert. Für die Suspensionszelllinie Raji wurden 10  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin (Endkonzentration) zur Selektion eingesetzt, während bei der adhärennten Zelllinie HeLa 1  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin (Endkonzentration) ausreichten. Nach frühestens zehn Passagen waren die Viruspartikel so stark verdünnt, dass die Zellen aus dem S2-Bereich genommen werden konnten. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnten die Zellen bereits vorher auf eine erfolgreiche Transduktion überprüft werden. Dazu wurden die Zellen fünfmal mit 35 ml PBS aufgenommen und bei 1.800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 700  $\mu\text{l}$  PBS + 1% PFA fixiert.

### 2.2.2.5 Isolierung von Effektorzellen aus peripherem Blut

Nach einem schriftlichen Einverständnis wurde von freiwilligen, gesunden Spendern Blut entnommen. Zur Isolierung der Effektorzellen wurde das Blut auf einen diskontinuierlichen Gradienten geschichtet, der aus 70%-igen und 63%-igen Percoll-Lösungen bestand. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Plasma von der

## Material und Methoden

---

Deckschicht genommen. Mononukleäre Zellen (MNCs) wurden aus der Phase zwischen Plasma und Percoll isoliert. Polymorphnukleäre Zellen (PMNs) wurden darunter zwischen den beiden Percollschichten entnommen. Verbleibende Erythrozyten wurden mit hypotonischer Lyse entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmte Zellviabilität lag bei mindestens 95%. Die Gewinnung der MNC-Fraktion aus peripherem Blut oder Knochenmark von Leukämie- oder Lymphom-Patienten wurde analog durchgeführt. Eine Anreicherung von bestimmten Zellpopulationen kann mit der MACS (*Magnetic activated cell sorting*, magnetisch aktivierte Zellsortierung) Technologie erreicht werden. Zellen werden durch Bindung von magnetischen Kügelchen spezifisch markiert. Die Spezifität der Kügelchen ist abhängig vom verwendeten Kit und kann zur Negativ- und zur Positivselektion eingesetzt werden. Die magnetisch markierten Zellen werden in speziellen MACS Säulen durch einen Magneten zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen den Filter passieren und als Fraktion von negativ selektionierten Zellen gesammelt werden können. Die magnetisch markierten Zellen können nach Entfernung des Magneten von den MACS Säulen eluiert werden. Die Anreicherung von NK-Zellen aus MNC-Fraktionen erfolgte durch Negativselektion mit dem *NK cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec GmbH) nach Herstellerprotokoll. Die im Zweifarben-Durchflusszytometer mit CD16- und CD56-spezifischen Antikörpern getestete Reinheit betrug 85-98%. Die isolierten Effektorzellen wurden direkt verwendet oder über Nacht in R10<sup>+</sup> bei 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. Alle Experimente wurden von der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Abstimmung mit der Deklaration von Helsinki genehmigt.

### 2.2.2.6 <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungsversuche

Zur funktionellen Charakterisierung der Antikörper-Derivate wurden <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden 1,2x10<sup>6</sup> Zielzellen mit 100 µCi <sup>51</sup>Cr für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen auf 1x10<sup>5</sup> Zellen/ml mit R10<sup>+</sup> eingestellt. Es wurden entweder 50 µl mit 50 E/ml Heparin versetztes Blut bzw. Plasma hinzugefügt, oder aber frisch isolierte Effektorzellen, in einem konstanten Effektoren zu Zielzellen (E:T) Verhältnis von 40:1 verwendet. In den Legenden ist angegeben, wenn andere E:T Verhältnisse verwendet wurden. Zielzellen, Effektoren und Antikörper-Verdünnungen wurden in einem Endvolumen von 200 µl in Mikrotiter-Platten für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit einem Zentrifugationsschritt beendet. 25 µl des Probenüberstandes wurden zu 125 µl *OptiPhase SuperMix* pipettiert und in einem Mikrotiter-Platten Scintillation und Lumineszenz Zähler 1450 *MircoBetaTriLux* (Perkin-

Elmer) auf freigesetztes  $^{51}\text{Cr}$  in *counts per minute* (cpm) untersucht. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet: „% spezifische Lyse = [(experimentelle cpm - basale cpm) / (maximale cpm – basale cpm)] x 100“. Die maximale Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  wurde durch Zugabe von 1% v/v Triton X-100 bestimmt, die basale cpm wurden Proben ohne Antikörper und Effektoren herangezogen.

### 2.2.3 Biochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Reinigung von Antikörper-Derivaten

In den gesammelten Zellkulturüberstand aus den transienten Transfektionen wurde zur Aufreinigung von humanen  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Ketten *CaptureSelect<sup>®</sup> Fab* Affinitätsmatrix zugegeben (1 ml Matrix auf 1 l Überstand) und bei 4°C über Nacht vorsichtig rühren lassen. Die Matrix wurde danach durch Zentrifugation gesammelt und auf *Poly-Prep<sup>®</sup>* Chromatographie Säulen (Bio-Rad) geladen. Zur weiteren Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das rekombinante Protein wurde mit 5 ml Elutionspuffer eluiert und der pH-Wert des Eluats mit 1 ml 1M Tris pH 8,0 neutralisiert. Um zu gewährleisten, dass die Antikörper-Derivate als Heterodimere vorliegen, wurde ein zweiter Reinigungsschritt für Polyhistidin-Markierung (His-Tag) tragende Moleküle angeschlossen. Das Eluat aus dem ersten Schritt wurde mit Bindepuffer für His-Tag Aufreinigungen auf 50 ml aufgefüllt, mit 1 ml *Ni-NTA Superflow* versehen und über Nacht bei 4°C gerührt. Danach wurde die Matrix durch Zentrifugation gesammelt, auf *Poly-Prep<sup>®</sup>* Chromatographie Säulen gegeben und zweimal mit Bindepuffer gewaschen. Mit Zugabe von 5 ml Elutionspuffer für His-Tag Aufreinigungen wurde das rekombinante Protein von der Matrix eluiert und anschließend mindestens  $10^6$ -fach gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde mit *Vivaspin* Ultrafiltrationssäulen (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) eingeeengt und anschließend mit Spritzenaufsatzfiltern (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße; Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA) steril filtriert.

#### 2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Antikörper-Chargen durch Kapillar-Elektrophorese

Die Konzentration von gereinigten, rekombinanten Proteinen wurde mittels Kapillar-Elektrophorese mit dem *Experion<sup>TM</sup> Automated Electrophoresis System* (Bio-Rad) nach Herstellerangaben bestimmt. Mit diesem System können hoch reproduzierbare

## Material und Methoden

---

Trennungen und Quantifizierungen von Protein-, RNA- oder DNA-Proben auf Gel-basierter Elektrophorese durchgeführt werden.

### 2.2.3.3 SDS-PAGE

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) können Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE wurden entweder *NuPAGE*<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris Gele mit dem *Xcell SureLock™ Mini Cell System* (Invitrogen) oder selbst hergestellte, 12%-ige SDS-Gele verwendet (Tabelle 15). Die Proteinproben bzw. Zellysate wurden vor dem Auftrag mit 5x Probenpuffer versehen und 5 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben 5 min bei 16.000 U/min zentrifugiert. Als Proteinstandard wurden 5 µl *Precision Plus Protein™ Standard* aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 1-2 h mit einer Spannung von 100-120 V. Anschließend wurden die Gele je nach Bedarf zur Auswertung mit *Roti<sup>®</sup>-Blue* nach Herstellerangaben gefärbt oder für Western Blot Experimente eingesetzt.

**Tabelle 15: Zusammensetzung von hergestellten 12%-igen SDS-Gelen, Ansatz für zwei Gele**

Lösung	Sammelgel	Trenngel 12%-ig
H <sub>2</sub> O	2,1 ml	3,3 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	0,5 ml	4,0 ml
Tris 1 M (pH 6,8)	0,38 ml	-
Tris 1,5 M (pH 8,8)	-	2,5 ml
SDS 10%	0,030 ml	0,1 ml
APS 10%	0,030 ml	0,1 ml
TEMED	0,003 ml	0,004 ml
Gesamtvolumen	3,043 ml	10,004 ml



**2.2.3.4 Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen**

Zur Überprüfung der Identität mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine wurden mit einem Elektrophorese-Verfahren aus dem Gel auf PVDF Membranen (Bio-Rad) übertragen, um sie danach mittels spezifischen Antikörpern auf der Membran nachzuweisen (Renart, *et al.* 1979). Die Übertragung wurde mit dem *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) bei einer Stromstärke von 100 mA/Gel für 1 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit Blocking-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Die Zusammensetzung des Blocking-Puffers richtete sich nach dem danach zur Detektion verwendeten Antikörper. Zur Detektion der Proteine auf PVDF Membranen werden Antikörper als spezifische Sonden eingesetzt. Der Nachweis erfolgt direkt oder indirekt mit an Antikörper gekoppelter Meerrettichperoxidase. Sämtliche Antikörper wurden nach den Herstellerprotokollen eingesetzt. Zur Visualisierung wurde *SuperSignal® WestDura Extended Duration Chemiluminescent Substrate* mit dem *ChemiDoc™ XRS+ System* (Bio-Rad) eingesetzt.

Die Derivate der leichten Kette des Tribodies wurden entweder mit Ziege- $\alpha$ -human kappa leichte Kette-HRP oder Ziege- $\alpha$ -human lambda leichte Kette-HRP nachgewiesen. Der Nachweis der schweren Ketten erfolgte mit Maus- $\alpha$ -Pentahistidin und dem Sekundärantikörper Ziege- $\alpha$ -Maus-HRP (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Protokoll zur Immundetektion der schweren und leichten Ketten von Tribody-Molekülen auf PVDF-Membranen**

Protokoll	Nachweis der leichten Ketten	Nachweis der schweren Ketten
Blocking (über Nacht bei 4°C)	TBS + 3,2% BSA und 2% MMP	TBS + 3% BSA
Waschen (3x 10 min bei RT)	TBS + 0,1% Tween 20	-
1. Färbung (1 h bei RT)	Ziege- $\alpha$ -human kappa leichte Kette-HRP oder Ziege- $\alpha$ -human lambda leichte Kette-HRP: je 1:2.500 in TBS + 1% BSA und 2% MMP	Maus- $\alpha$ -Pentahistidin: 1:1.000 in TBS + 3% BSA
Waschen (3x 10 min bei RT)	TBS + 0,1% Tween 20	TBS + 0,05% Tween 20 und 0,2% Triton X-100

## Material und Methoden

---

2. Färbung (1 h bei RT)	-	Ziege- $\alpha$ -Maus-HRP: 1:5.000 in TBS + 10% MMP
Waschen (3x 10 min bei RT)	-	TBS + 0,05% Tween 20 und 0,2% Triton X-100
Detektion	<i>SuperSignal<sup>®</sup> WestDura Extended Duration Chemiluminescent Substrate</i> , Mischung 1:1, 2 min Inkubationszeit	

### 2.2.4 Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen. An einem Laserstrahl werden Zellen einzeln und in hohem Tempo vorbeigeführt, wobei sie entsprechend ihrer Größe und Gestalt charakteristisch Licht streuen. Durch spezifische Anfärbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern wird von den Zellen zusätzlich Fluoreszenz emittiert. Detektoren weisen die charakteristische Streuung und Fluoreszenz nach, welche Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle zulassen.

Für die Versuche wurde das *Cytomics FC500* Gerät mit *CXP Software* (Beckman Coulter) verwendet. Von jeder Probe wurden mindestens  $10^4$  Zellen analysiert. Durch entsprechende Analysefenster wurden tote Zellen, Zellaggregate und zelluläre Debris ausgeschlossen.

#### 2.2.4.1 Analyse der spezifischen Bindung von Antikörper-Derivaten

Für die Bindungsanalysen wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden gewaschen, indem sie in 3 ml kaltem PBA aufgenommen und 8 min bei 1.800 U/min und 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min bei 4°C mit Antikörper-Verdünnungen inkubiert. Verdünnungsmedium war ebenfalls PBA. Danach erfolgten erneut ein Waschschrift mit 3ml kaltem PBA und eine Inkubation für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit dem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper (*Penta-His<sup>™</sup> Alexa Fluor<sup>®</sup> 488* oder  $\alpha$ -human-kappa-FITC, jeweils 1:20 in PBA). Nach einem weiteren Waschschrift mit 3 ml kaltem PBA wurden die Zellen mit 700  $\mu$ l PBS + 1% PFA resuspendiert und fixiert. Anschließend erfolgte die Messung im Durchflusszytometer, wobei  $10^4$  Zellen pro Probe analysiert wurden.

**2.2.4.2 In vitro B-Zell Depletion und NK-Zell Aktivierung**

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, ob ein Antikörper B-Zell Depletion vermitteln kann, und in welchem Umfang autologe NK-Zellen dabei aktiviert werden. Die Experimente wurden je nach Versuchsansatz mit Vollblut oder mit isolierten, mononukleären Zellen (MNC) durchgeführt.

125 µl Vollblut bzw.  $5 \times 10^5$  frisch präparierte MNCs wurden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und R10<sup>+</sup> Medium versetzt. Abhängig von der Fragestellung des Versuchs wurde entweder Heparin (Endkonzentration 50 E/ml) oder Lepirudin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben. Mit der Zugabe von Heparin wurde die Vermittlung von CDC inhibiert. Ansätze, die Heparin enthalten, dienten deshalb zur Analyse von FcR-vermittelten Effekten. Zur Analyse von CDC und FcR-vermittelten Mechanismen wurde Lepirudin zu den Proben gegeben. Lepirudin hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von Komplement. Das Gesamtvolumen einer Probe betrug 500 µl. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre und 6% CO<sub>2</sub> wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie auf Depletion von B-Zellen und Aktivierung von NK-Zellen analysiert.

Für die B-Zell Depletion wurden jeweils 150 µl einer Probe mit 3 ml kaltem PBA gewaschen und anschließend mit dem in Tabelle 17 aufgelisteten Antikörper-Mix für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 3 ml kaltem PBA wurden die Zellen mit 1 ml *VersaLyse™ lysing solution plus IOTest 3 fixative solution* behandelt. Dadurch wurden die Zellen fixiert und die Erythrozyten lysiert. Die MNC-Proben wurden ebenfalls mit 3 ml kaltem PBA gewaschen und mit 700 µl PBS + 1% PFA fixiert. Von jeder Probe wurden  $3 \times 10^4$  Ereignisse mittels Durchflusszytometer gemessen. Der Anteil verbleibender B-Zellen (CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) wurde nach folgender Formel berechnet: „(% verbleibende B-Zellen) / (maximale % B-Zellen) x 100“.

**Tabelle 17: B-Zell Depletion. Protokoll zum Nachweis von B-Zellen**

Protokoll	Lösung	Inkubationszeit
Waschen	150 µl Probe	-
	3 ml kaltes PBA	-

## Material und Methoden

Färbung	Antikörper-Mix: 50 µl pro Probe 10 µl CD3-IgG-FITC + 10 µl CD19-IgG-PE + Intratect (Endkonzentration 2 mg/ml) in PBA	30 min im Dunkeln bei 4°C
Waschen	3 ml kaltes PBA	-
Fixierung	Vollblut-Proben: 1 ml <i>VersaLyse™ lysing solution plus</i> <i>IOTest 3 fixative solution</i>  MNC-Proben: 700 µl PBS + 1% PFA	-

Für die NK-Zell Aktivierung wurden je 150 µl einer Probe mit 3ml kaltem PBA gewaschen und anschließend mit einem Antikörper-Mix gefärbt (Tabelle 18). Die Zellen wurden anschließend erneut mit 3 ml kaltem PBA gewaschen und fixiert. Im Durchflusszytometer wurden  $3 \times 10^4$  Ereignisse gemessen und auf CD56-positive und CD3-negative Lymphozyten analysiert. Innerhalb dieser Population wurde die Menge an aktiveren NK-Zellen durch Anzeige der CD69-positiven Zellen berechnet.

**Tabelle 18: NK-Zell Aktivierung. Protokoll zum Nachweis der CD69-Expression**

Protokoll	Lösung	Inkubationszeit
	150 µl Probe	-
Waschen	3 ml kaltes PBA	-
Färbung	Antikörper-Mix: 50 µl pro Probe 10 µl CD3-IgG-FITC + 10 µl CD69-IgG-PE + 10 µl CD56-IgG-PC7 + Intratect (Endkonzentration 2 mg/ml) in PBA	30 min im Dunkeln bei 4°C
Waschen	3 ml kaltes PBA	-
Fixierung	Vollblut-Proben: 1 ml <i>VersaLyse™ lysing solution plus</i> <i>IOTest 3 fixative solution</i>	-

MNC-Proben: 700 µl PBS + 1% PFA
------------------------------------

### 2.2.5 Tierversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Falk Nimmerjahn, Lehrstuhl für Genetik, Department für Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen (Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.5.2) und mit Prof. Dr. Holger Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie am Uniklinikum Schleswig-Holstein, Kiel (Abschnitt 2.2.5.3) durchgeführt.

#### 2.2.5.1 Rekonstruktion eines humanen Immunsystems in Mäusen

Humane CD34-positive hämatopoietische Stammzellen (HSC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Nabelschnurblut isoliert, mit dem CD34 Progentior Cell Isolation Kit angereichert und bis zur Benutzung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Neugeborene NOD scid gamma-c<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit 1,3 Gy bestrahlt und mit  $3\text{-}5 \times 10^4$  HSCs transplantiert wie beschrieben (Traggiai, *et al.* 2004). Sechzehn Wochen nach Transplantation wurde das periphere Blut mittels Durchflusszytometrie auf humane Zellen untersucht. Dazu wurden mononukleare Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit linienspezifischen Markern wie humanem CD45 und CD16, CD19, CD20, CD33 und CD56 (alle BD Biosciences) gefärbt. Die anschließenden Experimente wurden mit Mäusen durchgeführt, die mindestens 65% humane CD45-positive Zellen im peripheren Blut enthielten.

#### 2.2.5.2 B-Zell Depletion in „humanisierten Mäusen“

In „humanisierten Mäusen“ ist es möglich die Fähigkeit von Antikörper-Derivaten zur Depletion von B-Zellen mit autologen Effektorzellen *in vivo* zu untersuchen. Die Mäuse wurden wie in 2.2.5.1 beschrieben präpariert und bekamen an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 100 µg Tribody intraperitoneal appliziert. Einen Tag nach der letzten Injektion wurde die Anzahl der B-Zellen in der Peripherie mittels Färbung mit

## Material und Methoden

---

CD33- und CD19-Antikörpern im Durchflusszytometer bestimmt und mit der Anzahl vor Beginn der Versuche verglichen.

### 2.2.5.3 *In vivo* Bildgebung von fluoreszierenden Tumorzellen in Mäusen

Zur Etablierung eines präklinischen Tiermodells wurden in dieser Arbeit Vorversuche zur *in vivo* Bildgebung von fluoreszierenden Tumorzellen in einer Maus durchgeführt. Die Fluoreszenz dient als Referenz für das Wachstum der Tumorzellen. Durch intraperitoneale Injektion von  $5 \times 10^6$  HeLa<sub>Kat</sub> Zellen, die stabil das rot fluoreszierende Protein Katushka exprimierten und im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, wurden bei einer weiblichen SCID Maus lokale Tumore induziert. 7 Tage nach der intraperitonealen Injektion wurden der gleichen Maus  $5 \times 10^5$  HeLa<sub>Kat</sub> subkutan injiziert. Das *in vivo* bildgebende Verfahren wurde 12 Tage nach der initialen Applikation mittels *Berthold LB983 NightOwl optical imager* (EG&G Berthold, Bad Wildbad) durchgeführt. Die Maus wurde dazu narkotisiert. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde ein 550 nm (10 nm) Filter verwendet. Für die Emission kam ein 605 nm (55 nm) Filter zum Einsatz. Die Expositionszeit betrug 1 s. Die Farb-intensivierten Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen und den photographischen Aufnahmen wurden mit der WinLight Software (EG&G Berthold, Bad Wildbad) erstellt.

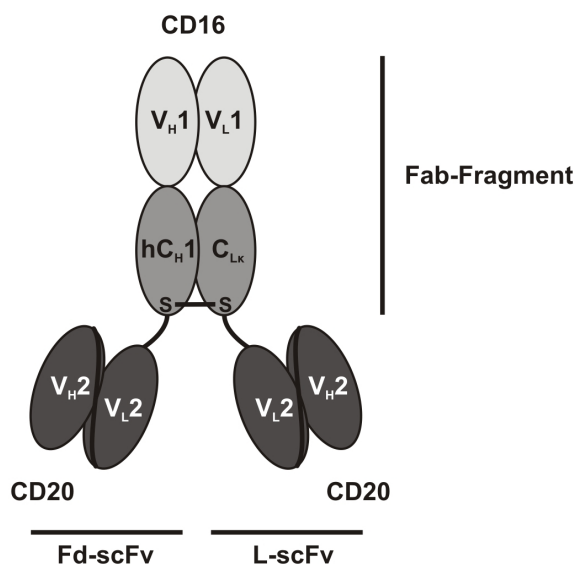
### 2.2.6 Graphische Darstellungen und statistische Analysen

Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt, die anschließend graphisch und statistisch mit der Software *GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen zwei Datensätzen wurden mittels gepaartem bzw. ungepaartem, zweiseitigem t-Test oder einfaktorieller bzw. zweifaktorieller ANOVA analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit  $p \leq 0,05$  akzeptiert und sind mit einem Stern (\*) oder einem Doppelkreuz (#) indiziert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung und Charakterisierung des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Rekombinante, bispezifische Antikörper stellen möglicherweise eine vielversprechende Weiterentwicklung von konventionellen Antikörpern in der Tumorthherapie dar. So genannte Tribodies sind Antikörperderivate mit drei Valenzen, die durch die Fusion zweier scFvs an die C-terminalen Enden der konstanten Regionen eines Fab-Fragments hergestellt werden (Schoonjans, *et al.* 2001). Zu Beginn dieser Arbeit wurde der bispezifische Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] konstruiert. Das rekombinante Protein verfügt über die beiden scFv-Fragmente bivalente Bindungseigenschaften für CD20, wodurch Tumorzellen bivalent von einem Molekül anvisiert werden können. Das Fab-Fragment ist spezifisch für CD16, und ermöglicht monovalente Bindung an CD16-positive Effektorzellen, wie NK-Zellen, Granulozyten und Makrophagen (Abbildung 11). Eine Kreuzvernetzung von CD16 ist ohne die simultane Bindung an Zielzellen mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] nicht möglich und verhindert Zielantigen-unabhängige Effektorzellaktivierung.



**Abbildung 11: Schema des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16].** V<sub>H1</sub>, V<sub>L1</sub>, variable Immunglobulin-domänen der schweren bzw. leichten Kette spezifisch für CD16; hC<sub>H1</sub>, konstante Immunglobulin-domäne der schweren Kette; C<sub>LK</sub>, konstante Immunglobulin-domäne der Kappa-(κ-)leichten Kette; V<sub>H2</sub>, V<sub>L2</sub>, variable Domänen der schweren bzw. leichten Kette, die das CD20-spezifische scFv-Fragment bilden; S-S, Disulfidbrücke; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

### 3.1.1 Konstruktion der Vektoren zur eukaryotischen Expression des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Komplex aufgebaute Tribody-Moleküle können besser in eukaryotischen Systemen als in *Escherichia coli* Bakterien hergestellt werden. Die kodierende Sequenz für das scFv-Fragment mit Spezifität für CD20 (Klon 7D8; Teeling, *et al.* 2004) war zu Beginn der Dissertation bereits im Labor vorhanden. Der humane Antikörper 7D8-IgG1 ist ein Typ I CD20-Antikörper und zeigte in vorangegangenen Studien höhere, zytotoxische Kapazität als Rituximab. Die variablen Immunglobulinketten für das CD16-spezifische Fab-Fragment wurden entsprechend publizierten Sequenzen synthetisiert (Klon 3G8; Bruenke, *et al.* 2005). Der murine Antikörper 3G8 zeigte starkes Potential in der Rekrutierung von NK-Zellen. Die Klonierungen erfolgten in sukzessiven Schritten in den Expressionsvektor pSecTag2/Hygro C. Der Vektor besitzt neben dem starken eukaryotischen CMV (*cytomegalovirus immediate-early*) Promotor ein Sekretionssignal der V-J2-C Region der murinen Ig Kappa-(κ-) leichten Kette (Ig<sub>κ</sub>) für die effiziente Sekretion von rekombinanten Proteinen. Da Tribodies heterodimere Moleküle sind, wurden zwei Expressionsvektoren für jeweils eine der beiden Polypeptidketten konstruiert: pSecTag2-HC-CD16-VH-7D8scFv und pSecTag2-LC-CD16-VL-7D8scFv (Abbildung 12).

#### Derivat der schweren Kette



#### Derivat der kappa leichten Kette



**Abbildung 12: Schema der Expressionskassetten des Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16].** CMV, *cytomegalovirus immediate-early* Promotor; Ig<sub>κ</sub>, kodierende Sequenz für das murine Ig κ-Sekretionssignal; V<sub>H</sub>1, V<sub>L</sub>1, cDNA-Sequenzen für die schwere bzw. leichte Kette der variablen Immunglobulinregionen des CD16-Antikörpers 3G8; hC<sub>H</sub>1, cDNA-Sequenz für die schwere Kette der konstanten Immunglobulinregion 1; C<sub>Lκ</sub>, cDNA-Sequenz für die κ-leichte Kette der konstanten Region; V<sub>H</sub>2, V<sub>L</sub>2, cDNA-Sequenzen für die variable, schwere bzw. leichte Kette Region, die das CD20-spezifische scFv-Fragment bilden; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, cDNA-Sequenz für einen 15 Aminosäure langen (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> bzw. einen 20 Aminosäure langen (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>, flexiblen Linker; c-myc, 6xHis, cDNA-Sequenz für das c-myc-Epitop oder Polyhistidin.

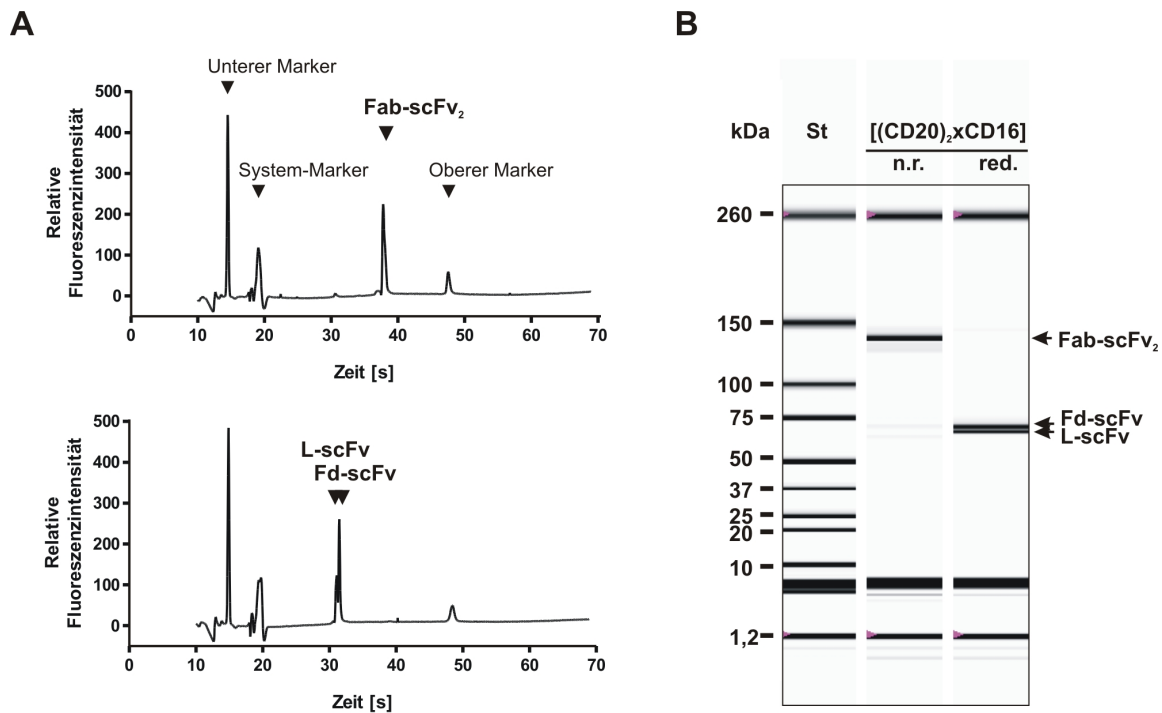
Um die Polypeptidketten des Tribodies differenzieren zu können, wurden an das Derivat der schweren Kette C-terminal ein Polyhistidin und ein c-myc-Epitop angefügt. Die in



dieser Arbeit verwendeten Kontroll-Tribodies [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD89] wurden analog konstruiert. Mit diesen Molekülen konnte die Spezifität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] überprüft werden.

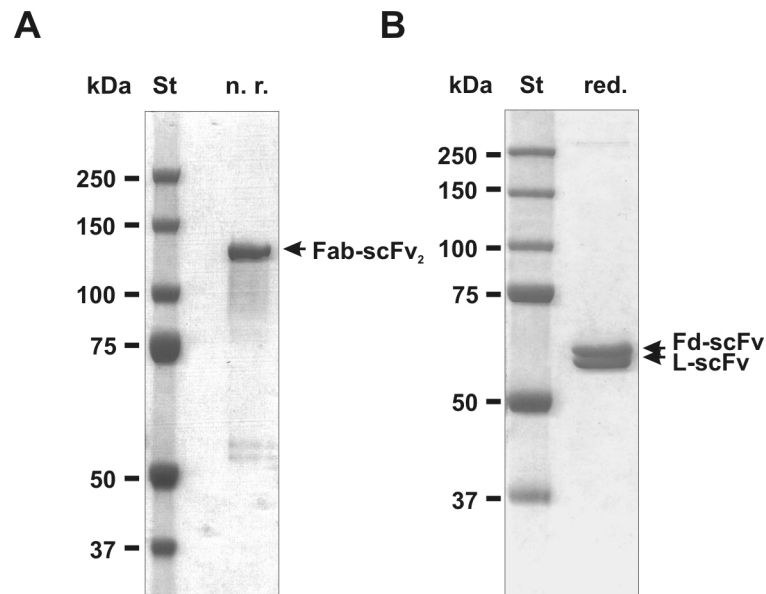
### 3.1.2 Produktion und Reinigung des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Die Produktion des bispezifischen Tribodies wurde mittels transienter Transfektion in Lenti-X™ 293T Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsvektoren pSEC-Tag2-HC-CD16-VH-7D8scFv und pSEC-Tag2-LC-CD16-VL-7D8scFv mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode in die Zellen eingebracht und der Zellkulturüberstand für 6 Tage alle 48 h geerntet. Bei korrekter Zusammenlagerung setzt sich der Tribody aus einem Derivat der  $\kappa$ -leichten Kette und einem Polyhistidin-(His-Tag-)tragenden Derivat der schweren Kette zusammen. Das rekombinante Protein wurde mittels zweistufiger Affinitätschromatographie aus dem gesammelten Zellkulturüberstand gereinigt. In einem ersten Reinigungsschritt wurden Moleküle mit humaner  $\kappa$ -leichter Kette durch Verwendung einer Matrix mit Affinität zu humaner  $\kappa$ -leichter Kette isoliert. Aus der erhaltenen Fraktion wurden in einem darauffolgenden Schritt His-Tag-tragende Moleküle gereinigt. Mit dem sukzessiven Reinigungsprozess sollte gewährleistet werden, dass vorwiegend heterodimere Moleküle isoliert wurden. Die Konzentration und die Reinheit der Chargen wurden mittels quantitativer Kapillar-Elektrophorese abgeschätzt (Abbildung 13). Die errechnete Ausbeute der Produktion des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribodies betrug bei der transienten Transfektion 100-400  $\mu$ g rekombinantes Protein/l Zellkulturüberstand bei einer Reinheit der Proteinchargen von  $\geq 90\%$ . Die Überprüfung der Reinheit verdeutlichte, dass der zweistufige Reinigungsprozess für die rekombinanten Moleküle erfolgreich war. Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und anschließender Färbung der Gele mit Coomassie Blau konnten die isolierten Proteine auf ihre molekulare Masse überprüft werden.



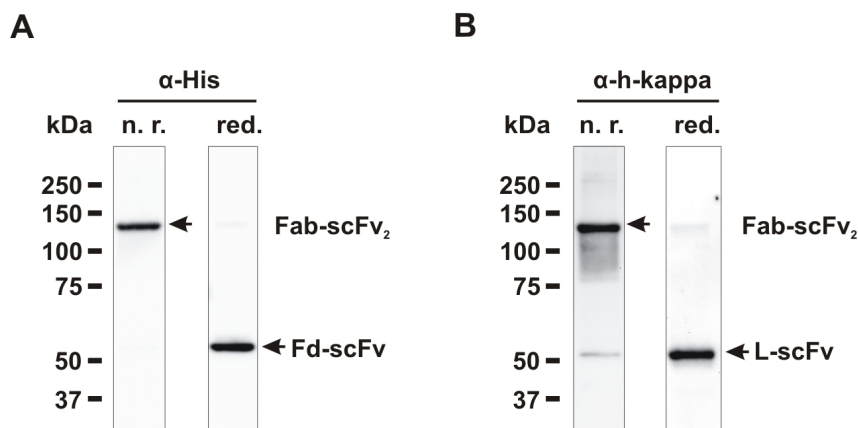
**Abbildung 13: Nachweis des gereinigten [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mittels Kapillar-Elektrophorese.** (A) Elektropherogramme für [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] unter nicht reduzierenden Bedingungen (oben) und reduzierenden Bedingungen (unten). Die ersten beiden und der letzte Peak jedes Elektropherogramms repräsentieren interne Standards zur Proteinquantifizierung und Massenbestimmung. (B) Berechnetes Ergebnis zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit. In der ersten Spur des berechneten Gels ist der Größenstandard (St) zu sehen. Jeweils die oberste und mehrere untere Banden in den Proben Spuren waren interne Standards. Der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] wird in Spur 2 unter nicht reduzierenden Bedingungen und in Spur 3 unter reduzierenden Bedingungen dargestellt. St, Größenstandard; n. r. bzw. red., nicht reduzierende bzw. reduzierende Bedingungen; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

Das rekombinante Protein Fab-scFv<sub>2</sub> sollte bei korrekter Faltung eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden und deshalb bei einer Größe von ca. 110 kDa im Gel detektiert werden. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen werden die Tribody-Moleküle in die Polypeptidketten Fd-scFv und L-scFv mit einer jeweiligen Größe von ca. 55 kDa aufgetrennt. Zeigen sich gleich starke Intensitäten der Banden beider Polypeptidketten, deutet das darauf hin, dass fast ausschließlich korrekt zusammengelagerte, heterodimere Moleküle in den Antikörperchargen vorgelegen haben, und die zweistufige Reinigung des Tribodies effektiv war. Entsprechend der berechneten, molekularen Masse zeigte sich unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Proteinbande bei einer Größe von ca. 120 kDa (Fab-scFv<sub>2</sub>) (Abbildung 14 A).



**Abbildung 14: Nachweis des gereinigten [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in Coomassie-gefärbten Gelen.** (A) Unter nicht reduzierenden Bedingungen war der Tribody als Heterodimer im SDS-Gel nachzuweisen. (B) Coomassie-gefärbte SDS-Gele, die unter reduzierenden Bedingungen das bispezifische Molekül in die Polypeptidketten Fd-scFv und L-scFv getrennt zeigen. St, Größenstandard; n. r. bzw. red., nicht reduzierende bzw. reduzierende Bedingungen; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

Unter reduzierenden Bedingungen wurden zwei Polypeptidketten bei einer Größe von jeweils ca. 60 kDa detektiert, was etwa der errechneten Molekülmasse von 55 kDa entsprach (Abbildung 14 B). Die Intensitäten der Banden von Fd-scFv und L-scFv waren gleich stark, was bedeutet, dass die vergleichbar großen Polypeptidketten in gleichen Mengen vorlagen und das erfolgreich gereinigte Antikörperderivat überwiegend aus Heterodimeren bestand. Der spezifische Nachweis der einzelnen Fragmente erfolgte mittels Western Blot Analysen. Jeweils unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurden mit einem  $\alpha$ -Pentahistidin Antikörper das Fd-scFv bzw. mit einem gegen humane  $\kappa$ -leichte Kette-gerichteten Antikörper das L-scFv Fragment nachgewiesen (Abbildung 15). Die Analysen deuten darauf hin, dass unter nicht reduzierenden Bedingungen nahezu alle Polypeptidketten über stabile Disulfidbrücken kovalent verknüpft als Heterodimere vorlagen. Für die funktionellen Analysen lag das Protein in ausreichenden Mengen vor.

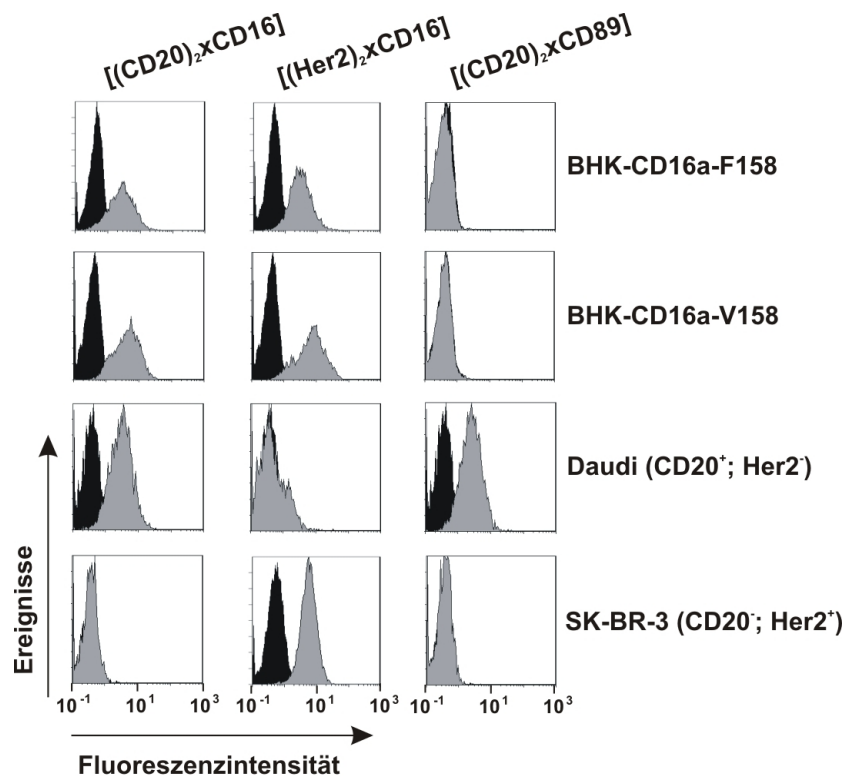


**Abbildung 15: Immundetektion des gereinigten [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] auf PVDF Membranen. (A)** Das Derivat der schweren Kette des Tribodies wurde unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen mit α-His nachgewiesen. **(B)** Der Nachweis des Derivats der leichten Kette unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen erfolgte mit α-humane κ-leichte Kette Antikörper. α-His, α-Pentahistidin Antikörper; α-h-kappa, α-humane κ-leichte Kette Antikörper; red., reduzierende Bedingungen, n. r., nicht reduzierende Bedingungen; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

### 3.1.3 Analyse der Bindungseigenschaften des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Im Anschluss an den Nachweis der Reinigung sollten die Bindungseigenschaften des Tribodies untersucht werden. Vor allem sollte überprüft werden, welche spezifischen Bindungsfähigkeiten das Molekül besitzt. Mittels Durchflusszytometrie wurde untersucht, ob das rekombinante Protein spezifisch an CD20-positive und CD16-positive Zellen bindet. In der Literatur wird beschrieben, dass der CD16aV/F-Polymorphismus der Aminosäure an Position 158 Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern, wie Rituximab, hat (Weng & Levy 2003; Musolino, *et al.* 2008). Die Affinitäten von Fc-Domänen von IgG für die polymorphen Varianten FcγRIIIa-V/F158 variieren (Cartron, *et al.* 2002). Deshalb sollte die Bindungsaffinität des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] an beide CD16a-Alloformen untersucht werden. Als Zielzellen für den Nachweis dienten CD20-positive Daudi Zellen und CD16a-F158- bzw. CD16a-V158-transfizierte BHK-21 Zellen, sowie CD20-negative, Her2-positive SK-BR-3 Zellen. Außerdem wurden gleichartig konstruierte und produzierte Kontroll-Tribodies eingesetzt. Der bispezifische Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zeigte Bindung an Daudi Zellen und CD16a-transfizierte BHK-21 Zellen (Abbildung 16). Eine Bindung an CD20-negative, Her2-positive SK-BR-3 konnte nicht nachgewiesen werden. Mit dem [(Her2)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Kontroll-Molekül wurde die CD20-

spezifische Bindung des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] überprüft. Dieser Tribody konnte nicht an CD20-positive Daudi Zellen binden, sondern zeigte Bindung an CD16a-transfizierte BHK-21 Zellen und Her2-positive SK-BR-3 Zellen. Die CD16-spezifische Bindung von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] wurde mit dem Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD89] kontrolliert. Letzterer war nicht in der Lage CD16- bzw. Her2-positive Zellen zu binden, sondern zeigte in diesen Analysen nur spezifische Bindung an CD20-positive Daudi Zellen. Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten die erwarteten Bindungsmuster für das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Antikörperderivat und die Kontroll-Moleküle.

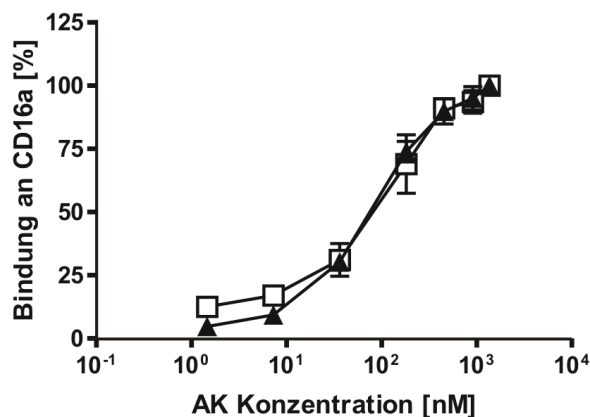


**Abbildung 16: Analysen der spezifischen Bindung von Antikörperderivaten.** Die Bindung von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD89] an BHK-CD16a-F158, BHK-CD16a-V158, Daudi und SK-BR-3 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Schwarze Peaks repräsentieren die Kontrollen, graue Peaks das Signal der Zellen, die mit bispezifischen Molekülen bei einer Konzentration von 20 µg/ml inkubiert wurden. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit dem sekundären Antikörper Penta-His™ Alexa Fluor® 488 oder FITC-konjugierter, humane κ-leichte Kette Antikörper.

Zusätzlich wurde die Dosis-abhängige Bindung des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] an beide CD16a-Alloformen untersucht. CD16a-F158- und CD16a-V158-transfizierte BHK-21 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten Proteins inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse

## Ergebnisse

zeigten, dass das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Antikörperderivat mit vergleichbarer Affinität für beide CD16a-Alloformen gebunden hat (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Analyse der Dosis-abhängigen Bindung von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] an BHK-CD16a-F158 und BHK-CD16a-V158.** Die Werte der durchschnittlichen Fluoreszenz der Proben bei gesättigten Tribody-Konzentrationen wurden bei beiden Zelllinien auf 100% gesetzt und auf alle anderen experimentellen Werte übertragen. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit Penta-His™ Alexa Fluor® 488. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von vier unabhängigen Messungen. BHK-CD16a-V158 (▲), BHK-CD16a-F158 (□).

### 3.1.4 Effektormechanismen des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

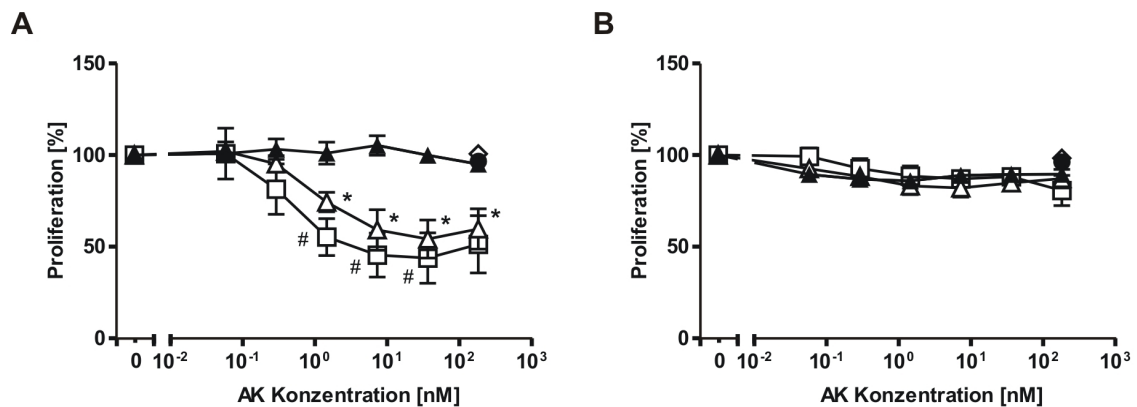
Antikörper können direkte und indirekte Effektormechanismen induzieren. Mit den folgenden *in vitro* und *in vivo* Analysen sollte geklärt werden, in wie weit der rekombinante, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Tribody in der Lage ist, verschiedene Effektor-mechanismen, wie antiproliferative Effekte, ADCC und CDC zu vermitteln.

#### 3.1.4.1 Untersuchung zur Vermittlung von antiproliferativen Effekten durch den bispezifischen Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Ein direkter Effektormechanismus von Antikörpern ist die Hemmung von Zellwachstum. In dieser Arbeit wurden Dosis-abhängige, antiproliferative Effekte von Antikörpern bzw. Antikörperderivaten analysiert. CD20-positive Daudi und Raji Zellen wurden als Zielzellen verwendet und über 3 Tage mit Antikörpern inkubiert.

Die beiden CD20-gerichteten, monoklonalen Antikörper Rituximab und 7D8-IgG1 waren in der Lage, das Wachstum von Daudi Zellen zu inhibieren. Das bispezifische,

[(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtetes Molekül hingegen blieb ineffektiv (Abbildung 18). Die Proliferation von Raji Zellen konnte von keinem der Moleküle inhibiert werden.



**Abbildung 18: Analyse antiproliferativer Effekte von Antikörpern.** Dosis-abhängige Inhibition der Proliferation von Daudi Zellen (A) und Raji Zellen (B) wurde analysiert. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲), Rituximab (□), 7D8-IgG1 (△), Kontroll-IgG1 (●) und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇) wurden verwendet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte +/- SEM, wobei bei (A) drei und bei (B) vier unabhängige Experimente durchgeführt wurden. Werte von statistischer Signifikanz zwischen Rituximab bzw. 7D8-IgG1 und dem Kontroll-IgG1 sind durch Doppelkreuz (#) bzw. Stern (\*) gekennzeichnet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die monoklonalen Antikörper Rituximab und 7D8-IgG1 Proliferationsinhibition vermitteln konnten, während der bispezifische Tribody diesen Effektmechanismus nicht induzierte. Da die Expression von CD20 auf Raji Zellen höher ist als auf Daudi Zellen (Stein, *et al.* 2004), können die Unterschiede der antiproliferativen Effekte der monoklonalen Antikörper zwischen den Zelllinien nicht direkt mit der Antigen-Dichte auf den Zellen erklärt werden bzw. zusammen hängen. Ausbleibende Effekte des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] bei beiden Burkitt Lymphom Zelllinien könnten möglicherweise durch eine geringere Avidität für CD20 im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern erklärt werden.

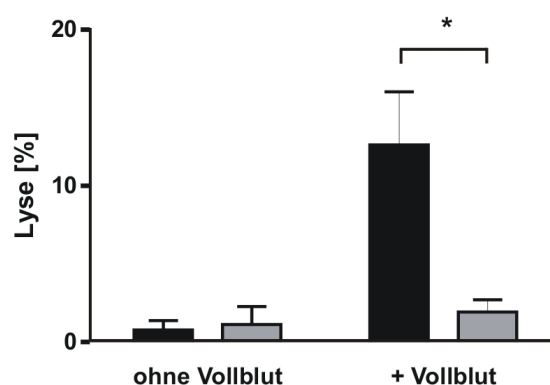
### 3.1.4.2 Untersuchung zur Vermittlung von zellulärer Zytotoxizität durch den bispezifischen Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Die Vermittlung von zellulärer Zytotoxizität spielt eine entscheidende Rolle bei der therapeutischen Wirkung von monoklonalen Antikörpern (Clynes, *et al.* 2000; Nimmerjahn & Ravetch 2007; de Haij, *et al.* 2010). In Zytotoxizitätsversuchen mit <sup>51</sup>Cr Freisetzung sollte untersucht werden, ob der bispezifische Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in

## Ergebnisse

der Lage ist, effektiv humane FcγRIII-positive Effektorzellen zu rekrutieren und mittels ADCC Lyse von Zielzellen zu vermitteln.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit mit dem Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Lyse der humanen Burkitt Lymphom Zelllinie, Daudi, zu beobachten ist, wenn nicht fraktioniertes Vollblut als Quelle von Effektorzellen verwendet wurde. Die <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuche zeigten, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mit einer Konzentration von 90 nM signifikante Lyse der Tumorzelllinie auslösen konnte (Abbildung 19), wobei das Kontroll-Molekül [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] keine lytische Aktivität zeigte. In den Versuchsansätzen ohne Zugabe von Vollblut wurde keine Zielzellyse durch die Tribody-Moleküle beobachtet. Die Resultate zeigten, dass ohne Bindung an die CD20-positiven Zielzellen und an Effektorzellen keine Lyse beobachtet werden konnte. Nur die gleichzeitige Bindung von Zielzellen und Effektoren durch den [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribody vermittelte effektiv ADCC in diesen Ansätzen.

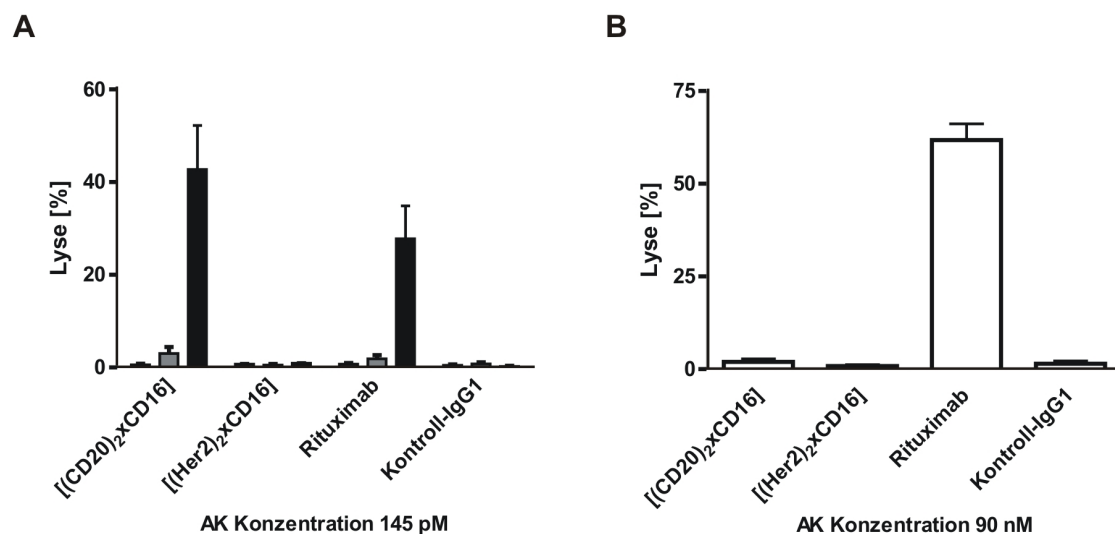


**Abbildung 19: Untersuchung der zytotoxischen Kapazität des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mit Vollblut.** Vollblut von vier gesunden Spendern wurde als Quelle von Effektorzellen verwendet. Als Zielzellen wurden Daudi Zellen eingesetzt. Die Konzentration der Tribody-Moleküle betrug 90 nM. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) wurden durch einen Stern (\*) indiziert. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] = schwarze Balken; [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] = graue Balken.

Zur Klärung welche Effektorzellpopulation im Vollblut durch das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Antikörperderivat rekrutiert wird, wurde Vollblut in Plasma, polymorphnukleäre Zellen und mononukleäre Zellen fraktioniert und in ADCC-Experimente eingesetzt. Das Ergebnis der Versuche zeigte, dass der Tribody Effektoren in der mononukleären Zellpopulation zur Lyse rekrutierte (Abbildung 19). Weder mit polymorphnukleären Zellen noch mit Plasma war Vermittlung von Zytotoxizität durch das bispezifische Molekül zu beobachten. Das deutet darauf hin, dass die Lyse von den in der mononukleären Zellfraktion vorhandenen NK-Zellen induziert wurde, welche die aktivierende Isoform des



FcγRIII, CD16a, exprimieren. Rituximab kann als Typ I CD20-IgG1 über die Fc-Domäne ADCC und CDC vermitteln. Mit diesem Antikörper wurde bei einer Konzentration von 145 pM Lyse der humanen Tumorzelllinien mit mononukleären Zellen als Effektoren beobachtet (Abbildung 20 A). Das Ausmaß der Lyse war jedoch geringer als die mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-vermittelte Zytotoxizität. Außerdem wurde erst in höheren Antikörperkonzentrationen CDC durch Rituximab beobachtet (Abbildung 20 B). Der bispezifische Tribody war auch in der höheren Konzentration nicht in der Lage Komplement-vermittelte Lyse zu induzieren.

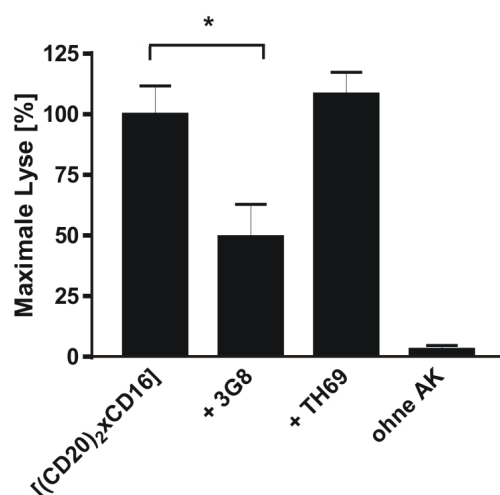


**Abbildung 20: Zytotoxizitätsexperimente mit unterschiedlichen Effektorpopulationen. (A)** Plasma (mit Heparin versetzt), polymorphnukleäre Zellen und mononukleäre Zellen wurden als Effektorpopulationen und Daudi Zellen als Zielzellen eingesetzt. Das E:T Verhältnis betrug bei polymorphnukleären Zellen 80:1 und bei mononukleären Zellen 40:1. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 145 pM verwendet. **(B)** CDC war zusätzlich mit einer höheren Konzentration von 90 nM untersucht worden. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. mononukleäre Zellen = schwarze Balken; polymorphnukleäre Zellen = graue Balken; Plasma = weiße Balken.

Dieses Ergebnis war zu erwarten, da [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] keine Fc-Domäne zur Rekrutierung von Komplementfaktoren besitzt. In beiden experimentellen Ansätzen konnte mit den Kontroll-Molekülen keine Zytotoxizität beobachtet werden.

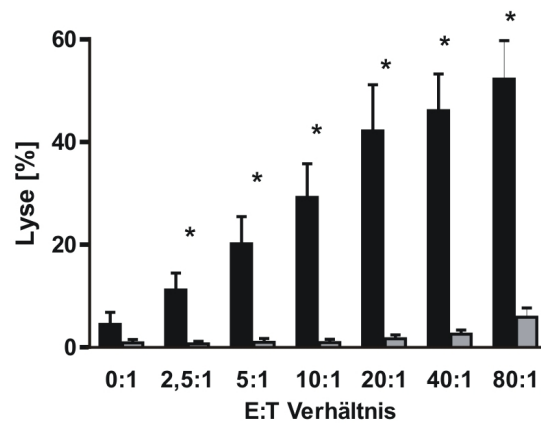
## Ergebnisse

In weiteren Zytotoxizitätsversuchen wurde untersucht, ob ADCC durch  $[(CD20)_2 \times CD16]$  über die Rekrutierung von CD16-positiven Effektorzellen vermittelt wird und ob die Höhe der Lyse positiv mit der Anzahl der Effektoren korreliert. Durch Zugabe des parentalen CD16-Antikörpers 3G8 in hohem, molarem Überschuss konnte die vermittelte Lyse signifikant um ca. 50% blockiert werden (Abbildung 21). Die Zugabe eines nicht-relevanten Antikörpers zeigte keinen Effekt auf die Tribody-vermittelte ADCC.



**Abbildung 21: Nachweis der CD16-abhängigen Vermittlung von ADCC.** Für die Experimente wurden mononukleäre Zellen und Daudi Zellen in einem E:T Verhältnis von 40:1 eingesetzt. Die Konzentration des bispezifischen Antikörperderivats betrug 750 pM. Zur Demonstration der Antigen-spezifischen Zytotoxizität wurde der parentale CD16-Antikörper 3G8 zur Blockade bzw. der irrelevante Antikörper TH69 als Kontrolle in 450-fach molarem Überschuss zugegeben. Die Werte der durchschnittlichen Lyse durch  $[(CD20)_2 \times CD16]$  sind auf 100% gesetzt und alle anderen Mittelwerte entsprechend normalisiert. AK, Antikörper. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Stern (\*) indiziert statistisch signifikante Unterschiede.

Mit der Zugabe von mononukleären Zellen wurde das E:T Verhältnis auf maximal 80:1 bis minimal 2,5:1 eingestellt. Im Vergleich zum Kontroll-Tribody konnte mit  $[(CD20)_2 \times CD16]$  über einen breiten Bereich von E:T Verhältnissen Lyse der Zielzellen beobachtet werden, die mit steigender Anzahl von Effektorzellen wie erwartet zunahm (Abbildung 22). Bereits bei niedrigem E:T Verhältnis von 2,5:1 war die beobachtete Lyse signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Ansatz. Ohne mononukleäre Zellen (E:T = 0:1) zeigten beide rekombinanten Moleküle keine Zytotoxizität. Die Resultate zeigen eine hohe Effektivität von  $[(CD20)_2 \times CD16]$  bei geringer Anzahl von Effektoren, vor Allem, wenn in Betracht gezogen wird, dass mononukleäre Zellen nur etwa 5-10% NK-Zellen enthalten.

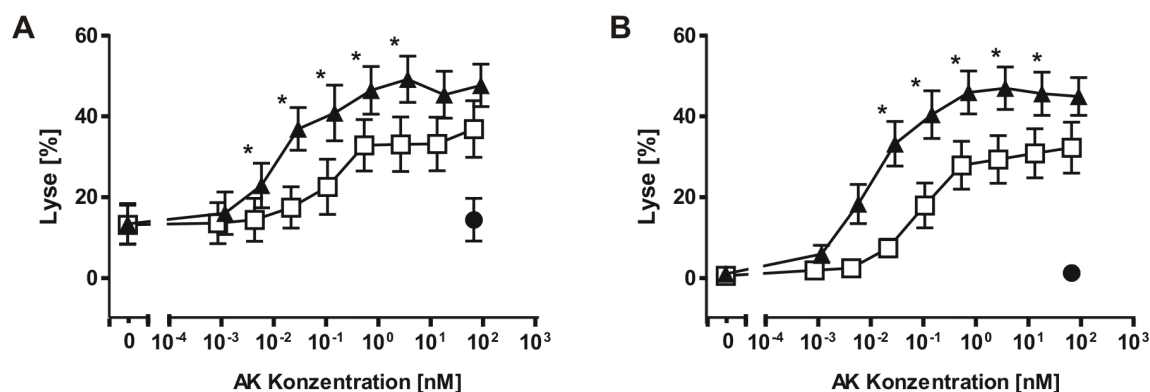


**Abbildung 22: Einfluss des E:T Verhältnisses auf die spezifische Vermittlung von ADCC.** Die bispezifischen Moleküle wurden in einer Konzentration von 145 pM zur Induktion von Daudi-Zell-Lyse eingesetzt. Mononukleäre Zellen von vier gesunden Spendern kamen jeweils in sechs verschiedenen E:T Verhältnissen zum Einsatz. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von vier unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (\*) angezeigt. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], schwarze Balken; [(Her2)<sub>2</sub>xCD16], graue Balken.

### 3.1.4.3 Vergleich der Effektivität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und dem monoklonalen Antikörper Rituximab

Um der Frage nachzugehen, welches zytotoxische Potential ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteter Tribody im Vergleich zu dem konventionellen, monoklonalen Antikörper Rituximab hat, wurden Experimente mit zwei verschiedenen Burkitt Lymphom Zelllinien, Daudi und Raji, durchgeführt.

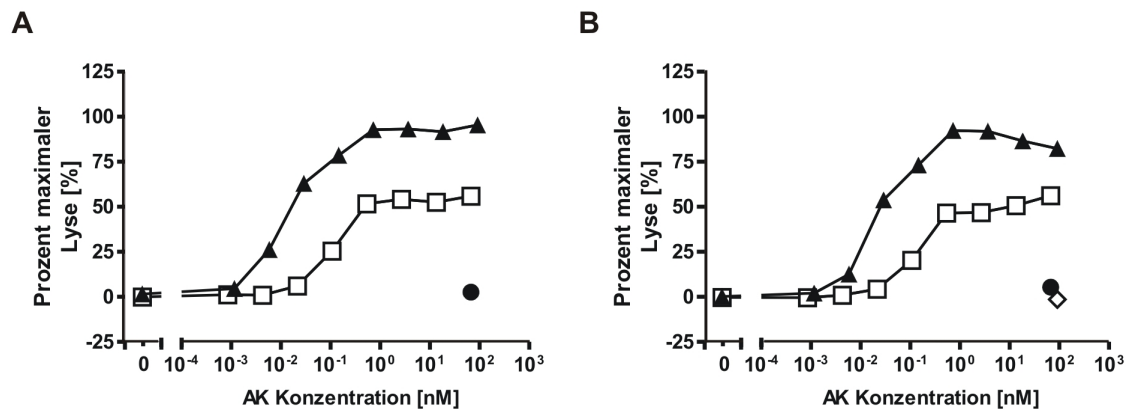
Beide Zelllinien wurden effektiv über die Vermittlung von ADCC durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab lysiert, allerdings unterschieden sich die Antikörper deutlich in ihrer Effizienz. Das Ausmaß der Lysen beider Zelllinien zeigte Abhängigkeit von der Antikörper-Konzentration und erreichte jeweils ein Maximum (Abbildung 23). Im Vergleich zu Rituximab war die lytische Kapazität des Tribodies in beiden Ansätzen mit einer Maximal-Lyse von ca. 45% 1,4-fach höher. Die statistische Auswertung für beide Zelllinien ergab, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] gerade in den niedrigeren Konzentrationen signifikant stärkere ADCC induzieren kann, als Rituximab. Mit dem entsprechenden Kontroll-Molekül konnte bei den Zelllinien keine Zytotoxizität beobachtet werden. Die Dosis der halbmaximalen Lyse, EC<sub>50</sub>, des Tribodies lag bei beiden Zelllinien bei einer Konzentration von ca. 10 pM. Die berechnete EC<sub>50</sub> von Rituximab dagegen lag mit ungefähr 90 pM neunfach über der EC<sub>50</sub> von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16].



**Abbildung 23: Vergleich der lytischen Potentiale von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab.** [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) und Rituximab (□) wurden auf ihre Fähigkeit getestet zwei verschiedene, CD20-positive Zelllinien Dosis-abhängig zu lysieren. Mononukleäre Zellen wurden in einem E:T Verhältnis von 40:1 (A) mit Raji Zellen in fünf bzw. (B) mit Daudi Zellen in vier unabhängigen Experimenten verwendet. Kontroll-IgG1 (●). Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Durch Sterne (\*) sind statistisch signifikante Unterschiede indiziert.

In der Literatur wird beschrieben, dass Rituximab unterschiedliche Affinität für die an Aminosäure Position 158 polymorphen Varianten von CD16a, CD16a-V/F158, besitzt (Dall'Ozzo, *et al.* 2004). Rituximab besitzt höhere Affinität zur CD16a-V158 Alloform. Um zu untersuchen, ob die Überlegenheit des Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] gegenüber Rituximab abhängig von diesem Polymorphismus ist, wurden weitere <sup>51</sup>Cr Freisetzungsexperimente durchgeführt. In den Analysen der Bindungseigenschaften des bispezifischen Moleküls konnten keine Unterschiede in der Affinität für die CD16a-Alloformen beobachtet werden. Aufgrund dieser Daten wurde erwartet, dass die sich Dosiskurven für [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab bei CD16a-V158 homozygoten, gesunden Spender möglicherweise annähern, da Rituximab mit diesen Spendern effektivere Lyse induziert. Für die ADCC-Versuche wurden Daudi Zellen als Zielzellen und die Antikörper in steigenden Konzentrationen eingesetzt.

Mit den Antikörpern konnten bei beiden Ansätzen Dosis-abhängige Lysen gezeigt werden, die mit zunehmender Konzentration der Antikörper Plateaus der maximalen Lyse erreichten (Abbildung 24). Wie in den vorangegangenen <sup>51</sup>Cr Freisetzungsexperimenten, war in diesen Experimenten die durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] vermittelte Lyse höher im Vergleich zu Rituximab. Die Überlegenheit des Tribodies gegenüber Rituximab war unabhängig davon, welche polymorphe Variante der gesunde Spender besaß. Diese Daten zeigen, dass Patienten unabhängig davon, welche CD16a-V/F158 Variante bei ihnen vorliegt, durch einen auf diese Weise konstruierten, bispezifischen Antikörper profitieren könnten.



**Abbildung 24: Einfluss des CD16-Polymorphismus auf die Induktion der Zielzellyse.** Die Dosis-abhängige ADCC-Aktivität von Rituximab (□) und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) wurde verglichen, unter der Verwendung von mononukleären Zellen von zwei gesunden Spendern, die entweder homozygot für FcγRIIIa-V158 (A) oder -F158 (B) waren. Als Zielzellen wurden Daudi Zellen eingesetzt. Kontroll-IgG1 (●) und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇). Die Daten wurden zum Vergleich der beiden Spender auf 100% maximale Lyse normalisiert und repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von Triplikaten.

### 3.1.4.4 Analysen zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-vermittelter, Zell-vermittelter Zytotoxizität gegenüber frisch isolierten Tumorzellen

Bisher wurden Untersuchungen zur Fähigkeit der ADCC-Vermittlung des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Tribodies mit Tumor-abgeleiteten Zelllinien durchgeführt. Hier zeigte das bispezifische Molekül potente Induktion von zellulärer Zytotoxizität.

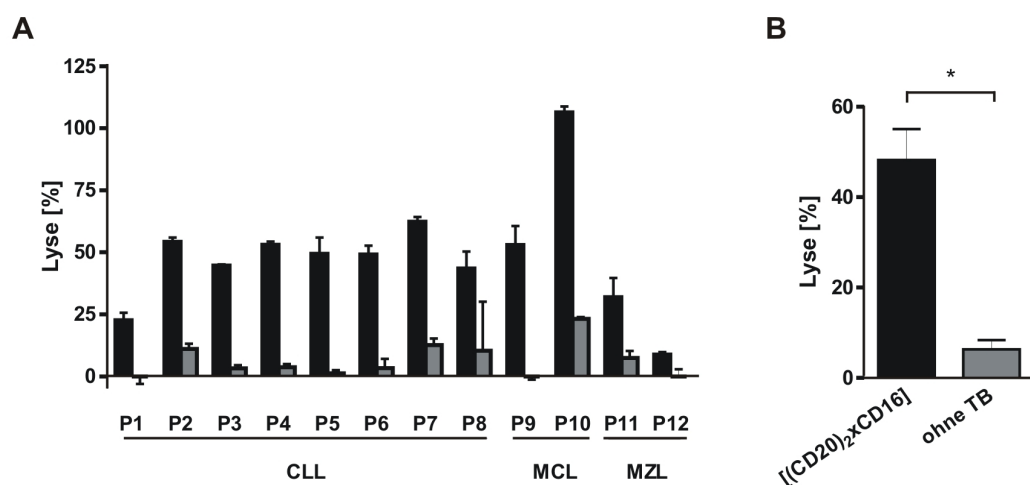
Aus Erfahrungen im eigenen Labor ist bekannt, dass frisch isolierte Tumorzellen in der Regel schwieriger zu lysieren sind, als etablierte Zelllinien. Deshalb wurden Tumorzellen aus dem peripheren Blut oder aus dem Knochenmark von zwölf Patienten mit unterschiedlichen B-Zell Erkrankungen frisch isoliert und als Zielzellen in <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuche eingesetzt (Tabelle 19). Als Effektorzellen wurden in diesen Experimenten gereinigte NK-Zellen von verschiedenen, gesunden Spendern verwendet. Die Konzentration des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] wurde bei einer konstanten Konzentration von 20 nM eingesetzt, bei welcher mit Zelllinien bereits maximale Lyse beobachtet wurde. Auf Grund der mitunter limitierten Probenmenge wurde als Vergleich NK-Zell Lyse ohne Antikörper herangezogen.

Die CD20-positiven Tumorzellen von allen zwölf Patienten wurden über die Vermittlung von ADCC durch das bispezifische Antikörperderivat lysiert (Abbildung 25). Die Lyse variierte über die einzelnen Proben, war aber mindestens 4-fach höher als die beobachtete NK-Zell Lyse ohne Tribody. Bei der Zusammenfassung dieser Experimente

## Ergebnisse

und der statistischen Auswertung ergab sich, dass der Mittelwert der durch den bispezifischen Antikörper vermittelten ADCC signifikant höher war als der Mittelwert der NK-Zell-vermittelten Lyse ohne Tribody ( $48,2\% \pm 6,8\%$  vs.  $6,3\% \pm 2,0\%$ ).

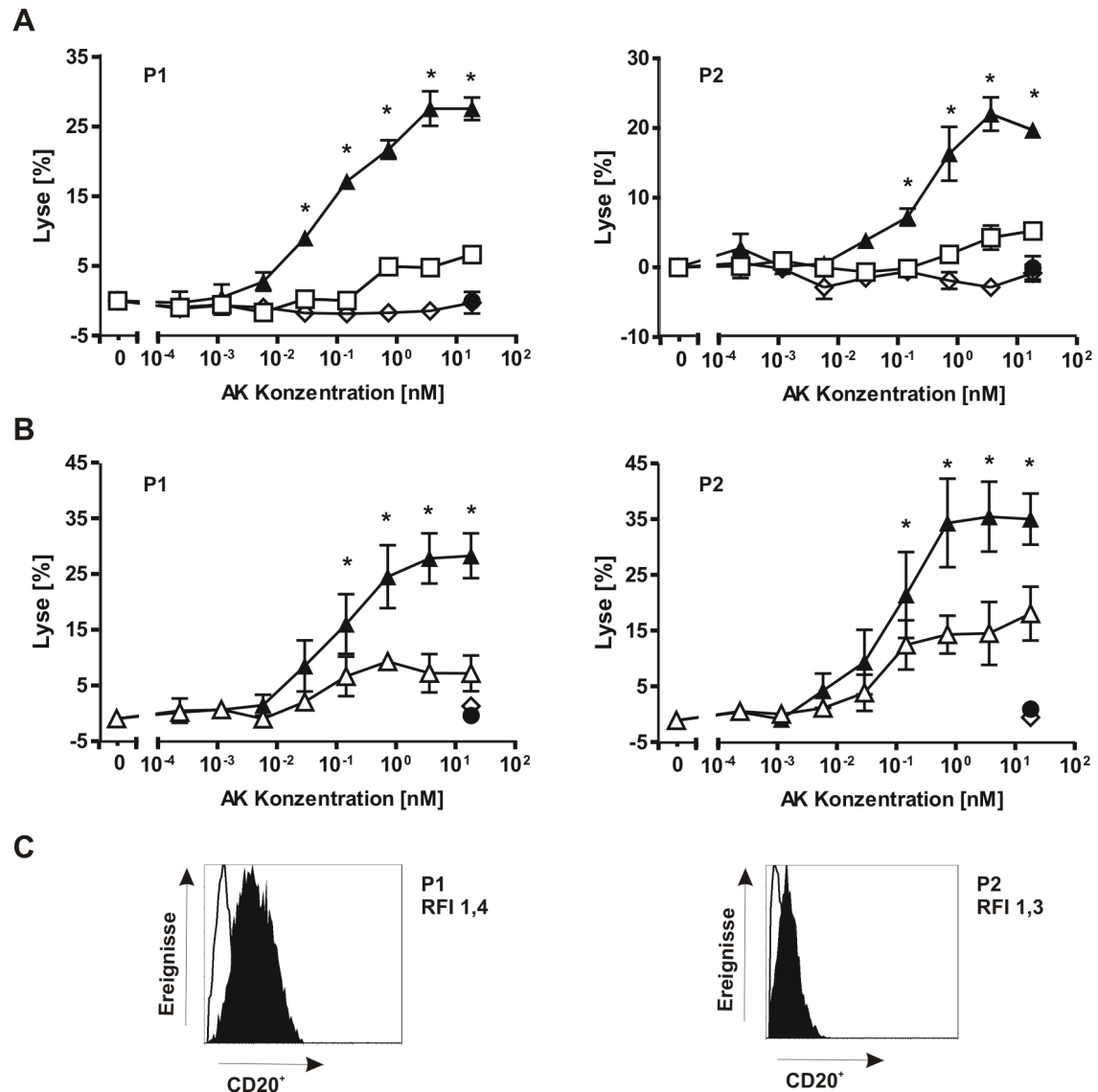
Für ausgewählte Patienten wurde die Dosis-Abhängigkeit der Lysen von  $[(CD20)_2 \times CD16]$  im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern Rituximab und dem parentalen 7D8-IgG1 verglichen. Dazu wurden zwei ausgewählte CLL-Proben in ADCC-Experimenten untersucht. Sowohl  $[(CD20)_2 \times CD16]$  als auch Rituximab und 7D8-IgG1 vermittelten Dosis-abhängig Lyse der frisch isolierten Tumorzellen beider Patienten (Abbildung 26 A und B).



**Abbildung 25:  $[(CD20)_2 \times CD16]$  vermittelt signifikante Lyse von frisch isolierten Tumorzellen.** (A) Die Tumorzellen von zwölf Patienten wurden als Zielzellen in  $^{51}\text{Cr}$  Freisetzungsversuche verwendet. Der bispezifische Antikörper kam in einer Konzentration von 20 nM zum Einsatz. In einem E:T Verhältnis von 20:1 wurden NK-Zellen von verschiedenen, gesunden Spendern als Effektorzellen zugegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten. P1-12, Patient 1-12 (siehe Tabelle 19). (B) Berechnete Mittelwerte  $\pm$  SEM der Daten aus (A). Ein statistisch signifikanter Unterschied ist durch einen Stern (\*) angezeigt.  $[(CD20)_2 \times CD16]$ , schwarze Balken; ohne TB, ohne Tribody, graue Balken.

Mit etwa 25% Lyse wurde ein Plateau erreicht, wie es schon bei den Analysen mit Tumorzelllinien beobachtet wurde. Monoklonale Antikörper vermittelten dagegen lediglich 5-10% Lyse. Das zytotoxische Potential des bispezifischen Tribodies war ab einer Konzentration von ca. 100 pM statistisch signifikant höher als das von Rituximab und 7D8-IgG1 (Abbildung 26 A und B). Aus Literaturdaten und eigenen Daten ist bekannt, dass die malignen B-Zellen von CLL-Patienten überwiegend geringe Expression von CD20 zeigen (Tabelle 19; Tefferi, *et al.* 1996). Die Expression von CD20 auf den Tumorzellen beider Patienten wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und war im Vergleich zur Expression von CD20 auf Tumorzellen anderer Patienten, zum

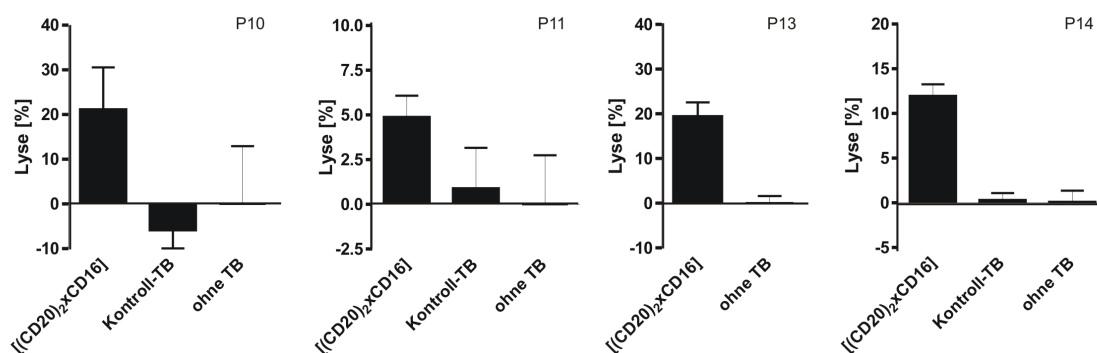
Beispiel mit MCL, gering (Abbildung 26 C; Tabelle 19). Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass  $[(CD20)_2 \times CD16]$  trotz geringer CD20-Expression der Tumorzellen ADCC vermitteln kann und dieses lytische Potential signifikant höher als das der monoklonalen Antikörper Rituximab und 7D8-IgG1 war.



**Abbildung 26: Dosis-abhängige Lyse der Tumorzellen von zwei CLL-Patienten.** Die Tumorzellen von Patient 1 und 2 wurden in einem E:T Verhältnis von 40:1 mit mononukleären Zellen verschiedener, gesunder Spender verwendet. Die Anzahl der Spender betrug bei den Vergleichsversuchen mit Rituximab **(A)** vier und mit 7D8-IgG1 **(B)** drei.  $[(CD20)_2 \times CD16]$  ( $\blacktriangle$ ), Rituximab ( $\square$ ), 7D8-IgG1 ( $\triangle$ ), Kontroll-IgG1 ( $\bullet$ ) und  $[(Her2)_2 \times CD16]$  ( $\diamond$ ). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Unterschiede in der Lyse mit statistischer Signifikanz sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. **(C)** Durchflusszytometrische Analysen der CD20-Expression auf den frisch isolierten Tumorzellen. Weiße Peaks repräsentieren die Kontrollen, schwarze Peaks die Signale der CD20-positiven Tumorzellen. RFI, relative Immunfluoreszenz; P1, Patient 1; P2, Patient 2 (siehe Tabelle 19).

## Ergebnisse

In den bisherigen Experimenten wurden allogene NK-Zellen verwendet. Die Aktivierung autologer NK-Zellen zur Tumorlyse ist schwieriger, da NK-Zellen inhibitorische Rezeptoren exprimieren, welche humanes Leukozytenantigen (HLA) binden. Über die Erkennung von HLA Klasse I auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen werden NK-Zellen inhibiert, diese Zellen zu lysieren. Fehlt die Expression von HLA Klasse I, bleiben die inhibitorischen Signale aus und NK-Zellen können leichter aktiviert werden. Aber auch durch starkes Ansprechen von aktivierenden Rezeptoren, wie CD16a, können NK-Zellen trotz inhibitorischer Signale aktiviert werden (Leiden, *et al.* 1989; Pena, *et al.* 1990; Litwin, *et al.* 1993). Um zu untersuchen, ob [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] im autologen Versuchsmodell wirksam ist und ob NK-Zellen von Patienten hämatologischer Neoplasien funktionell als Effektoren rekrutiert werden können, wurden Tumorzellen und NK-Zellen von vier Patienten (P10, P11, P13 und P14) isoliert und in einem E:T Verhältnis von 20:1 wieder zusammengeführt. Wenn die Probenmengen es zuließen, wurde [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] als Kontroll-Molekül mitgeführt. Sonst wurde die Lyse durch das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Antikörperderivat gegen NK-Zell Lyse ohne Tribody verglichen. In allen Proben wurde eine Lyse von 5-20% durch das bispezifische Molekül gemessen (Abbildung 27). Das Kontroll-Molekül war nicht in der Lage, Zytotoxizität auszulösen. Die Ergebnisse dieser <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuche zeigten, dass die Effektorzellen dieser Patienten funktionell aktiv waren und durch den [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Tribody aktiviert wurden und zur Lyse von autologen Tumorzellen rekrutiert werden konnten.



**Abbildung 27: ADCC von Tumorzellen durch autologe NK-Zellen.** Die Tribody-Konzentration betrug in diesen Versuchen 20 nM. Das E:T Verhältnis von frisch isolierten Tumorzellen zu autologen NK-Zellen war 20:1. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von Triplikaten. P10, Patient 10; P11, Patient 11; P13, Patient 13; P14, Patient 14 (siehe Tabelle 19); TB, Tribody.



### 3.1.4.5 *In vitro* Untersuchungen von B-Zell Depletion und NK-Zell Aktivierung durch den Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Das zytotoxische Potential des bispezifischen Tribody-Moleküls wurde bereits in <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuchen mit Rituximab und 7D8-IgG1 verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in diesen Versuchen den monoklonalen Antikörpern überlegen war. Die Analyse von B-Zell Depletion gibt weitere Hinweise darauf, in wie weit der bispezifische Tribody in der Lage ist, autologe NK-Zellen zu rekrutieren und Lyse von B-Zellen zu vermitteln. Für diesen Zweck wurden mononukleäre Zellen gesunder Spender verwendet. Mit dem Einsatz von Vollblut gesunder Spender in *in vitro* B-Zell Depletionsanalysen wurde die Aktivität des Tribodies unter physiologischen Bedingungen getestet. Im Gegensatz zur Fraktion mononukleärer Zellen sind im Vollblut Komplementfaktoren, verschiedene Populationen von Effektorzellen und endogene Immunglobuline vorhanden, die eventuell Einfluss auf das zytotoxische Potential von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] haben könnten.

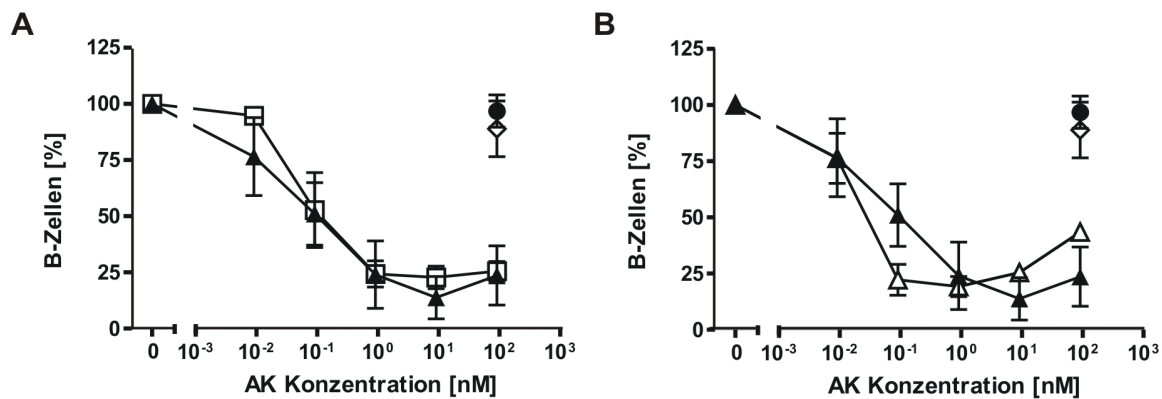
Nach Zugabe der Antikörper-Verdünnung wurden die Proben 24 h im Brutschrank inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf die verbleibenden B-Zellen (CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) untersucht. Die Analysen mit mononukleären Zellen zeigten, dass Rituximab, 7D8-IgG1 und auch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Lage waren potent autologe B-Zellen aus isolierten mononukleären Zellen zu depletieren (Abbildung 28).

Die Depletion erreichte bei den getesteten Antikörpern mit steigenden Konzentrationen ein Maximum. Die berechneten Dosis-Kurven von Rituximab und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] bzw. 7D8-IgG1 und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zeigten eine vergleichbar effiziente Depletion mit ca. 20% verbleibenden B-Zellen. Die mitgeführten Kontroll-Moleküle zeigten keine Vermittlung von B-Zell Depletion.

In Versuchen mit Vollblut soll die Aktivität von Antikörpern unter physiologischen Bedingungen getestet werden. Den Antikörpern standen hier sowohl verschiedene Effektorzellen als auch Komplementfaktoren zur Vermittlung von Zytotoxizität zur Verfügung. Um zu untersuchen, ob die monoklonalen Antikörper Rituximab und 7D8-IgG1 B-Zell Depletion über FcR-vermittelte Effektoren oder über CDC vermitteln wurden in den Experimenten mit Vollblut zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Damit Vollblut während des Versuches nicht koaguliert wird ein Antikoagulanz zugegeben. Üblicherweise wird Heparin dazu verwendet. Allerdings wird CDC schon durch die Zugabe von Heparin in niedrigen Konzentrationen inhibiert (Almeda, *et al.* 1983; Bexborn, *et al.* 2009), weil Heparin Komplementfaktoren bindet und somit die Komplexbildung der Faktoren zur Vermittlung von CDC verhindert. Lepirudin (Refludan<sup>®</sup>) ist ein direkter Thrombin-Inhibitor und besitzt diese Eigenschaft nicht (Greinacher & Lubenow 2001).

## Ergebnisse

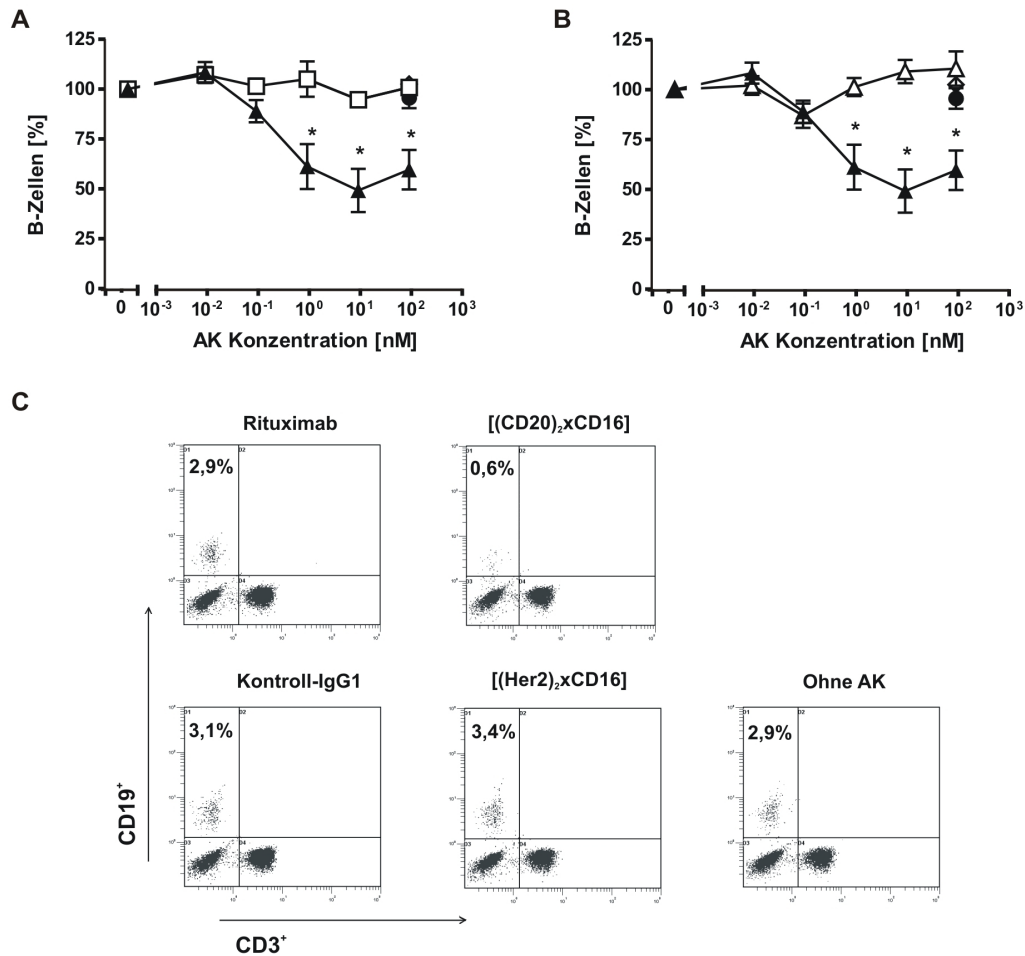
Zur Antikoagulation des Blutes wurde deshalb entweder 50 E/ml Heparin oder 50 µg/ml Lepirudin zugegeben. In den Ansätzen mit Lepirudin wurde somit das Potential der Antikörper zur Vermittlung von ADCC und CDC zusammen untersucht, während mit der Zugabe von Heparin ADCC-Aktivität gemessen wurde, wenn keine CDC möglich ist.



**Abbildung 28: Dosis-abhängige Depletion von B-Zellen aus mononukleären Zellen.** Die Fähigkeit der B-Zell Depletion von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) im Vergleich zu Rituximab (□) (A) und im Vergleich zu 7D8-IgG1 (△) (B) aus mononukleären Zellen von drei gesunden Spendern wurde getestet. Die Werte sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Kontroll-IgG1 (●), [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇).

In Untersuchungen zur B-Zell Depletion im Vollblut wurde beobachtet, dass der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-spezifische Tribody im Vergleich zu Rituximab und 7D8-IgG1 Depletion mit signifikantem Unterschied zeigte, wenn das Komplementsystem durch die Zugabe von Heparin inhibiert war (Abbildung 29). Der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] erreichte mit steigender Konzentration zunehmende B-Zell Depletion, die Plateaus maximaler Lyse erreichten. Während ungefähr 50-65% der B-Zellen durch das Antikörperderivat [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] depletiert wurden, konnte nur geringe Reduktion der B-Zellen mit 7D8-IgG1 bzw. keine Reduktion mit Rituximab beobachtet werden.

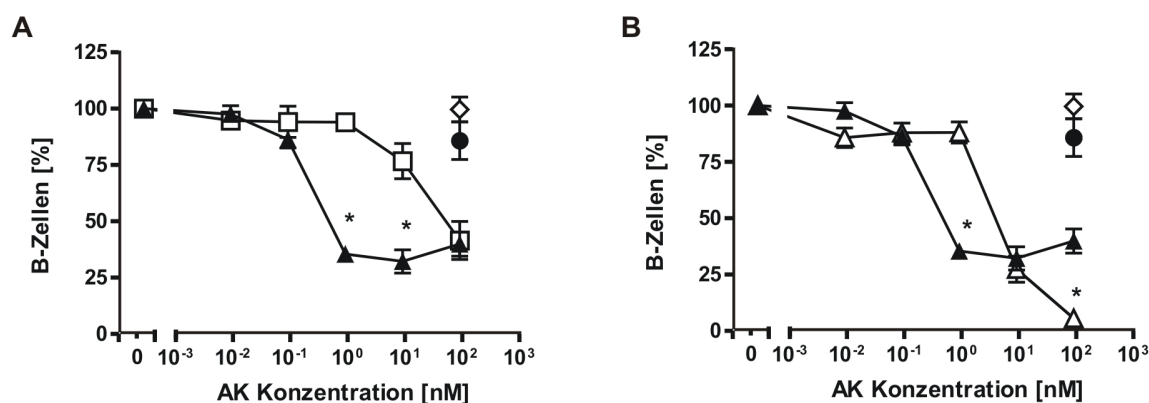
Wurde Lepirudin als Antikoagulant in den B-Zell Depletionen verwendet, das im Gegensatz zu Heparin Komplementaktivierung nicht beeinträchtigt, demonstrierten der bispezifische Tribody genauso wie die monoklonalen Antikörper starke B-Zell Depletion im Vollblut (Abbildung 30).



**Abbildung 29: B-Zell Depletion in Vollblut mit inhibiertem Komplementsystem.** Analyse der Dosis-abhängigen B-Zell Depletion von Rituximab (□) (A) und 7D8-IgG1 (△) (B) im Vergleich zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) aus Vollblut versetzt mit Heparin. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von fünf Experimenten. Unterschiede in der B-Zell Depletion mit statistischer Signifikanz sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Kontroll-IgG1 (●) und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇). (C) Punktdiagramme eines repräsentativen Experiments mit prozentualer Angabe der verbleibenden B-Zellen im linken, oberen Quadranten. Die Antikörper-Konzentration betrug 100 nM.

Mit einer niedrigen Konzentration von 1 nM depletierte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mehr als 60% der B-Zellen und blieb mit steigender Konzentration auf diesem Niveau. Um mit Rituximab die gleichen Effekte zu erreichen, musste eine 100-fach höhere Konzentration eingesetzt werden. Mit 7D8-IgG1 wurde ebenfalls erst in 10-fach höherer Konzentration eine vergleichbare Reduktion der B-Zellen beobachtet. Allerdings war es möglich mit einer Konzentration von 100 nM 7D8-IgG1 mehr als 90% der B-Zellen zu depletieren, während der bispezifische Tribody mit äquimolarer Konzentration keine höhere Depletion erreichte.

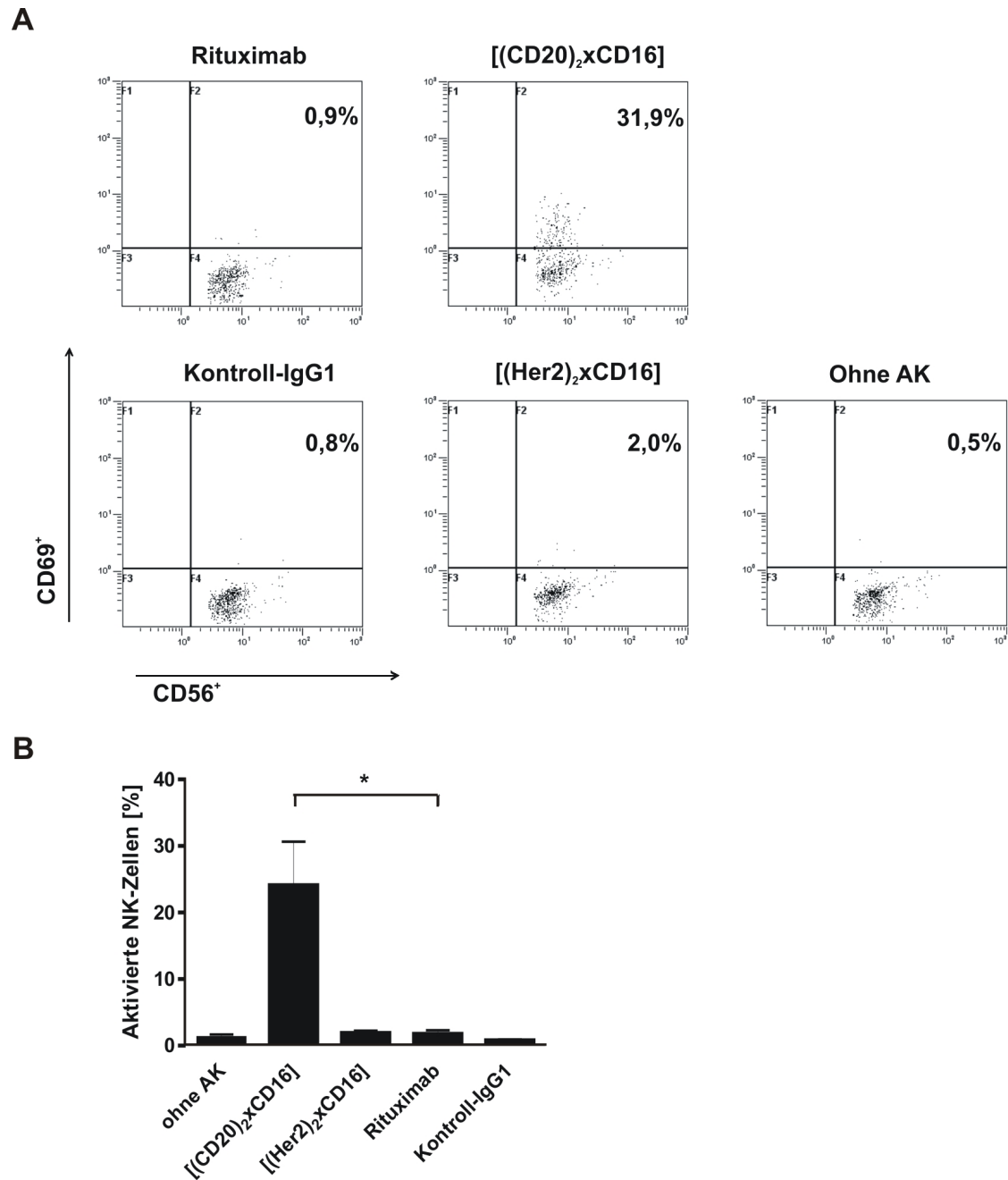
## Ergebnisse



**Abbildung 30: Autologe B-Zell Depletion in Vollblut mit aktivem Komplementsystem.** Analyse der Dosis-abhängigen B-Zell Depletion von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) gegen Rituximab (□) (A) und 7D8-IgG1 (△) (B) aus Vollblut versetzt mit Heparin. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von fünf Experimenten. Unterschiede in der B-Zell Depletion mit statistischer Signifikanz sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Kontroll-IgG1 (●) und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇).

Die monoklonalen Antikörper zeigten in den Ansätzen mit Lepirudin ab einer Konzentration von 10 nM eine Reduktion von B-Zellen, die bei 100 nM noch nicht in einem Maximum zu sein scheint. Im Vergleich dazu konnte in den Versuchen mit Heparin als Antikoagulant, in welchen Komplementaktivierung inhibiert war, keine oder nur geringe B-Zell Depletion beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die monoklonalen Antikörper effektive B-Zell Depletion hauptsächlich über die Rekrutierung von Komplementfaktoren induzierten. In beiden Versuchsansätzen erreichte die B-Zell Depletion des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribodies ab einer Konzentration von 1 nM ein Plateau maximaler Lyse. Die Aktivität des bispezifischen Moleküls war demnach unabhängig vom verwendeten Antikoagulant und wurde nur über die Rekrutierung von CD16-positiven Effektoren vermittelt.

Um zu zeigen, in welchem Ausmaß Rituximab und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in einer Konzentration von 100 nM in der Lage waren CD16a-positive NK-Zellen für die Eliminierung von B-Zellen zu aktivieren, wenn eine Induktion von CDC durch Heparin inhibiert war, wurden durchflusszytometrische Analysen zur Aktivierung von NK-Zellen durchgeführt. Die Hochregulierung von CD69 auf den Oberflächen von NK-Zellen ist ein Indiz für deren Aktivierung. Die Untersuchungen ergaben, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] effektiv NK-Zellen für die Depletion von B-Zellen rekrutierte, da CD69 auf den NK-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen hochreguliert wurde (Abbildung 31). Mit Rituximab wurde nur eine geringe Expression von CD69 auf den NK-Zellen gemessen. Der monoklonale Antikörper konnte in diesem Ansatz NK-Zellen nur geringfügig aktivieren.



**Abbildung 31: Nachweis der NK-Zell Aktivierung in Vollblut.** Die Aktivierung von NK-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie über die CD69 Expressionslevel bestimmt. Vollblut wurde mit Antikörpern in einer Endkonzentration von 100 nM 24 h inkubiert. **(A)** Punktdiagramme eines von vier unabhängigen Experimenten. Im rechten, oberen Quadranten jedes Punktdiagramms ist die Aktivierung der NK-Zellen in Prozent angegeben. **(B)** Auswertung der NK-Zell Aktivierung von 4 unabhängigen Experimenten. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Messungen mit statistisch signifikanten Unterschieden ( $p \leq 0,05$ ) sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet.

## Ergebnisse

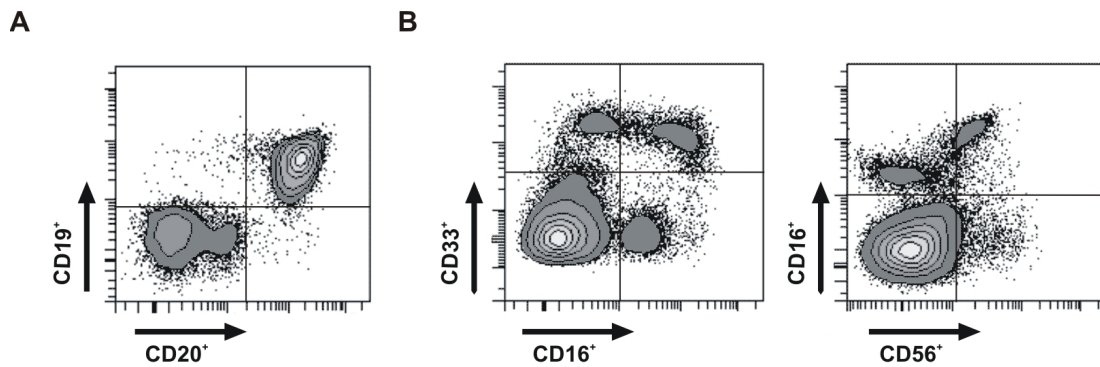
---

Die Unterschiede in den CD69-Expressionslevel durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab waren statistisch signifikant. Mit den Kontroll-Molekülen, einem irrelevanten IgG1 und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16], konnte keine Hochregulierung von CD69 beobachtet werden. Die Ergebnisse von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] lassen den Schluss zu, dass die alleinige Bindung an CD16 nicht ausreichte, um NK-Zellen zu aktivieren. Möglicherweise fand die Aktivierung der Effektorzellen präferentiell nur durch die simultane Bindung des Tribodies an NK-Zelle und B-Zelle statt.

### 3.1.4.6 *In vivo* Untersuchungen von B-Zell Depletion durch den Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Im Labor von Prof. Dr. Falk Nimmerjahn in Erlangen wurden in Kooperation Versuche mit so genannten „humanisierten Mäusen“ durchgeführt, um das zytotoxische Potential des in dieser Arbeit konstruierten Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] *in vivo* zu untersuchen. In der Regel sind Studien mit Primaten gut geeignet, um die therapeutische Aktivität und Anwendung eines CD20-gerichteten Moleküls *in vivo* zu testen. B-Zell Depletionsanalysen in Mäusen mit einem rekonstruierten, humanen Immunsystem können alternativ zu Versuchen mit Primaten verwendet werden. Im Rahmen von ersten Analysen neuer Moleküle bzw. des in dieser Arbeit konstruierten Tribodies können Versuche mit „humanisierten Mäusen“ ein Maß für die *in vivo* Aktivität des bispezifischen Moleküls darstellen.

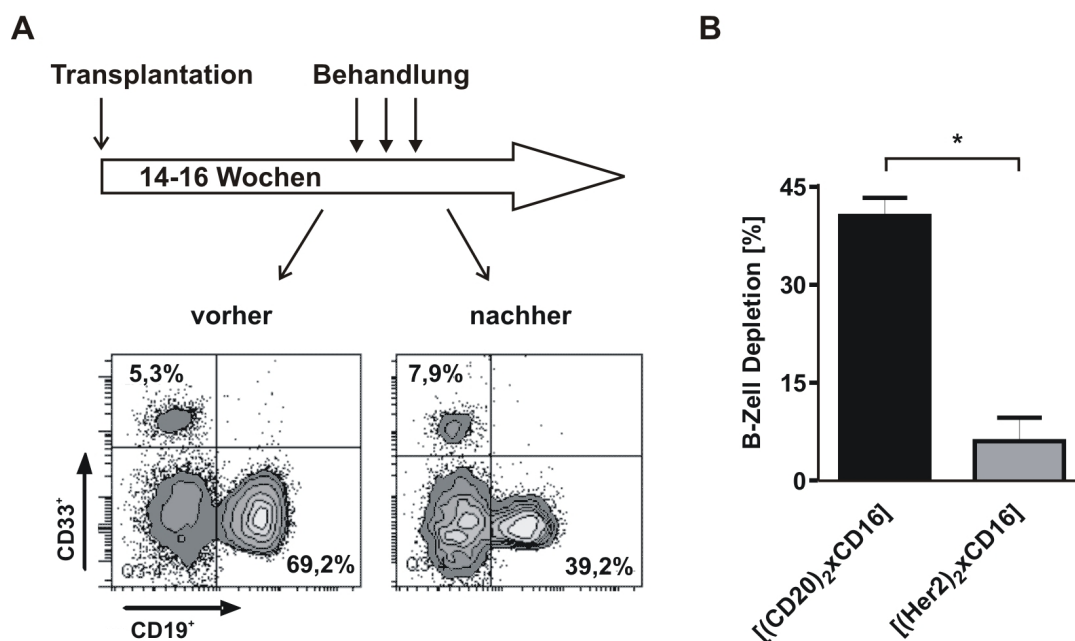
NOD SCID gamma c<sup>-/-</sup> Mäuse wurden im Alter von einem Tag mit hoch reinen, humanen CD34-positiven Nabelschnurzellen transplantiert, um in den Tieren ein Immunsystem mit humanen Effektoren zu rekonstruieren (Traggiai, *et al.* 2004). 14-16 Wochen nach der Transplantation wurde das periphere Blut dieser Mäuse auf die Existenz von humanen B-Zellen und CD16-positiven Effektorzellen analysiert. Neben CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> doppel-positiven B-Zellen wurden CD33<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> doppel-positive, myeloische Zellen und CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> doppel-positive NK-Zellen detektiert (Abbildung 32). Beide Zellpopulationen könnten in diesem *in vivo* präklinischen Modell als Effektoren für die B-Zell Depletion durch den [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Tribody dienen.



**Abbildung 32: Analyse des peripheren Blutes einer „humanisierten Maus“.** Das periphere Blut einer Maus mit rekonstruiertem, humanem Immunsystem wurde durchflusszytometrisch analysiert und exemplarisch dargestellt. **(A)** 14-16 Wochen nach der Transplantation waren CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> doppel-positive B-Zellen nachzuweisen. **(B)** Die Expression von CD16 auf CD56-positiven NK-Zellen und CD33-positiven myeloischen Zellen wurde analysiert.

Für die Studien wurden den „humanisierten Mäusen“ jeweils 100 µg [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] oder [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] Antikörperderivat an drei aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal appliziert. Einen Tag nach der letzten Injektion wurde die Zahl der B-Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch gemessen und mit der Ausgangszahl verglichen. Mit dem [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribody konnte statistisch signifikante und selektive B-Zell Depletion von ca. 43% beobachtet werden (Abbildung 33).

Die mit dem Kontroll-Molekül behandelte Mäuse zeigten nur geringe Reduktion der B-Zellzahl, was darauf hindeutet, dass für die Depletion eine Anvisierung über CD20 notwendig war. Wie zuvor mit den *in vitro* NK-Aktivierungen im Vollblut bereits gezeigt wurde, schien auch hier eine Bindung an CD16-positive Effektorzellen nicht auszureichen um Effektorzellen für die Depletion von B-Zellen zu aktivieren. Vermutlich wurde erst durch die gleichzeitige Bindung des Tribodies an Ziel- und Effektorzelle Zytotoxizität vermittelt. Da die bispezifischen Antikörperderivate weder mit murinem CD16 interagieren, noch direkte Effektorfunktionen und CDC vermitteln können, deutet die beobachtete B-Zell Depletion durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] auf die Rekrutierung von autologen, humanen CD16-positiven Effektorzellen hin.

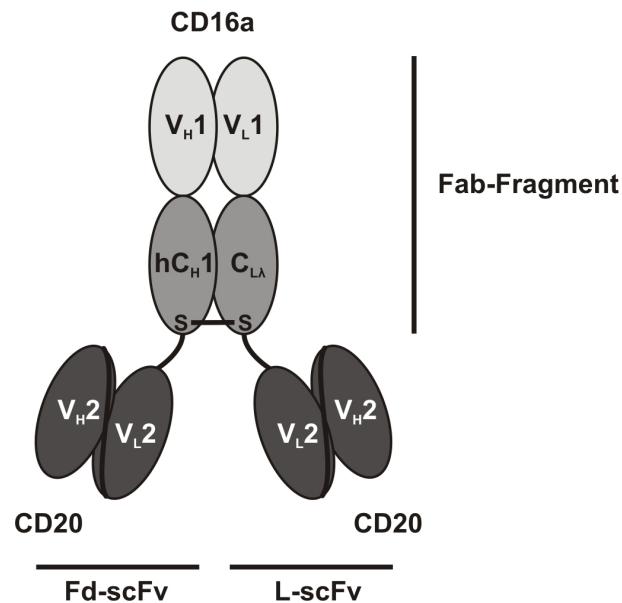


**Abbildung 33: B-Zell Depletion mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in „humanisierten Mäusen“.** (A) An drei aufeinander folgenden Tagen wurden jeweils 100 µg [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] oder Kontroll-Molekül [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] den Mäusen intraperitoneal appliziert. An Tag 4 nach der initialen Applikation wurde die B-Zell Depletion durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt sind die repräsentativen Dichtediagramme einer einzelnen Maus vor und nach der Behandlung. (B) Berechnete B-Zell Depletion durch Tribody-Moleküle. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SEM von jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

### 3.1.5 Einfluss des Epitops auf das zytotoxische Potential des Tribodies

Der bispezifische Antikörper [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zeigte in den vorangegangenen Analysen hohes lytisches Potential und war dem monoklonalen Antikörper Rituximab in der NK-Zell-vermittelten Lyse frisch isolierter Tumorzellen deutlich überlegen. NK-Zellen sind sehr potente Effektorzellen und können über CD16a anvisiert werden, um Zielzellen zu lysieren. Das im [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Tribody verwendete CD16-Fab-Fragment kann nicht zwischen CD16a und CD16b diskriminieren. CD16b wird auf neutrophilen Granulozyten exprimiert und ist ein *Trigger*-Molekül für Phagozytose. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob mit der Änderung des Epitops zur Erkennung von CD16a auch eine Änderung des zytotoxischen Potentials des Tribodies einhergeht. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der bispezifische Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] konstruiert. Das rekombinante Protein besitzt zum doppelten Anvisieren von Tumorzellen, genau wie [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], Bivalenz für CD20 über zwei scFvs. Monovalente Bindung an CD16a-positive NK-Zellen wird dem Molekül über das Fab-Fragment ermöglicht (Abbildung 34).





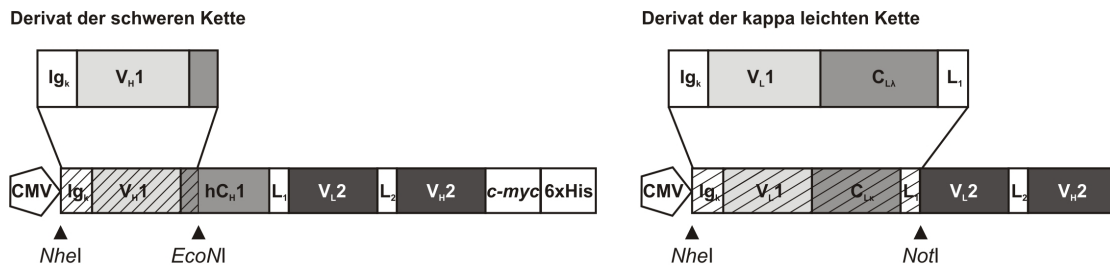
**Abbildung 34: Schema des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a].** V<sub>H1</sub>, V<sub>L1</sub>, variable Immunglobulinomänen der schweren bzw. leichten Kette spezifisch für CD16a; hC<sub>H1</sub>, konstante Immunglobulinomäne der schweren Kette; C<sub>Lλ</sub>, konstante Immunglobulinomäne der λ-leichten Kette; V<sub>H2</sub>, V<sub>L2</sub>, variable Domänen der schweren bzw. leichten Kette, die das CD20-spezifische scFv-Fragment bilden; S-S, Disulfidbrücke; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

### 3.1.5.1 Konstruktion, Expression und Reinigung des bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]

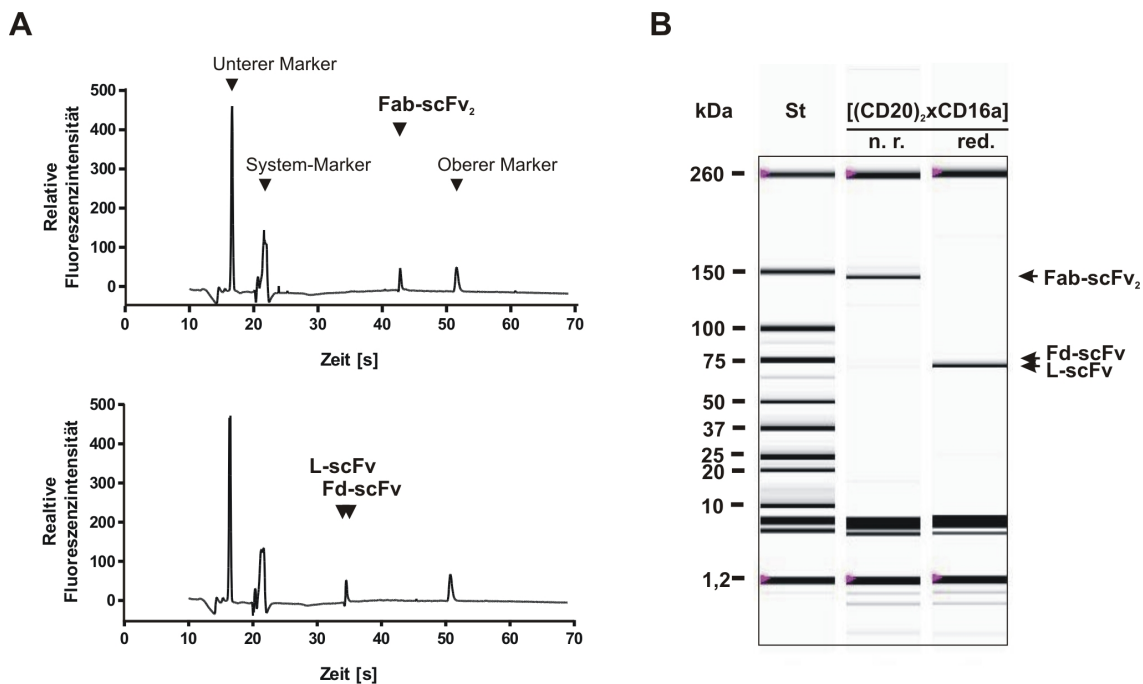
Die Expressionsvektoren pSecTag2-HC-CD16-VH-7D8scFv und pSecTag2-LC-CD16-VL-7D8scFv aus den vorangegangenen Studien wurden für die Konstruktion des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-spezifischen Tribodies herangezogen. Die variablen Immunglobulinketten für das CD16a-spezifische Fab-Fragment wurden durch Klonierung mit den CD16-spezifischen Sequenzen ausgetauscht. (Abbildung 35).

Die Expression und die Reinigung von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] wurden analog zum [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Molekül durchgeführt. Im zweistufigen Reinigungsprozess wurde im ersten Schritt anstatt der Affinitätsmatrix zur Isolierung von κ-leichten Ketten eine Lambda-(λ)-leichte Ketten-spezifische Affinitätsmatrix verwendet. Die Reinheit der Chargen wurde mit Kapillar-Elektrophorese bestimmt und betrug immer über 90% (Abbildung 36). Die Proteinausbeute lag bei 100-300 µg [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]/l Zellkulturüberstand.

## Ergebnisse



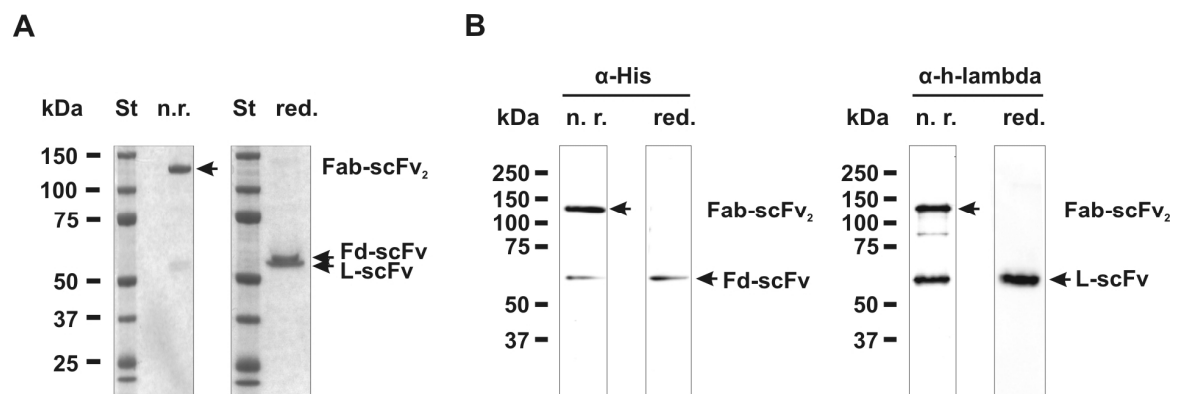
**Abbildung 35: Konstruktion des rekombinanten, bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a].** Schema der Expressionskassetten des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-Moleküls. Die schraffierten Regionen repräsentieren die [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-Sequenzen, die durch Klonierung ersetzt wurden. CMV, *cytomegalovirus immediate-early* Promotor; Ig<sub>k</sub>, kodierende Sequenz für das murine Ig κ-Sekretionssignal; V<sub>H1</sub>, V<sub>L1</sub>, cDNA-Sequenzen für die schwere bzw. leichte Kette der variablen Immunglobulinregionen spezifisch für CD16a; hC<sub>H1</sub>, cDNA-Sequenz für die schwere Kette der konstanten Immunglobulinregion 1; C<sub>λ</sub>, cDNA-Sequenz für die λ-leichte Kette der konstanten Region; V<sub>H2</sub>, V<sub>L2</sub>, cDNA-Sequenzen für die variable, schwere bzw. leichte Kette Region, die das CD20-spezifische scFv-Fragment bilden; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, cDNA-Sequenz für einen 15 AS langen (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> bzw. einen 20 AS langen (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> flexiblen Linker; *c-myc*, 6xHis = cDNA-Sequenz für das *c-myc*-Epitop oder Polyhistidin.



**Abbildung 36: Nachweis des gereinigten [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] mittels Kapillar-Elektrophorese.** (A) Elektropherogramme für [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] unter nicht reduzierenden Bedingungen (oben) und reduzierenden Bedingungen (unten). Als Fixpunkte und zur Proteinquantifizierung dienen interne Standards, jeweils die ersten beiden und der letzte Peak. (B) Berechnetes Ergebnis zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit. In der ersten Spur des berechneten Gels ist der Größenstandard (St) zu sehen, dessen Banden als Fixpunkte für die Proteinanalyse der Proben in Spur 2 und 3 dienen. Die oberste und mehrere untere Banden in den Proben Spuren waren interne Standards. Der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] ist nicht reduziert (Spur 2) und reduziert (Spur 3) dargestellt. St, Größenstandard; n. r. bzw. red., nicht reduzierende bzw. reduzierende Bedingungen; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

In Coomassie-gefärbten SDS-Gelen wurde das rekombinante Protein zusätzlich auf die Reinheit und die molekulare Masse analysiert. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] konnte als Fab-scFv<sub>2</sub> Fragment bei ca. 120 kDa im Gel bestimmt werden (Abbildung 37 A). Die berechnete molekulare Masse betrug 110 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen wurde der Tribody in zwei Proteine von ca. 60 kDa aufgetrennt, welche die Polypeptidketten Fd-scFv und L-scFv mit einer berechneten molekularen Masse von jeweils ca. 55 kDa repräsentierten. Um eine Aussage über die erfolgreiche Reinigung zu treffen, mussten die Intensitäten der Banden von Fd-scFv und L-scFv verglichen werden. Bei vergleichbaren Intensitäten kann davon ausgegangen werden, dass der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] als heterodimeres Molekül vorlag und die zweistufige Reinigung erfolgreich war.

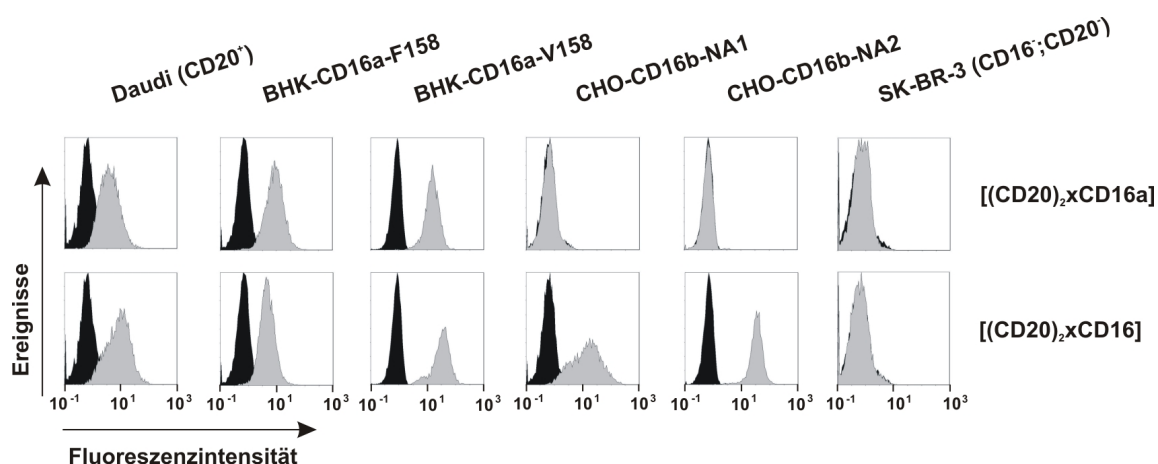
Western Blot Analysen und Immundetektion lieferten jeweils unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen spezifische Nachweise der einzelnen Fragmente. Das Fd-scFv Fragment wurde mit einem α-Pentahistidin Antikörper und das L-scFv Fragment mit einem α-human λ-leichte Kette Antikörper nachgewiesen (Abbildung 37 B). Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich ein Großteil der Polypeptidketten über stabile Disulfidbrücken kovalent verknüpft als heterodimeres Molekül.



**Abbildung 37: Nachweis der erfolgreichen Reinigung und der korrekten Zusammenlagerung von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a].** (A) Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurde der bispezifische Tribody als Heterodimer nachgewiesen. Mit nicht reduzierten Bedingungen waren die Polypeptidketten über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft im Gel zu finden. Unter reduzierenden Bedingungen wurde [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] in Fd-scFv und L-scFv Fragment getrennt. (B) Immundetektion der einzelnen Polypeptidketten auf Western Blot Membranen. Jeweils unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen erfolgte der Nachweis des Derivats der schweren Kette mit α-His und des Derivats der leichten Kette mit α-h-lambda. α-His, α-Pentahistidin Antikörper; α-h-lambda, humaner λ-leichte Kette Antikörper; red., reduzierende Bedingungen, n. r., nicht reduzierende Bedingungen; Fab, *fragment antigen binding*; Fd, *fragment difficult*; L, leichte Kette; scFv, *single-chain fragment variable*.

### 3.1.5.2 Vergleich der Bindungseigenschaften von $[(CD20)_2 \times CD16]$ und $[(CD20)_2 \times CD16a]$

Der gereinigte Tribody wurde mittels Durchflusszytometrie auf seine Bindungseigenschaften untersucht, welche mit dem Bindungsmuster von  $[(CD20)_2 \times CD16]$  verglichen wurde (Abbildung 38). Im Gegensatz zu  $[(CD20)_2 \times CD16]$  wurde erwartet, dass der  $[(CD20)_2 \times CD16a]$ -gerichtete Antikörper nicht an FcγRIIIb (CD16b) bindet. Bei CD16b wurde ein Polymorphismus mit zwei allelen Varianten nachgewiesen, NA1 und NA2, die von neutrophilen Granulozyten co-dominant exprimiert werden. Um den Unterschied in der CD16-Spezifität zwischen den beiden Tribodies herauszustellen, dienten in den Bindungsanalysen als Zielzellen CD20-positive Daudi Zellen, CD16a-F158- und CD16a-V158-transfizierte BHK-21 Zellen, CD16b-NA1- und CD16b-NA2-transfizierte CHO Zellen, sowie CD20-negative, Her2-positive SK-BR-3 Zellen zur Kontrolle. Der CD16a-gerichtete Tribody zeigte Bindung an Daudi Zellen und beide CD16a-transfizierten BHK-21 Zelllinien (Abbildung 38). Eine Bindung von  $[(CD20)_2 \times CD16a]$  an CD16b-NA1- und CD16b-NA2-transfizierte CHO Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen zeigte  $[(CD20)_2 \times CD16]$  zusätzlich zu dem bereits in vorangegangenen Studien gezeigte Muster Bindung an die CD16b-transfizierten CHO Zelllinien. Mit der Kontroll-Zelllinie SK-BR3 wurden bei beiden Antikörperderivaten keine Bindungen beobachtet. Die Untersuchungen ergaben die erwarteten Antigen-spezifischen Bindungsmuster von  $[(CD20)_2 \times CD16a]$  und  $[(CD20)_2 \times CD16]$ .



**Abbildung 38:** Spezifische Bindungsmuster von CD16- und CD16a-gerichteten Tribodies. Die Bindung von  $[(CD20)_2 \times CD16]$  und  $[(CD20)_2 \times CD16a]$  an Daudi, BHK-CD16a-F158, BHK-CD16a-V158, CHO-CD16b-NA1, CHO-CD16b-NA2 und SK-BR-3 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Schwarze Peaks repräsentieren die Kontrollen, graue Peaks das Signal der Zellen, die mit bispezifischen Molekülen bei einer Konzentration von 50 µg/ml inkubiert wurden. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit dem sekundären Antikörper Penta-His™ Alexa Fluor® 488.

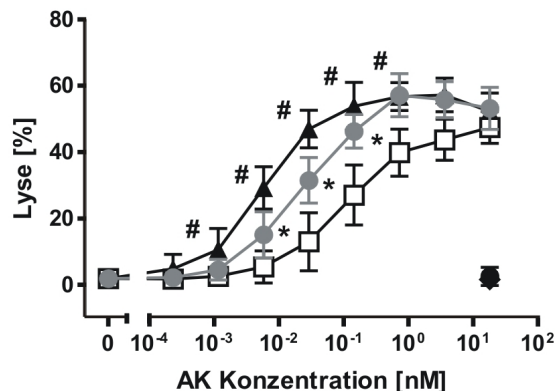
### 3.1.5.3 Vergleichende Untersuchung zur lytischen Aktivität der bispezifischen Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Da aus den vorangegangenen Experimenten mit dem Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] die Vermittlung von Proliferationsinhibition durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] nicht zu erwarten war, wurde ein Vergleich zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Induktion von ADCC und B-Zell Depletion angestellt, mit dem Ziel den Einfluss des erkannten CD16-Epitops zu untersuchen.

In <sup>51</sup>Cr Freisetzungsexperimenten wurde die Vermittlung von ADCC von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] miteinander verglichen. Das zytotoxische Potential von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] beruht in diesen Ansätzen ausschließlich auf die Rekrutierung von CD16a-positiven NK-Zellen. Für die Versuche wurden Daudi Zellen mit mononukleären Zellen gesunder Spender und mehreren Antikörper-Konzentrationen inkubiert. Außerdem wurden Rituximab, sowie Kontroll-Antikörper in den Versuchen mitgeführt. Daudi Zellen ließen sich Dosis-abhängig über die Vermittlung von ADCC von den CD20-spezifischen Antikörpern lysieren. Mit den Kontroll-Molekülen konnte keine Lyse höher als die NK-Zell Lyse ohne Antikörper beobachtet werden. Die Zytotoxizität erreichte mit zunehmenden Konzentrationen der CD20-Antikörper Plateaus maximaler Lyse, wobei sich die Antikörper deutlich in der Effizienz unterschieden (Abbildung 39).

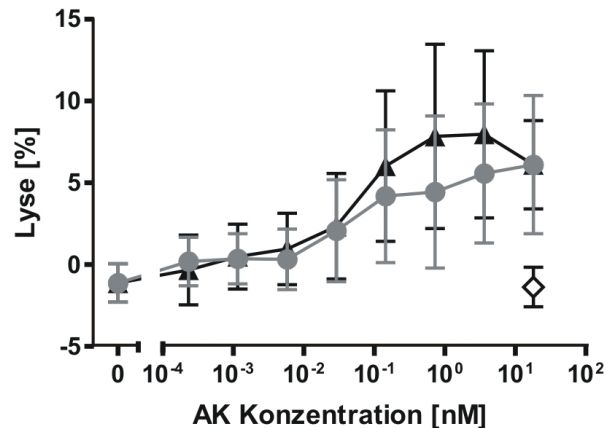
[(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] erreichte mit einer Maximal-Lyse von ca. 55% den gleichen Wert wie [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]. Im Vergleich zu Rituximab lagen die Plateaus maximaler Lyse ungefähr 1,2-fach höher. Das Ergebnis der statistischen Auswertung zeigte, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] in den niedrigen Dosen signifikant stärkere ADCC als Rituximab vermitteln kann. Das Ausmaß der Lyse war aber geringer als die durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] erzielte, lytische Aktivität. Wie in den vorangegangenen Studien zeigte der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Tribody signifikant höhere Zytotoxizität als Rituximab (Abbildung 39). Die berechnete, effektive Dosis der halbmaximalen Lyse, EC<sub>50</sub>, von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] war im Vergleich zu dem monoklonalen Antikörper wie in vorherigen Studien mit ca. 10 pM ungefähr 9-fach niedriger. Die EC<sub>50</sub> von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] lag mit ca. 25 pM 2,5-fach höher als die des CD16-gerichteten Tribodies.

Die Auswertung der Experimente zeigte, dass das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] Antikörperderivat schon im niedrigen, pikomolaren Bereich in der Lage ist effektiv Tumorzellen zu lysieren. Allerdings brachte die Rekrutierung von Effektorzellen aus der Fraktion mononukleärer Zellen über das CD16a-spezifische Epitop im Vergleich zum CD16a/b-spezifischen Epitop keine Verbesserung der ADCC-Aktivität.



**Abbildung 39: ADCC-Experimente zum Vergleich der lytischen Potentiale von CD20-gerichteten Antikörpermolekülen.** [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] (●), [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) und Rituximab (□) wurden auf ihre Dosis-abhängige Zytotoxizität getestet. Mononukleäre Zellen von vier gesunden Spendern wurden in einem E:T Verhältnis von 40:1 eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind entweder mit Sternchen (\*) ([[(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] zu Rituximab) oder Doppelkreuzen (#) ([[(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zu Rituximab) indiziert. [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇), Kontroll-IgG1 (●).

Deshalb wurden die lytischen Potentiale beider, CD20-gerichteter Tribody-Moleküle in weitem <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuchen verglichen. Im Vergleich zu Fraktionen mononukleärer Zellen waren bei der Verwendung von Vollblut gesunder Spender Komplementfaktoren und endogene Immunglobuline vorhanden. Außerdem waren neben CD16a- auch CD16b-positive Effektoren zur Rekrutierung durch das [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Molekül vorhanden. In diesen Experimenten zeigten sowohl [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] als auch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Dosis-abhängige Zytotoxizität mit Plateaus maximaler Lyse in höheren Konzentrationen (Abbildung 40). Das Ausmaß der ADCC war bei beiden Tribodies niedrig und die Werte der drei unabhängigen Versuche zeigten große Varianzen. Die Lysen durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Das Kontroll-Molekül war nicht in der Lage ADCC zu induzieren. In diesen Versuchen zeigte sich erneut, dass eine Rekrutierung über das CD16a-Epitop keinen Vorteil für die zytotoxische Aktivität eines Tribodies gegenüber dem CD16a/b-spezifischen Epitop hatte.



**Abbildung 40: Tribody-vermittelte Zytotoxizität in Vollblut im Vergleich.** Vollblut von gesunden Spendern wurde als Quelle von Effektorzellen mit Daudi Zellen als Zielzellen eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] (●) und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) inkubiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇).

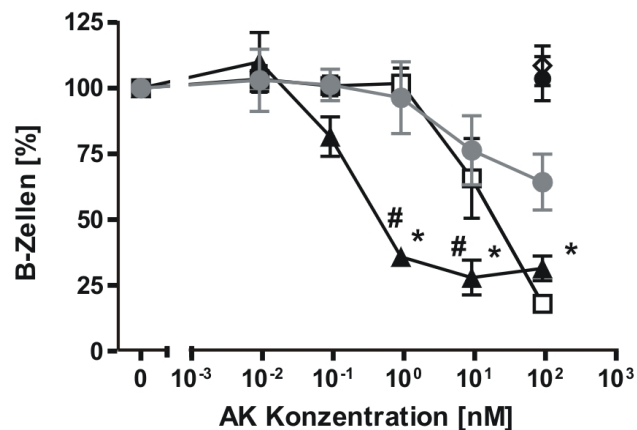
### 3.1.5.4 Analyse der B-Zell Depletion durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] im Vergleich

Für die Untersuchungen von B-Zell Depletion wurde Vollblut von gesunden Spendern verwendet, weil hier im Gegensatz zu Fraktionen mononukleärer Zellen sowohl CD16a- als auch CD16b-positive Effektorzellen, Komplementfaktoren und endogene Immunglobuline vorhanden waren. Die Versuche sollten klären, ob die Änderung des erkannten CD16-Epitops eines CD20-gerichteten Tribodies Einfluss auf das Potential zur B-Zell Depletion hat.

Zur Antikoagulation wurde Lepirudin zu den Ansätzen zugegeben, um CDC nicht zu inhibieren. Als zusätzliches Vergleichsmolekül wurde Rituximab verwendet. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Proben im Durchflusszytometer auf die Anzahl der verbleibenden B-Zellen (CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) analysiert. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] demonstrierte genauso wie [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab Depletion von B-Zellen im Vollblut (Abbildung 41). Das Ausmaß der Depletion erreichte unter den hier verwendeten Bedingungen kein Plateau maximaler Depletion. Mit der höchsten Konzentration erzielte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] eine Eliminierung der B-Zellen von ca. 40%. Der bispezifische Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] dagegen konnte bereits mit einer Konzentration von 1 nM bis zu 70% der B-Zellen depletieren. Die Unterschiede zwischen den Tribodies und auch zwischen [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab waren in den höheren Antikörper-Konzentrationen

## Ergebnisse

statistisch signifikant unterschiedlich (Abbildung 41). Rituximab war erst in höheren Konzentrationen zur effektiven Reduzierung der B-Zellen in der Lage. Mit einer Konzentration von 100 nM war die Depletion durch den monoklonalen Antikörper stärker als die des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Antikörperderivats.



**Abbildung 41: Vergleichende Analyse der B-Zell Depletion in Vollblut.** [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] (●), [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] (▲) und Rituximab (□) wurden in ihrer Fähigkeit zur Reduktion von B-Zellen im autologen System verglichen. Das Blut wurde mit Lepirudin versetzt, so dass Komplement-Aktivierung möglich war. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM von drei Experimenten dargestellt. Unterschiede in der B-Zell Depletion mit statistischer Signifikanz sind durch Sterne (\*) ([[(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]) oder Doppelkreuzen (#) ([[(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zu Rituximab) gekennzeichnet. Kontroll-IgG1 (●) und [(Her2)<sub>2</sub>xCD16] (◇).

Mit den Untersuchungen zum Einfluss der Änderung des erkannten Epitops von CD16 konnten zwei Fragen beantwortet werden. Erstens wurde gezeigt, dass mit dem Epitop zur Erkennung von CD16a NK-Zellen zur Lyse rekrutiert werden konnten. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] zeigte mit statistischer Signifikanz höhere Lyse von Daudi Zellen als Rituximab bei der Verwendung von mononukleären Zellen als Effektorpopulation. In den Experimenten mit Vollblut war [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] nicht in der Lage B-Zellen im gleichen Ausmaß zu depletieren, wie [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab.

Außerdem konnte mit diesen Versuchen geklärt werden, ob die gleichzeitige Rekrutierung von CD16b-positiven Effektoren hinderlich für die zytotoxische Aktivität des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribody war. Da [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] dem CD16a-spezifischen Tribody sowohl in den Versuchen zur Lyse von CD20-positiven Tumorzelllinien, als auch bei der Rekrutierung von autologen NK-Zellen zur B-Zell Depletion überlegen war, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass das verwendete CD16a-Epitop keinen Vorteil im Vergleich zum CD16a/b-spezifischen Epitop in der Aktivierung der Effektorzellen und damit für das zytotoxische Potential des Tribodies hatte.



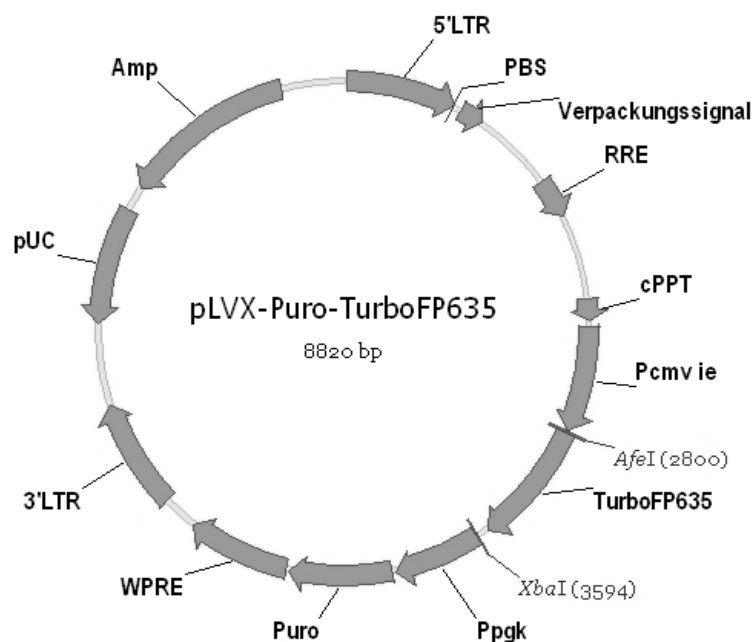
### 3.2 Vorarbeiten zur Etablierung eines xeno-transplantierten Mausmodells

Der bispezifische Antikörper [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] im Tribody-Format zeigte in den vorliegenden Analysen, dass das Molekül potente ADCC-Aktivität besitzt und auch im *in vivo* Modell effektiv B-Zellen eliminieren kann. Für eine weiterführende Charakterisierung soll ein *in vivo* Modell etabliert werden, welches Aufschluss darüber geben soll, inwieweit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Tumorwachstum beeinflussen und humane B-lymphatische Neoplasien eliminieren kann. Dafür sollen in NOD SCID gamma c<sup>-/-</sup> Mäusen durch intravenöse bzw. subkutane Injektion von humanen Burkitt Lymphom Zellen disseminierte bzw. lokale Tumore induziert werden. Kurze Zeit nach Injektion (1-2 Tage) soll zusammen mit humanen NK-Zellen oder mononukleären Zellen das therapeutische Agens injiziert werden. Durch *in vivo* bildgebende Verfahren soll das Tumorwachstum verfolgt und gezeigt werden, inwieweit das Anwachsen der Tumorzellen durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] verhindert werden kann.

Für die Wahl der Markierung zur bildgebenden Darstellung der Tumorzellen im Tier gibt es verschiedene Möglichkeiten. In der Literatur gibt es viele Studien mit Luziferase-transfizierten Tumorzelllinien im xeno-transplantierten Mausmodell (de Weers, *et al.* 2011). Diese Methode ist sehr effektiv, hat allerdings auch Limitierungen. Die Tumortragenden Tiere müssen kurz vor der *in vivo* Bildgebung synthetisches Luziferin-Substrat appliziert bekommen. In einem begrenzten Zeitfenster nach der Applikation können Aufnahmen der Tumore in der Maus gemacht werden. Dagegen würde die Verwendung von stabil markierten Tumorzelllinien mit einem fluoreszierenden Protein die Handhabung der *in vivo* Darstellung vereinfachen. Die Aufnahmen könnten wiederholt und ohne zeitliche Begrenzung durchgeführt werden. Das rot fluoreszierende Protein Katushka (TurboFP635) besitzt vorteilhafte Eigenschaften für diesen Versuchszweck. Mit einem Emissionsspektrum im „far-red“ Bereich (635 nm) eignet es sich besser zur Analyse tiefer liegender Bereiche im Gewebe als andere fluoreszierende Varianten (Shcherbo, *et al.* 2007). Dabei ist die Markierung der Tumorzellen stabil und hat in der Regel keinen Einfluss auf die ursprünglichen Eigenschaften der Tumorzellen. Das Wachstum der Tumore könnte somit verfolgt und quantitativ ausgewertet werden.

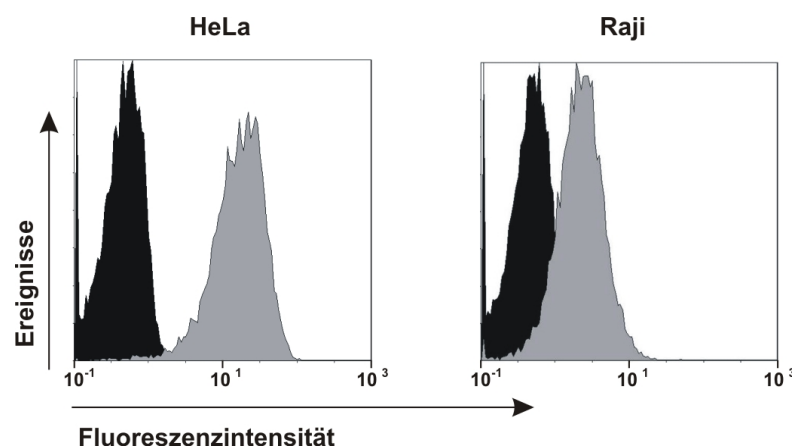
### 3.2.1 Herstellung von Zelllinien mit stabiler Expression von Katushka

Um rot fluoreszierende Zellen zu erhalten, bei welchen die Fluoreszenz in Tieren stabil bestehen bleibt, wurde virale Transduktion als Methode für das Einbringen der genetischen Information gewählt. Mit Hilfe von Lentiviren können kodierende Sequenzen in 1- bis 100-facher Kopie stabil ins Genom von Zellen integrieren. Zunächst wurde der lentivirale Expressionsvektor für Katushka, pLVX-Puro-TurboFP635 hergestellt (Abbildung 42). Dazu wurde die kodierende Sequenz für das rot fluoreszierende Protein aus dem Vektor pTurboFP635 über die Restriktionsschnittstellen *AfeI* und *XbaI* kloniert und der konstruierte Expressionsvektor zur Überprüfung sequenziert. Der Zielvektor pLVX-Puro enthielt alle viralen Prozessierungselemente, die für die effiziente Produktion von replikationsinkompetenten Lentiviren notwendig waren.



**Abbildung 42: Karte des lentiviralen Expressionsvektors.** Die kodierende Sequenz für Katushka (TurboFP635) wurde über die Restriktionendonukleaseschnittstellen *AfeI* und *XbaI* in den viralen Vektor pLVX-Puro kloniert. Die Expression von Katushka wird durch den *cytomegalovirus immediate-early* Promotor ( $P_{CMV IE}$ ) reguliert. 5'LTR, 3'LTR, 5' bzw. 3' lange, terminale Repetitionen; PBS, Primer-Bindestelle; RRE, *Rev-response element*; cPPT, *central polypurine tract*;  $P_{pgk}$ , Phosphoglyceratekinase-Promotor, Puro, Resistenzgen für Puromycin; WPRE, *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; pUC, Replikationsursprung; Amp, Resistenzgen für Ampicillin

Die genetische Information wurde anschließend in Lentiviren verpackt, mit welchen verschiedene Zelllinien transduziert wurden. Zur Selektion der transduzierten von nicht transduzierten Zellen wurden diese mit Puromycin als Selektionsantibiotikum kultiviert. Zur Etablierung der Methode wurde die adhärenzte Zelllinie HeLa verwendet. Ein Verhältnis von Anzahl der infektiösen Viruspartikel zu Zellzahl (*multiplicity of infection*, MOI) von 5 stellte sich als effizient heraus. Für das zu etablierende Tiermodell wurde die Burkitt Lymphomzelllinie Raji mit den Lentiviren infiziert. In durchflusszytometrischen Analysen wurde die Fluoreszenz in den transduzierten Zellen gegen nicht transduzierte Zellen nachgewiesen (Abbildung 43).

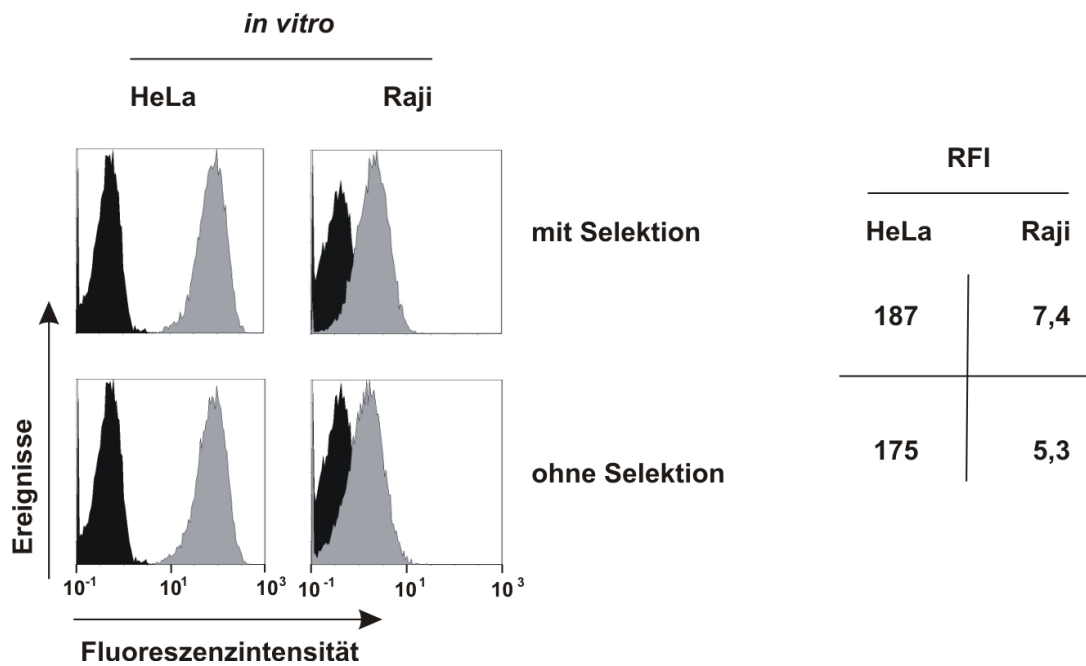


**Abbildung 43: Nachweis der Fluoreszenz in transduzierten Zellen.** Mittels Durchflusszytometrie wurde der Erfolg der viralen Transduktion bei HeLa und Raji Zellen (graue Peaks) gegen nicht transduzierte Zellen gezeigt (schwarze Peaks).

### 3.2.2 Stabilitätsnachweis der roten Fluoreszenz transduzierter Zellen

Eine der entscheidenden Eigenschaften der fluoreszierenden Zellen für das Tiermodell ist die Stabilität der Fluoreszenz auch ohne Selektionsantibiotikum. Es existiert die Möglichkeit, dass die genetische Information zur Expression von Katushka zum Beispiel durch Methylierung oder durch genetische Rekombination stillgelegt wird oder verloren geht. Zur Untersuchung, ob die transduzierten Zellen auch nach Absetzen der Selektion mit Puromycin noch mit der gleichen Intensität fluoreszieren, wurden durchflusszytometrische Experimente mit HeLa<sub>Kat</sub> und Raji<sub>Kat</sub> Zellen durchgeführt. Bei beiden Zelllinien wurde keine signifikante Reduktion der roten Fluoreszenz gemessen (Abbildung 44).

## Ergebnisse

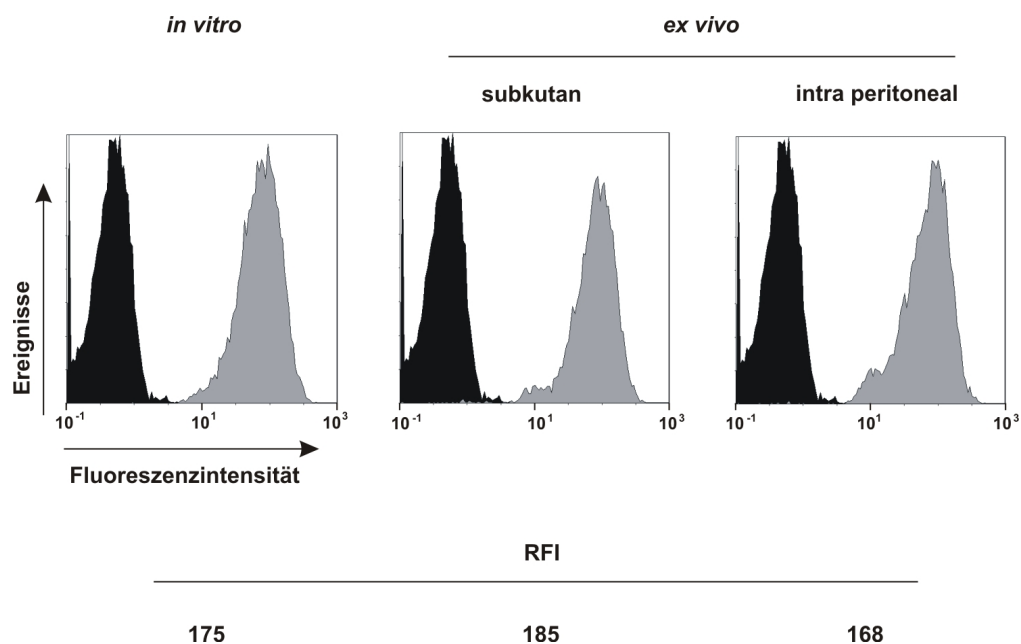


**Abbildung 44: Nachweis der stabilen Fluoreszenz in transduzierten Zellen *in vitro*.** Mit durchflusszytometrischen Analysen wurden transduzierte HeLa und Raji Zellen auf die Stabilität der roten Fluoreszenz mit und 14 Tage (HeLa) bzw. 30 Tage (Raji) ohne Selektionsantibiotikum getestet. Graue Peaks, transduzierte Zellen; schwarze Peaks, nicht transduzierte Zellen; RFI, relative Fluoreszenzintensität.

Sowohl bei HeLa<sub>Kat</sub> Zellen, die 14 Tage ohne die Zugabe von Puromycin kultiviert wurden, als auch bei Raji<sub>Kat</sub> Zellen, die 30 Tage nicht unter Selektionsdruck standen, zeigte der Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI), dass die Fluoreszenz nur marginal zurück gegangen war. Die viral transduzierten Zellen zeigten im beobachteten Zeitraum auch ohne Zugabe von Selektionsantibiotikum stabile Expression des fluoreszierenden Proteins Katushka.

Für die geplanten Tierversuche ist es entscheidend, dass die Stabilität der roten Fluoreszenz auch *in vivo* bestehen bleibt, damit das Tumorwachstum über einen längeren Zeitraum präzise über die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wiedergegeben wird. Um zu klären, wie sich die Fluoreszenz der Zellen durch eine *in vivo* Passage ohne Selektionsantibiotikum verändert, wurden HeLa<sub>Kat</sub> Zellen auf zwei verschiedene Arten in eine NOD SCID Maus injiziert. Der Maus wurden intraperitoneal  $5 \times 10^6$  HeLa<sub>Kat</sub> und 7 Tage später subkutan  $5 \times 10^5$  HeLa<sub>Kat</sub> appliziert. 12 Tage nach der initialen Applikation wurden die beiden Tumore unter sterilen Bedingungen entnommen, die Zellen vereinzelt und als Zellkultur ohne Selektionsantibiotikum angelegt. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die Zellen im Vergleich zu HeLa<sub>Kat</sub> und nicht transduzierten HeLa durchflusszytometrisch auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass

HeLa<sub>Kat</sub> nach 12 Tagen in der Maus und weiteren 14 Tagen *ex vivo* ohne Puromycin kultiviert mit der gleichen Intensität fluoreszieren, wie HeLa<sub>Kat</sub>, die 14 Tage mit Puromycin und nicht *in vivo* passagiert wurden (Abbildung 45). Daraus konnte der Rückschluss gewonnen werden, dass die Expression von Katushka und damit auch die rote Fluoreszenz der Tumorzellen über den untersuchten Zeitraum stabil bleibt, wenn die Zellen im Tier ohne Selektionsantibiotikum anwachsen. Für die geplanten Tierversuche bedeutet dieses Ergebnis, dass wahrscheinlich proportional zur Messung der Fluoreszenzintensität eine Verfolgung des Tumorstadiums in Mäusen über einen längeren Zeitraum möglich sein könnte.



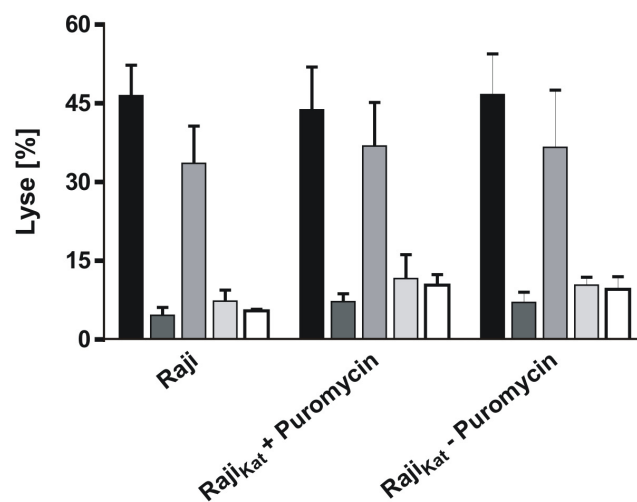
**Abbildung 45: Nachweis der stabilen Fluoreszenz in HeLa<sub>Kat</sub> *ex vivo*.** Mittels Durchflusszytometrie die Stabilität der Fluoreszenz von transduzierten HeLa (HeLa<sub>Kat</sub>) nach 14 Tagen ohne Selektionsantibiotikum getestet. Graue Peaks, transduzierte Zellen; schwarze Peaks, nicht transduzierte Zellen; RFI, relative Fluoreszenzintensität.

### 3.2.3 Einfluss der viralen Transduktion auf das Verhalten von Raji<sub>Kat</sub> in <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuchen

Bei der viralen Transduktion kann nicht genau gesteuert werden, an welcher Stelle im Genom der Zielzelle die Integration der viral eingeschleusten DNA stattfindet (Muller & Varmus 1994). Der stabile Einbau der genetischen Information von Katushka in Raji Zellen könnte somit die Eigenschaften der Zellen bezüglich ihres Verhaltens in Zytotoxizitätsversuchen verändert haben. Damit die Daten aus den bisherigen *in vitro*

## Ergebnisse

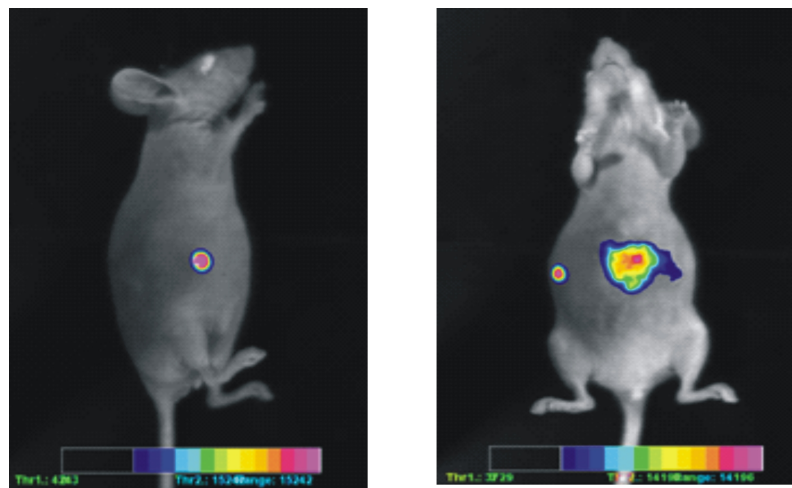
Experimenten mit den geplanten *in vivo* Analysen verglichen werden können, sollte geklärt werden, ob sich die Sensitivität von Raji<sub>Kat</sub> zur Lyse im Vergleich zu nicht transduzierten Raji Zellen in <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuchen verändert hat. Außerdem wurde der Einfluss der Puromycin-Selektion auf das lytische Verhalten untersucht, indem Raji<sub>Kat</sub> vor dem Versuch 14 Tage ohne Selektionsantibiotikum kultiviert wurden. In ADCC-Experimenten wurden dazu die verschiedenen Raji Zellen mit mononukleären Zellen von gesunden Spendern und Verdünnungen von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], Rituximab und entsprechenden Kontroll-Molekülen inkubiert. Die Auswertung ergab, dass sich mit dem [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Tribody alle Zelllinien gleich stark lysieren ließen (Abbildung 46). Auch mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab ließen sich in den Ansätzen der verschiedenen Zellen gleiche Lyse-Werte messen. Die Kontroll-Antikörper zeigten wie erwartet geringe Lysen, die vergleichbar mit den Messwerten der Lyse ohne Antikörper waren. Insgesamt zeigten die viral transduzierten Raji<sub>Kat</sub> Zellen keine signifikant unterschiedlichen Lysen im Vergleich zu nicht transduzierten Raji. Auch die Verwendung des Selektionsantibiotikums hatte keinen Einfluss auf das Verhalten von Raji<sub>Kat</sub> in den Zytotoxizitätsversuchen. Die in dieser Arbeit hergestellten, stabil rot fluoreszierenden Raji<sub>Kat</sub> Zellen wären demzufolge zur Etablierung von disseminierten Tumoren in dem geplanten Tiermodell wahrscheinlich gut geeignet, da sie sich in ihrem ADCC-Verhalten nicht von nicht transduzierten Raji Zellen unterscheiden.



**Abbildung 46: ADCC-Experimente zum Vergleich des lytischen Verhaltens verschiedener Raji Zellen.** Raji, Raji<sub>Kat</sub> mit und Raji<sub>Kat</sub> ohne Puromycinselektion wurden auf ihre Eigenschaft zur Lyse untersucht. Die Endkonzentration der Antikörper betrug 20 nM. Mononukleäre Zellen von vier gesunden Spendern wurden in einem E:T Verhältnis von 40:1 eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], schwarze Balken; [(Her2)<sub>2</sub>xCD16], dunkelgraue Balken; Rituximab, mittelgraue Balken, Kontroll-IgG1, hellgraue Balken; ohne Antikörper, weiße Balken.

### 3.2.4 Nachweis der rot fluoreszierenden Zellen in der Maus mittels *in vivo* Imaging

In Zusammenarbeit mit Dr. Tiwari, vom Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie am Uniklinikum Schleswig-Holstein in Kiel, sollten als Vorarbeit zur Etablierung des geplanten Tiermodells erste Messungen zur *in vivo* Bildgebung durchgeführt werden. Katushka sollte durch das Emissionsspektrum im „far red“ Bereich gut in Mäusen detektiert werden können. Dazu wurde einer NOD SCID Maus intraperitoneal  $5 \times 10^6$  HeLa<sub>Kat</sub> und 7 Tage später subkutan  $5 \times 10^5$  HeLa<sub>Kat</sub> appliziert. 12 Tage nach der initialen Applikation wurden Lichtbild- und Fluoreszenzaufnahmen des Tiers jeweils auf der Seite oder auf dem Rücken liegend im *Berthold LB983 NightOwl optical imager* gemacht und anschließend übereinander gelagert (Abbildung 47). Die Aufnahmen zeigten deutlich zwei Stellen mit unterschiedlich starker Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität auf den Aufnahmen korrelierte dabei mit der Lage und der Größe der Tumore, die nach dem bildgebenden Verfahren betrachtet und für die oben aufgeführten Untersuchungen entnommen wurden. Die intraperitoneal applizierten HeLa<sub>Kat</sub> hatten sich in 12 Tagen zu einem größeren, soliden Tumor vermehrt, der unterhalb des Zwerchfells saß (Abbildung 47, rechte Aufnahme).



**Abbildung 47: Optische Detektion von HeLa<sub>Kat</sub> Tumoren in einer Maus.** Die Bilder sind Überlagerungen von photographischen Aufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen. Eine weibliche NOD SCID Maus wurde 12 Tage nach der Applikation von intraperitoneal und subkutan applizierten HeLa<sub>Kat</sub> im *Berthold LB983 NightOwl optical imager* auf Fluoreszenz untersucht. Für die Fluoreszenzaufnahmen betrug die Anregungswellenlänge 550 nm, die Emissionswellenlänge betrug 605nm. Die Aufnahmezeit war 1 s. Im linken Bild lag die Maus auf der linken Körperseite, im rechten auf dem Rücken.

Subkutan in der rechten Flanke saß bei dem Tier ein weiterer Tumor, der sich aus den subkutan applizierten HeLa<sub>Kat</sub> gebildet hatte und entsprechend seiner Größe

## Ergebnisse

---

fluoreszierte. Das bildgebende Verfahren zur Messung der Fluoreszenzintensität durch das Protein Katushka in Tumorzellen in Korrelation mit der Tumorgröße war in diesem Modell möglich.

Die in dieser Arbeit getätigten Versuche sollten zur Etablierung eines Tiermodells beitragen, in welchem das Wachstum von rot fluoreszierenden Tumoren mittels *in vivo* bildgebendem Verfahren verfolgt werden soll. Es konnte gezeigt werden, dass viral transduzierte Tumorzellen ohne die Zugabe von Selektionsantibiotikum auch nach einer *in vivo* Passage stabil rot fluoreszieren und die Transduktion die Sensitivität zur Lyse der Tumorzellen nicht veränderte. Mit dem *Berthold LB983 NightOwl optical imager* konnten erste Versuche zur *in vivo* Bildgebung durchgeführt werden, die den Schluss zulassen, dass das Tumorstadium proportional zur gemessenen Fluoreszenzintensität verfolgt werden kann. Die vielversprechenden Ergebnisse zeigten, dass die Etablierung eines solchen Tiermodells möglich scheint.



## 4 Diskussion

Die Einführung monoklonaler Antikörper als neue therapeutische Strategie zusätzlich zu den bisher verwendeten Standardbehandlungen von hämatologischen Neoplasien hat das Überleben der Patienten deutlich verbessert (Adams & Weiner 2005; Sehn, *et al.* 2005; Salles 2007). Trotz der mit Antikörpern, wie dem chimären CD20-Antikörper Rituximab, erzielten Erfolge sprechen nicht alle Patienten auf eine Behandlung an (McLaughlin, *et al.* 1998). Deshalb ist eine Optimierung der CD20-gerichteten Therapie wünschenswert. Eine Möglichkeit zur Steigerung der Effizienz ist der Einsatz von neuen Antikörpermolekülen (Lim, *et al.* 2009). Eine vielversprechende Strategie könnte hier die Verwendung von bispezifischen Antikörpern sein, welche aufgrund der Kombination von zwei Bindungsstellen Effektorzellpopulationen gezielt anvisieren und aktivieren können (van Spriël, *et al.* 2000).

In dieser Arbeit wurden die Effektormechanismen eines rekombinanten, bispezifischen Antikörpers im Tribody-Format, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], im Vergleich zu Rituximab analysiert. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] wurde konstruiert, um effektiv und selektiv ADCC als einzigen Wirkmechanismus zu induzieren, während Rituximab sowohl ADCC, als auch CDC und antiproliferative Effekte vermitteln kann. Zytotoxizitätsversuche mit humanen Lymphomzelllinien und frisch isolierten Tumorzellen zeigten, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] dem konventionellen CD20-Antikörper Rituximab in der Vermittlung antitumorale Effekte überlegen war. Diese Überlegenheit wurde in B-Zell Depletionsexperimenten bestätigt. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] depletierte autologe B-Zellen aus Vollblut in höherem Maß als Rituximab und der parentale 7D8-IgG1.

Untersuchungen zum Einfluss des CD16-Epitops des Tribodies ergaben, dass eine selektive Rekrutierung von CD16a-positiven Effektoren mit dem hier zur Verfügung stehenden CD16a-Fab-Fragment keinen Vorteil für das zytotoxische Potential des Tribodies im Vergleich zur Rekrutierung von CD16a- und CD16b-positiven Effektoren brachte.

In Mäusen, in welchen durch Transplantation von humanen, CD34-positiven Stammzellen aus Nabelschnurblut ein humanes Immunsystem rekonstruiert wurde, konnten erste Analysen zur *in vivo* Aktivität des Tribodies durchgeführt werden. [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] war in der Lage, autologe B-Zellen in diesen Tieren zu depletieren.

### 4.1 Bispezifische Antikörper im Tribody-Format als geeignete Anti-Tumor-Wirkstoffe

Ein Tribody besteht aus einem Fab-Fragment, das als Heterodimerisierungsdomäne dient, und an welches genetisch zwei scFvs fusioniert sind (Schoonjans, *et al.* 2000). Die molekulare Masse des Moleküls ist kleiner als das eines konventionellen Antikörpers, wodurch eine höhere Tumorgängigkeit erreicht werden könnte (Nugent & Jain 1984; Pluen, *et al.* 2001).

Die scFvs des Tribodies in dieser Arbeit sind ausschließlich gegen CD20 gerichtet. Es wurde bereits mit anderen Antikörpern und bispezifischen Antikörpern gezeigt, dass eine doppelte Anvisierung von Tumorzellen zu einer verstärkten, Effektorzell-vermittelten Tumorzelllyse führt (Tang, *et al.* 2007; Kellner, *et al.* 2008). In diesen Studien wurden Moleküle mit monovalenter und bivalenter Bindung des Tumorantigens verglichen. Bei den Antikörpern mit bivalenter Bindung des Tumorantigens lag die  $EC_{50}$  10- bis 20-fach niedriger als bei den monovalenten Molekülen. Mit der heterodimeren Struktur des trivalenten Antikörperderivats im Tribody-Format bietet sich außerdem die Möglichkeit, Tribodies mit Spezifitäten für zwei verschiedene Zielantigene auf Tumorzellen zu generieren (Schoonjans, *et al.* 2000). Das Prinzip, die Spezifität eines CD20-gerichteten scFvs gegen eine andere Zielstruktur auf B-Zellen, wie zum Beispiel CD19, CD22 oder CD37, auszutauschen, wurde schon bei anderen rekombinanten Antikörperderivaten erfolgreich angewandt (Qu, *et al.* 2008).

### 4.2 Immunogenität von Antikörpern

Klinische Studien zeigen, dass Patienten Immunantworten gegen therapeutische Antikörper entwickeln können. Die Verwendung von murinen Antikörpern verursacht die Bildung von HAMAs oder HARAs, welche die Wirkung von monoklonalen Antikörpern neutralisieren können (Schroff, *et al.* 1985; Shawler, *et al.* 1985). Durch Entwicklung von chimären, humanisierten oder humanen Antikörpern konnte die Immunogenität in einigen Fällen reduziert werden. Bei der Behandlung mit dem chimären Antikörper Rituximab entwickelten 30 bis 50% der Patienten mit Autoimmunerkrankungen humane Anti-Chimäre-Antikörper (HACAs; Byrd, *et al.* 1999; Byrd, *et al.* 2001; Maeda, *et al.* 2001; Eisenberg & Looney 2005). Allerdings könnte die Entwicklung von HACAs in Abhängigkeit von der Erkrankung, zum Beispiel bei Lymphom-Patienten, geringer ausfallen. Außerdem wird diskutiert, ob Anti-Therapeutikum-Antikörper die Effektivität

von therapeutischen Molekülen in allen Fällen verringert oder nachteilige Effekte auf die erneute Verabreichung des Medikaments hat (Getts, *et al.* 2010).

Die Immunogenität von bispezifischen Antikörpern ist schwierig einzuschätzen. Der 2009 zugelassene, gegen EpCAM- und CD3-gerichtete Triomab Catumaxomab setzt sich aus einer  $\kappa$ -leichten Kette und einer IgG2a schweren Kette der Maus und einer  $\lambda$ -leichten Kette und einer IgG2b schweren Kette der Ratte zusammen. Obwohl in Studien mit diesem bispezifischen Antikörper bei 87% der Patienten HAMAs/HARAs zu finden waren, konnte keine Reduktion der therapeutischen Wirkung durch dieselben nachgewiesen werden (Seimetz, *et al.* 2010). Für das [CD19xCD3]-gerichtete BiTE-Molekül Blinatumomab wurden in klinischen Studien in Patienten bisher keine neutralisierenden Antikörper gefunden, obwohl die V-Regionen, die zur Konstruktion des bispezifischen Antikörpers verwendet wurden, murinen Ursprungs sind (Bargou, *et al.* 2008). Im Fall der hier untersuchten Tribodies waren die V-Regionen des CD16-gerichteten Fab-Fragments murinen Ursprungs und die des CD20-gerichteten scFvs human. Außerdem befindet sich am Derivat der schweren Kette C-terminal eine Polyhistidin-Markierung, die potentiell immunogen sein könnte. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente dieser Arbeit konnten keine Aussagen zur Entwicklung von Anti-Therapeutikum-Antikörper getroffen werden. Bezogen auf die vorliegenden klinischen Studien anderer bispezifischer Antikörper ist es rein hypothetisch möglich, dass Patienten Antikörper auf die Behandlung mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] entwickeln. Dieses Problem könnte eventuell reduziert werden, indem man die V-Regionen des CD16-gerichteten Fab-Fragments humanisiert. Die Technik für die Umsetzung ist bereits etabliert (Peipp, *et al.* 2011). Außerdem könnte die Polyhistidin-Markierung am Molekül entfernt werden. Dazu müsste die zweistufige Reinigung des Tribodies zur Gewährleistung der Heterodimerität umgestellt werden. Der erste Reinigungsschritt mit einer Affinitätsmatrix für die  $\kappa$ -leichte Kette bliebe unverändert. Aber anstatt der Verwendung von Matrix für die Polyhistidin-Markierung im zweiten Reinigungsschritt könnte eine Affinitätsmatrix für die C<sub>H</sub>1-Domäne verwendet werden, um die Derivate der schweren Kette zu isolieren.

### 4.3 Effektormechanismen des Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Therapeutische Antikörper können über verschiedene Mechanismen antitumorale Effekte vermitteln. Für konventionelle CD20-Antikörper werden CDC und vor allem ADCC über die Bindung an FcR als wichtige Effektormechanismen *in vivo* diskutiert

## Diskussion

---

(Glennie, *et al.* 2007). Daten aus *in vivo* Studien mit Mäusen zeigten, dass unabhängig von der Tumorlast CDC eine Rolle für die antitumorale Aktivität von CD20-Antikörpern spielt (Boross, *et al.* 2011). Welche Bedeutung CDC als Wirkmechanismus von CD20-Antikörpern in Patienten zukommt, ist unklar. Dagegen wurde mit *in vivo* Modellen und in klinischen Studien gezeigt, dass FcR-vermittelte Mechanismen wichtig für eine erfolgreiche Tumorthherapie mit Rituximab sind. In Tierstudien stellte sich heraus, dass das Verhältnis der Bindung von Fc-Domänen an aktivierende bzw. inhibitorische FcRs (A:I Ratio) eine wichtige Rolle für die therapeutische Aktivität von Antikörpern spielt (Nimmerjahn & Ravetch 2005). In Mäusen, die infolge fehlender, gemeinsamer  $\gamma$ -Kette keine aktivierenden Fc $\gamma$ R auf der Zelloberfläche exprimierten oder bei welchen die Signalgebung der  $\gamma$ -Kette aufgrund einer Mutation inhibiert war, zeigte Rituximab stark reduzierte Aktivität (Clynes, *et al.* 2000; de Haij, *et al.* 2010). Außerdem konnte in klinischen Studien ein Einfluss des Fc $\gamma$ RIIIa-Polymorphismus auf die therapeutische Aktivität von Rituximab beobachtet werden (Weng & Levy 2003). Im Vergleich zu Patienten, welche homozygot Fc $\gamma$ RIIIa-F158 exprimierten, zeigten sich verbesserte Ansprechraten und verlängertes Überleben bei Patienten mit homozygoter Expression der Variante Fc $\gamma$ RIIIa-V158, die IgG1 mit höherer Affinität bindet.

CD20-Antikörper können abhängig von den Bindungseigenschaften an das Epitop und der damit assoziierten Wirkweisen in zwei Gruppen gegliedert werden (Cragg & Glennie 2004). Typ I CD20-Antikörper, wie Rituximab und Ofatumumab, vermitteln stark CDC und können zumindest *in vitro* über Kreuzvernetzung Apoptose induzieren. Typ II Antikörper, wie Tositumomab und Obinutuzumab, vermitteln verstärkt Apoptose. Die untersuchten Tribodies [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] sind über das jeweilige Fab-Fragment in der Lage nur an Fc $\gamma$ RIII (CD16) bzw. Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) zu binden. Im Vergleich zu Rituximab ist eine Bindung andere Fc $\gamma$ R, wie zum Beispiel den inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb (auf Makrophagen und Monozyten) oder Fc $\gamma$ RIIa auf nicht zytotoxischen Zellen (Thrombozyten), mit diesen Antikörperderivaten nicht möglich. Die Moleküle gewährleisten ein optimales A:I Ratio zur Rekrutierung von Effektorzellen (Nimmerjahn & Ravetch 2005). Außerdem sind die bispezifischen Moleküle nicht in der Lage Komplementfaktoren zu binden, um CDC zu vermitteln. Die Induktion von CDC als antitumoraler Effekt *in vivo* wird kontrovers diskutiert. Zum Beispiel wurde in einer Studie mit C3-defizienten Mäusen gezeigt, dass die Effektivität von Rituximab gesteigert werden konnte, wenn eine Vermittlung von CDC nicht möglich war (Wang, *et al.* 2009). Die Eigenschaft der Tribodies, keine CDC zu induzieren, könnte daher vorteilhaft für das zytotoxische Potential der Moleküle sein.

In Proliferationsinhibitionsversuchen konnten keine antiproliferativen Effekte mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] bei zwei Burkitt Lymphom Zelllinien, Daudi und Raji, beobachtet

werden. Die ausbleibenden antiproliferativen Effekte könnten möglicherweise mit einer geringeren Bindungsavidität an CD20 durch das verwendete scFv erklärt werden. Im Vergleich dazu haben die CD20-gerichteten Fab-Fragmente der monoklonalen Antikörper wahrscheinlich eine höhere Affinität für CD20 (Bird & Walker 1991). Da das scFv vom Typ I CD20-Antikörper 7D8-IgG1 abgeleitet wurde, könnten antiproliferative Effekte eventuell durch Verwendung von Typ II CD20-Antikörpern abgeleitete scFvs erreicht werden. Obwohl Raji Zellen ein höheres CD20-Expressionslevel als Daudi Zellen haben (Stein, *et al.* 2004), waren die Typ I CD20-Antikörper Rituximab und 7D8-IgG1 in der Lage die Proliferation von Daudi Zellen, aber nicht von Raji Zellen zu inhibieren. Dieser Effekt könnte mit der CD32-Expression auf der Oberfläche von Daudi Zellen zusammenhängen (Daten nicht gezeigt). Mit der Fc-Domäne können monoklonale Antikörper CD32 (FcγRII) binden. Mit einer simultanen Bindung an CD20 könnten Rituximab und 7D8-IgG1 Daudi Zellen kreuzvernetzen und damit Proliferationsinhibition vermitteln. Da der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] nicht in der Lage ist CD32 zu binden, konnten womöglich keine antiproliferativen Effekte mit diesem Molekül bei Daudi Zellen beobachtet werden.

Analysen zur Vermittlung von indirekten Effektormechanismen ergaben, dass der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Tribody starke ADCC-Aktivität besitzt. Eine Aktivierung von Komplement konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden, da das bispezifische Molekül keine Fc-Domäne für die Bindung von Komplementfaktoren besitzt.

Insgesamt wurde mit diesen Analysen gezeigt, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] nur über CD16-vermittelte Wirkmechanismen induzieren kann und nicht in der Lage ist CDC oder Proliferationsinhibition zu vermitteln. Da noch nicht nachgewiesen wurde, ob die Vermittlung von CDC im Patienten eine entscheidende Rolle in der Tumorthherapie spielt, FcR-vermittelte Mechanismen dagegen eine wichtige Rolle bei der antitumoralen Aktivität von Antikörpern haben, stellt der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mit diesen Eigenschaften vielleicht eine vielversprechende Möglichkeit zur Optimierung von Antikörper-basierten Therapien dar.

#### **4.4 Vergleich der lytischen Kapazitäten von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und monoklonalen CD20-Antikörpern**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Verwendung eines bispezifischen Antikörpers im Tribody-Format zur Rekrutierung von CD16-positiven Effektoren die

## Diskussion

---

Zytotoxizität gegenüber CD20-positiven Zielzellen im Vergleich zu konventionellen CD20-Antikörpern steigern kann.

Bereits in ADCC-Experimenten mit den Tumorzelllinien Daudi und Raji zeigte der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Dosis-abhängig eine signifikant stärkere Induktion von Tumorzelllyse als Rituximab. Sowohl die erreichte maximale Lyse als auch der EC<sub>50</sub>-Wert zeigten die Überlegenheit des bispezifischen Antikörpers. Hier wurde deutlich, dass trotz unterschiedlicher CD20-Expression auf den Zellen die EC<sub>50</sub> für beide Burkitt Lymphom Zelllinien mit ca. 10 pM vergleichbar war. Die Ergebnisse wurden in Analysen mit frisch isolierten Tumorzellen bestätigt. Im Vergleich zu den CD20-gerichteten Antikörpern Rituximab und 7D8-IgG1 induzierte der Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] effizienter ADCC gegen Tumorzellen von CLL-Patienten. In früheren *in vitro* Studien wurde bereits gezeigt, dass sich isolierte Tumorzellen von CLL-Patienten nur schlecht mit Rituximab lysieren ließen (Golay, *et al.* 2001). Die niedrigen Lysen durch Rituximab können eventuell auf die geringe Antigendichte zurückgeführt werden (Kay, *et al.* 2002; Keating, *et al.* 2002). Interessanter Weise hatte die geringe Expression von CD20 auf diesen Tumorzellen keinen Einfluss auf die lytische Aktivität des bispezifischen Antikörpers.

Das zytotoxische Potential von Rituximab, 7D8-IgG1 und [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] wurde zusätzlich in B-Zell Depletionsexperimenten verglichen. Aus mononukleären Zellen konnten die Antikörper über die Rekrutierung von CD16-positiven Effektorzellen wirkungsvoll B-Zellen depletieren. Die Dosiskurven zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei CD20-Antikörper-Molekülen. Im Vergleich zur Inkubationszeit der <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuche war die Inkubationszeit der B-Zell Depletion mit ca. 24 h achtfach länger. Das gab den CD20-Antikörpern mehr Zeit zur Vermittlung von Zelllyse als in <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen. Möglicherweise sind deshalb keine Unterschiede in den Dosiskurven der Antikörper erkennbar.

Im Vollblut dagegen zeigte nur der bispezifische Antikörper [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] starke B-Zell Depletion, wenn die Aktivierung der Komplementkaskade durch Zugabe von Heparin verhindert wurde. Heparin bindet verschiedene Komplementfaktoren und verhindert damit die Komplex-Bildung der Komplementkaskade. In diesem Ansatz war die beobachtete B-Zell Depletion ein Maß für die vermittelte ADCC durch die CD20-Antikörper. Für Rituximab und 7D8-IgG1 wurde hier im Vergleich mit mononukleären Zellen eine reduzierte Effektivität beobachtet. Diese kann möglicherweise auf die Anwesenheit hoher Mengen endogener IgG im Vollblut zurückgeführt werden, welche mit konventionellen, therapeutischen Antikörpern um die Bindung an die FcRs konkurrieren. Erst mit hohen Konzentrationen ist es therapeutischen Antikörpern möglich ADCC auszulösen (Preithner, *et al.* 2006). Für Rituximab wurde bereits gezeigt, dass die therapeutische Wirkung von endogenem IgG inhibiert werden kann (Nechansky, *et al.*

2007). Außerdem sind die E:T Verhältnisse in B-Zell Depletionsversuchen mit Vollblut niedriger als in Versuchen mit mononukleären Zellen. Wahrscheinlich beeinträchtigte das niedrige E:T Verhältnis die Effektivität der B-Zell Depletion monoklonaler CD20-Antikörper.

Die Ergebnisse der NK-Zell Aktivierung über den Nachweis der CD69-Expression zeigten, dass die Rekrutierung von CD16-positiven Effektoren durch Rituximab in diesem Ansatz nicht effektiv war. Die starke Affinität des Tribodies für CD16 hat diese störenden Effekte trotz niedrigem E:T Verhältnis überwunden.

In den Depletionsexperimenten mit aktivem Komplementsystem zeigte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] ebenfalls starke B-Zell Reduktion. Hier bestand für das Antikörperderivat die Möglichkeit über die Rekrutierung von CD16-positiven Effektoren ADCC oder Phagozytose zu vermitteln, während Rituximab und 7D8-IgG1 B-Zellen auch mittels CDC depletieren konnten. Trotzdem war für eine Reduktion der B-Zellen in vergleichbarem Ausmaß eine 100-fach höhere Konzentration von Rituximab nötig. 7D8-IgG1 vermittelte verglichen mit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] ebenfalls erst mit einer 10-fach höheren Konzentration effektive B-Zell Depletion. Die Bindung an FcR und damit die Vermittlung von FcR-vermittelten Mechanismen wird reduziert, wenn die Fc-Domäne von monoklonalen Antikörpern mit Komplementfaktoren gebunden ist. Eventuell war die Bindung von Komplementfaktoren hinderlich für die effektive Induktion von ADCC durch die monoklonalen Antikörper, wie es in der Literatur für Rituximab bereits beschrieben wurde (Wang, *et al.* 2009). In früheren Analysen wurde außerdem gezeigt, dass die Präsenz von CD16 als löslicher Faktor im Vollblut und als nicht zytotoxischer Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten die Effektivität bispezifischer CD16-gerichteten Antikörpern nicht reduzierte (Weiner, *et al.* 1991).

Der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Tribody war trotz dieser störenden Faktoren in der Lage in niedrigen Konzentrationen B-Zellen im Vollblut zu eliminieren. Dieser Aspekt könnte für die Lyse von Tumorzellen wichtig sein, speziell am Ort des Tumors, an welchem hohe Antikörper-Konzentrationen möglicherweise schwierig zu erzielen sind.

#### **4.5 Einfluss des Polymorphismus von FcγRIIIa auf die ADCC-Aktivität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]**

Das Potential von therapeutischen Antikörpern wie Rituximab und Trastuzumab, Effektorzell-vermittelte Lyse von Tumorzellen zu induzieren, ist durch den funktionellen FcγRIIIa-Polymorphismus beeinflusst (Weng & Levy 2003; Musolino, *et al.* 2008).

## Diskussion

---

Patienten, die homozygot für die Valin-Alloform (V/V) sind, haben bessere Aussichten auf ein Ansprechen und ein verlängertes Überleben mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper. Ursache dafür ist die unterschiedliche Affinität der Fc-Domäne von IgG für die CD16a-Alloformen (Koene, *et al.* 1997). Rituximab zeigt niedrigere Affinität zu CD16a-F/F158 im Vergleich zu CD16a-V/V158 (Dall'Ozzo, *et al.* 2004). *In vitro* Studien belegen, dass diese Unterschiede in direktem Zusammenhang mit NK-Zell Aktivierung und ADCC-Aktivität stehen (Bowles, *et al.* 2006). Verteilt über verschiedene Bevölkerungsgruppen kommt das FCGR3A-F158 Allel häufiger vor. Nur ca. 10% der Bevölkerung sind homozygot für FCGR3A-V158, während 40-50% homozygot FCGR3A-F158 tragen (Morgan, *et al.* 2000; Kyogoku, *et al.* 2002; Morgan, *et al.* 2003). Deshalb würde erwartungsgemäß der Großteil der Patienten schlechter ansprechen auf Therapien mit konventionellen Antikörpern, deren Wirkmechanismus in erster Linie ADCC ist. Klinisch gesehen besteht Bedarf nach neuartigen, therapeutischen Antikörpermolekülen, die unabhängig vom FcγR3A-Polymorphismus starkes ADCC-Potential besitzen. Mit Fc-optimierten CD20-Antikörpern konnte bereits eine Verstärkung dieses Effektormechanismus gezeigt werden (Niwa, *et al.* 2004). In den Studien wurde eine Fc-optimierte Variante von Rituximab hergestellt, indem Fukose am Oligosaccharidgerüst des Fc-Teils entfernt wurde. Im Vergleich mit Rituximab wurde mit dieser Variante eine 10- bis 100-fach verstärkte ADCC beobachtet, die unabhängig davon war, welche FcγR3A-Variante die Spender exprimierten.

Der [(CD20)<sub>2</sub>×CD16]-gerichtete Tribody zeigte in den Dosis-abhängigen Bindungsstudien fast identische Affinitäten zu CD16a-V158 und CD16a-F158. Das Ergebnis ist interessant, denn für den parentalen CD16-Antikörper 3G8 wurde kürzlich nachgewiesen, dass er höhere Bindung an NK-Zellen mit Valin-Varianten von CD16a (V/V = V/F > F/F) besitzt (Congy-Jolivet, *et al.* 2008). Diese Diskrepanz mag möglicher Weise von unterschiedlichen Versuchskonditionen herrühren oder an der Tatsache liegen, dass im Tribody nur die V-Region des 3G8 Antikörpers für das chimäre Fab-Fragment enthalten waren.

In den funktionellen Analysen wurde beobachtet, dass [(CD20)<sub>2</sub>×CD16] unabhängig vom CD16a-Polymorphismus effizienter ADCC vermittelte als Rituximab. Um eine fundierte Aussage über den Einfluss des CD16a-Polymorphismus auf die Zytotoxizität des Tribodies zu treffen, müssten Spender hinsichtlich des CD16a-Polymorphismus typisiert und weitere <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuche durchgeführt werden.



#### 4.6 Rekrutierung von autologen Effektorzellen durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]

Humane NK-Zellen sind potente Effektoren, deren zytotoxische Funktion durch inhibitorische und aktivierende Oberflächenrezeptoren reguliert ist. Über inhibitorische Rezeptoren erkennen NK-Zellen HLA Klasse I Moleküle auf der Oberfläche körpereigener Zellen und die dadurch entstehenden Signale hemmen die Aktivierung von NK-Zellen. In Zytotoxizitätsversuchen mit allogenen Effektorzellen können NK-Zellen in der Regel leichter aktiviert werden, da exprimierte HLA Klasse I Moleküle auf den B-Zellen, respektive Tumorzellen keine starken, inhibitorischen Signale in NK-Zellen auslösen. Werden autologe Effektoren verwendet, wie in B-Zell Depletionsexperimenten, ist die Aktivierung der NK-Zellen durch starke inhibitorische Signale der körpereigenen HLA Klasse I Moleküle gehemmt.

*In vitro* und *in vivo* B-Zell Depletionsexperimente in dieser Arbeit demonstrierten, dass der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Lage war, B-Zellen mit autologen Effektorzellen zu eliminieren. Die *in vitro* Untersuchungen zur Expression von CD69 als Marker für NK-Zell Aktivierung bestätigten diese Annahmen. Im Vergleich zu Rituximab und den Kontrollmolekülen wurde eine erhöhte CD69-Expression auf NK-Zellen nachgewiesen. Demnach scheint ein starker Impuls über CD16a NK-Zellen aktivieren zu können, auch wenn diese normalerweise vom körpereigenen MHC-Klasse I System inhibiert werden.

In Zytotoxizitätsversuchen konnte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] über die Rekrutierung von autologen NK-Zellen effektiv Lyse von isolierten Tumorzellen verschiedener Patienten induzieren. Hier wurde bestätigt, dass der Tribody in der Lage ist, über CD16 autologe NK-Zellen zu aktivieren. Außerdem zeigten die Versuche, dass NK-Zellen von verschiedenen Patienten funktionell aktiv sind. Für die Behandlung könnte die Aktivierung autologer NK-Zellen ein wichtiges Kriterium sein. In einem Tumor-Maus-Modell wurde gezeigt, dass abhängig vom Stadium des Tumors verschiedene B-Zell Lymphome HLA Klasse I unterschiedlich stark exprimieren. In frühen Stadien ist die HLA Klasse I Expression im Vergleich zu normalen B-Zellen reduziert, während in späteren Stadien die Expression von HLA Klasse I verstärkt war (Brenner, *et al.* 2010).

Neben NK-Zellen existieren auch andere CD16-positive Effektoren, wie Makrophagen, die ADCC vermitteln können. Inwieweit [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Lage ist Makrophagen zu aktivieren, wird derzeit untersucht.

### 4.7 B-Zell Depletion in „humanisierten Mäusen“

In NOD SCID gamma  $c^{-/-}$  Mäusen kann durch Transplantation von humanen, CD34-positiven Nabelschnurblutzellen ein humanes Immunsystem rekonstruiert werden (Traggiai, *et al.* 2004). Nach 14-16 Wochen findet man in diesen Tieren ein breites Spektrum humaner, CD45-positiver, hämatopoietischer Zellen. So genannte „humanisierte Mäuse“ sind ein sehr gut geeignetes Modell, um B-Zell Depletionen *in vivo* zu untersuchen. Für die Versuche bedarf es keiner Xenotransplantation humaner Effektorzellen oder transgenen Expression humaner Zielstrukturen auf murinen Zellen. Die humanen B-Zellen und CD16-positiven stammen vom selben Spender, so dass die Experimente *in vivo* im autologen System durchgeführt werden können. In *in vitro* B-Zell Depletionsversuchen und NK-Zell Aktivierungsanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Lage ist, autologe NK-Zellen zur Eliminierung von B-Zellen zu aktivieren. In den „humanisierten Mäusen“ konnte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] die Anzahl der B-Zellen signifikant um ca. 43% reduzieren. Eine zeitlich verlängerte Applikation von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] könnte möglicherweise zu einer höheren Reduktion der B-Zellen führen, wie es für den bispezifischen Antikörper [CD32bxCD16] gezeigt wurde (Johnson, *et al.* 2010). Da die Applikation des Tribodies intraperitoneal erfolgte, wäre es möglich, dass bis zur Aufnahme in die Blutzirkulation ein Teil des Moleküls bereits metabolisiert und ausgeschieden wurde. Untersuchungen zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik des Tribodies stehen noch aus. Deshalb kann nur vermutet werden, dass durch eine intravenöse Applikation der gleichen Konzentration das Ausmaß der Depletion durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] höher gewesen wäre, auch wenn die Serumretentionszeit des Moleküls nicht über den Recycling-Prozess durch FcRn verlängert werden würde.

Für einen Vergleich der Depletionsaktivitäten von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab in diesem Maus-Modell sind die Voraussetzungen nicht gegeben. NOD SCID gamma  $c^{-/-}$  Mäuse besitzen signifikante Mengen funktioneller, muriner, myeloischer Effektorzellen und NK-Zellen (Shultz, *et al.* 2005). Diese Zellen exprimieren murine FcγRIII (verwandt mit humanem FcγRIIa) bzw. FcγRIV (murines Ortholog zu humanem FcγRIIIa), mit denen Rituximab als humaner IgG1 Antikörper interagieren kann (Nimmerjahn & Ravetch 2008). Der bispezifische Antikörper ist dagegen spezifisch für humanes CD16 und kann die murinen Effektoren nicht rekrutieren. Das E:T Verhältnis für Rituximab ist in diesem Modell deutlich höher, was dem monoklonalen Antikörper einen Vorteil verschaffen würde. Rituximab kann außerdem CDC vermitteln. Da NOD SCID gamma  $c^{-/-}$  Mäusen kein hämolytisches Komplement besitzen, wäre Rituximab nicht in der Lage, sein volles zytotoxisches Potential zu nutzen. Die unterschiedlichen Voraussetzungen in

diesem Modell lassen deshalb einen Vergleich von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] und Rituximab nur bedingt zu.

### 4.8 Einfluss des Epitops auf das zytotoxische Potential des Tribodies

Verschiedene Parameter können Einfluss auf die Aktivität von bispezifischen Antikörpern haben. Zum Beispiel wurden die Affinität und Avidität zum Zielantigen als bedeutend identifiziert (McCall, *et al.* 2001; Shahied, *et al.* 2004; Kellner, *et al.* 2008). Aber auch bei der Bindung auf der Effektorzellseite kann es kritische Einflussgrößen geben, wie die Wahl eines geeigneten Trigger-Moleküls, der damit rekrutierten Effektorzellpopulation und das durch den bispezifischen Antikörper erkannte Epitop. Bispezifische Antikörper können beispielsweise spezifisch für einen FcR sein, aber unterschiedliche Epitope des gleichen erkennen und somit eventuell verschieden starke Effekte vermitteln (McCall, *et al.* 1999). Nahezu alle bisher untersuchten CD16-gerichteten bispezifischen Antikörper erkennen sowohl CD16a als auch CD16b, welches auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und über welches Phagozytose, aber keine ADCC vermittelt werden kann (Graziano & Fanger 1987). Im Vergleich zu NK-Zellen machen Granulozyten einen großen Teil der Leukozyten im peripheren Blut aus, welche die bispezifischen Antikörper über die Bindung an CD16b abfangen und somit eine effiziente NK-Zell Rekrutierung verhindern könnten. Über CD16b wird dagegen sehr effizient Phagozytose von Tumorzellen initiiert. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass Bindung an CD16b auf Granulozyten zur Kreuzvernetzung von Rituximab dienen kann, um Apoptose in Zielzellen zu vermitteln (Nakagawa, *et al.* 2009).

In den hier durchgeführten Analysen sollte untersucht werden, ob das erkannte Epitop Einfluss auf die Aktivität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] hat, und ob sich NK-Zellen stärker aktivieren lassen, wenn ein Epitop als Bindungsstelle für den bispezifischen Antikörper gewählt wird, mit welchem der Tribody in der Lage ist, selektiv CD16a zu binden. Dazu wurde analog zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-gerichteter Tribody konstruiert und die beiden bispezifischen Moleküle *in vitro* verglichen. Die Daten aus ADCC-Versuchen mit mononukleären Zellen zeigten, dass das Ausmaß der maximalen Lyse von Daudi Zellen mit sättigenden Konzentrationen für beide bispezifischen Antikörper annähernd gleich war. Beide induzierten stärkere ADCC als Rituximab. Allerdings vermittelte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] halbmaximale Lyse mit einer 2,5-fach niedrigeren Konzentration als das CD16a-selektive Antikörperderivat. In B-Zell Depletionsversuchen

## Diskussion

---

mit Vollblut wurden die Differenzen im lytischen Potential dieser Tribodies verdeutlicht. Während [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mit einer Konzentration von 1 nM 70% der B-Zellen depletierte, konnte mit dem [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a]-gerichteten Molekül bei dieser Konzentration noch keine Reduktion von B-Zellen beobachtet werden.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass sich mit dem hier untersuchten, CD16a-gerichteten Tribody keine verstärkte Aktivierung von NK-Zellen und der damit verbundenen Lyse von Zielzellen im Vergleich zu dem hier verwendeten CD16a/b-spezifischen Antikörperderivat (parentaler Antikörper 3G8) erzielen lässt. Womöglich können NK-Zellen über das vom CD16a-gerichteten Tribody erkannte Epitop nicht optimal aktiviert werden. Ein CD16a-spezifischer Tribody könnte vielleicht mit gesteigerter Affinität zu CD16a oder über ein anderes CD16a-selektives Epitop NK-Zellen besser rekrutieren. Allerdings ist zurzeit nur ein CD16a-spezifischer Antikörper verfügbar. Bisher wurde auch noch nicht untersucht, in wie weit ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteter Tribody in der Lage ist über CD16b Phagozytose und Apoptose von Zielzellen zu vermitteln.

Diese Fähigkeiten wären eventuell auch eine Erklärung für die höheren Effekte des [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in den B-Zell Depletionen, die in ADCC-Experimenten mit Vollblut im Vergleich zu [(CD20)<sub>2</sub>xCD16a] nicht zu sehen waren. In Depletionsversuchen ist die Inkubationszeit mit 24 h 8-fach länger als in <sup>51</sup>Cr Freisetzungsversuchen zur Analyse von ADCC. Vielleicht ermöglicht die größere Zeitspanne dem [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] Granulozyten zur Phagozytose von B-Zellen zu aktivieren. Zukünftige Untersuchungen könnten klären, ob ein [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtetes Molekül die Fähigkeit besitzt Effektormechanismen über CD16b zu vermitteln. Außerdem könnte in weiteren Analysen untersucht werden, ob ein Tribody über ein anderes CD16a-spezifisches Epitop NK-Zellen effektiver aktivieren und somit das antitumorale Potential eines NK-Zell-selektiven Tribodies erhöhen könnte. Die Klärung dieser Fragestellung ist allerdings schwierig zu verwirklichen, da sich CD16a und CD16b nur in sechs Aminosäuren unterscheiden und bisher nur ein CD16a-selektiver Antikörper verfügbar ist (Gessner, *et al.* 1995).

### 4.9 Pharmakokinetik des Tribodies

Ein Aspekt für die *in vivo* Effektivität des Tribodies ist die Stabilität des Moleküls im Serum und die Pharmakokinetik. Beides soll in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Die Serumretentionszeit ( $t_{1/2}$ ) des monoklonalen Antikörpers Rituximab in der Maus beträgt 109,5 h (Li, *et al.* 2008) und im Mensch ungefähr 21 Tage (Cartron, *et al.*

2007). Abhängig vom Format zeigen bispezifische Antikörper sehr unterschiedliche Werte für  $t_{1/2}$ . Der 2009 zugelassene Triomab Antikörper Catumaxomab hat in Patienten eine Plasmaretentionszeit von 2,13 Tagen (Ruf, *et al.* 2007). Durch seine mit monoklonalen Antikörpern vergleichbare Größe und dem chimären Maus-Ratte Fc-Fragment unterliegt er wie monoklonale Antikörper einem Recycling-Prozess. In mehreren Studien mit bispezifischen Antikörpern im tandem scFv-Format zeigte sich eine kürzere Verweildauer im Vergleich zu konventionellen Antikörpern. Zum Beispiel hat der [CD19xCD3]-gerichtete, bispezifische Antikörper Blinatumomab aufgrund der geringen Molekülmasse eine Serumretentionszeit von 5,3 h im Mensch (Schlereth, *et al.* 2005). In *in vivo* Studien wurden die Plasmaretentionszeiten eines [CD3xBCL-1]-gerichteten tandem scFvs, eines [CD3xBCL-1]-gerichteten Bibodies und eines [(CD3)<sub>2</sub>x BCL-1]-gerichteten Tribodies miteinander verglichen. Abhängig von den molekularen Massen ergaben sich in Mäusen für den tandem scFv eine Serumretentionszeit von 1,5 h, für den Bibody 2,9 h und für den Tribody 5,7 h (Mertens 2011).

Diese Eigenschaften müssen jedoch nicht nachteilig für den therapeutischen Erfolg solcher Moleküle sein. Kleinere Moleküle sind möglicherweise gewebeängiger und können eventuell Bereiche von soliden Tumoren erreichen, die ein monoklonaler Antikörper schlechter erreichen kann. Auch geringere Serumretentionszeiten können von Vorteil sein, falls bei Patienten schwere Nebenwirkungen nach der initialen Applikation des Therapeutikums auftreten. Zum Beispiel zeigten sich in der Phase I Studie des CD28-gerichteten, monoklonalen Antikörpers TGN1412 kurze Zeit nach der Infusion bei den Probanden das so genannte Zytokin-Freisetzungssyndrom (Suntharalingam, *et al.* 2006). Die Erfolge mit BiTE Molekülen wie Blinatumomab sind sehr aussichtsreich, auch wenn für die Therapie eine Dauerinfusion von 4 bis 8 Wochen nötig ist und Nebenwirkungen durch die Art der Aktivierung von T-Zellen auftreten (Bargou, *et al.* 2008; Topp, *et al.* 2011). Die Verwendung von bispezifischen Antikörpern im Tribody-Format könnte sich dabei als Vorteil erweisen, wenn man die *in vivo* Serumretentionszeit für den [(CD3)<sub>2</sub>x BCL-1] von 5,7 h in der Maus als Maß für eine vergleichbare Verweildauer des [(CD20)<sub>2</sub>x CD16] im Plasma heranzieht (Mertens 2011).

In weiterführenden Studien sollen die Serumstabilität und die Pharmakokinetik des [(CD20)<sub>2</sub>x CD16] Tribodies analysiert werden. Beide Eigenschaften bestimmen maßgeblich die *in vivo* Effektivität des Moleküls.

### 4.10 Grundlagen zur Etablierung eines xenotransplantierten Mausmodells

In den durchgeführten Analysen zeigte der bispezifische Antikörper [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] im Tribody-Format potente ADCC-Aktivität und Depletion von B-Zellen *in vivo*.

Ein präklinisches Tiermodell soll in weiteren Analysen Aufschluss darüber geben, inwieweit der [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichtete Tribody Tumorwachstum beeinträchtigen und humane B-lymphatische Neoplasien eliminieren kann. Die Verwendung von stabil markierten Tumorzelllinien mit einem fluoreszierenden Protein würde sich für eine *in vivo* Bildgebung zur Verfolgung des Tumorwachstums anbieten. In den hier durchgeführten *in vivo* Versuchen zeigte sich, dass sich das rot fluoreszierende Protein Katushka mit einem Emissionsspektrum im „far-red“ Bereich sehr gut zur Analyse tiefer liegender Bereiche im Gewebe von Mäusen eignet. Die Expression von Katushka ist in Raji<sub>Kat</sub> über einen längeren Zeitraum stabil und hat an der Sensitivität der Zellen gegenüber ADCC durch [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] nicht verändert. Für das geplante Tiermodell könnte das Wachstum der Tumore mit *in vivo* Bildgebung, wie sie in dieser Arbeit getestet wurde, verfolgt und quantitativ ausgewertet werden.

Die größte Herausforderung zur Etablierung dieses Modells liegt in der optimalen Dosierung der humanen Effektorzellen. Die Verweildauer und die Lokalisation der mononukleären Zellen bzw. NK-Zellen werden aller Wahrscheinlichkeit nach Einfluss auf die Effektivität von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] haben. In zahlreichen Studien wurden bereits Erfahrungen mit der Applikation von humanen, peripheren Leukozyten in SCID Mäusen gesammelt (Kipriyanov, *et al.* 2002; Gillies, *et al.* 2005; Shiokawa, *et al.* 2010), auf die bei der Etablierung zurückgegriffen werden kann. Darin sind Angaben über die Anzahl der applizierten Effektorzellen, die Art und die Häufigkeit der Applikation zu finden.

Die Ergebnisse des Projekts zur Untersuchung der Effektormechanismen eines [(CD20)<sub>2</sub>xCD16]-gerichteten Antikörperderivats im Tribody-Format zeigten, dass ein solches Molekül effektiv CD16-positive NK-Zellen aktivieren und bereits im pikomolaren Bereich ADCC vermitteln kann. Diese Überlegenheit bestand sowohl bei der Verwendung von humanen Lymphomzelllinien als auch von isolierten Tumorzellen von Patienten mit unterschiedlichen B-Zell Neoplasien. In B-Zell Depletionsexperimenten mit Vollblut und im Mausmodell war es dem bispezifischen Molekül möglich, autologe NK-Zellen zur Lyse von CD20-positiven B-Zellen zu aktivieren. Mit weiterführenden Untersuchungen soll ermittelt werden, ob mit dem Tribody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], welcher selektiv ADCC als einzigen Effektormechanismus induzieren kann, relevante, therapeutische Effekte *in vivo* zu erzielen sind. Dies wäre die Voraussetzung für eine klinische Weiterentwicklung des Moleküls zur Therapie von B-Zell Neoplasien.

### 5 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper, wie der bei Non-Hodgkin-Lymphomen therapeutisch eingesetzte CD20-Antikörper Rituximab, vermitteln *in vitro* verschiedene Effektormechanismen, wie Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC), Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und Proliferationsinhibition zur Eliminierung von Tumorzellen. Verschiedene Studien im Menschen und im Tiermodell weisen darauf hin, dass die effektive Rekrutierung Fc $\gamma$  Rezeptor- (Fc $\gamma$ R-)exprimierender Effektorzellen und damit die Vermittlung von ADCC *in vivo* einen wichtigen Wirkmechanismus darstellt. So wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Fc $\gamma$ R Allele, die Immunglobulin G mit höherer Affinität binden, und verbesserten Ansprechraten auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern und damit verbunden ein verlängertes Überleben festgestellt. Neue Strategien zur Verstärkung der ADCC könnten somit zur Entwicklung von effizienteren Antikörper-basierten Therapien führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bispezifischer Antikörper, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], konstruiert, der CD20 auf Lymphomzellen und Fc $\gamma$ RIII (CD16) auf Effektorzellen bindet. In den durchgeführten Studien wurden dabei keine Unterschiede in den Affinitäten von [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] zu den verschiedenen Fc $\gamma$ RIIIa Allelen festgestellt, wie es für Rituximab beschrieben wurde. Durch Vermittlung von ADCC als einzigen Effektormechanismus induzierte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] effektive Lyse humaner Lymphomzelllinien und isolierter Tumorzellen von Patienten mit unterschiedlichen B-Zell Lymphomen. In Versuchen mit isolierten Effektorzellen zeigte sich, dass [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] mit einer gegenüber Rituximab neunfach niedrigeren, halbmaximalen effektiven Konzentration Lyse von Tumorzellen induzierte. In komplexeren Analysen mit Vollblutproben, in welchen dem monoklonalen Antikörper auch CDC als Wirkmechanismus zur Verfügung stand, vermittelte [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] durch die Aktivierung autologer Effektoren ebenfalls eine höhere Depletion der B-Zellen. Auch *in vivo* war [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] in der Lage, die B-Zellzahl in Anwesenheit autologer Effektoren zu reduzieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass ein bispezifischer Antikörper im Tribody-Format, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], zur gezielten Vermittlung von ADCC als einzigen Wirkmechanismus effektiv humane Lymphomzellen lysieren und konventionellen CD20-Antikörpern überlegen sein kann. Da bisher nicht alle Patienten von der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern profitieren, bietet das hier beschriebene Molekül möglicherweise eine attraktive Weiterentwicklung von Antikörper-basierten Tumorthérapien.

### 6 Summary

Monoclonal antibodies such as the CD20-antibody rituximab, which is indicated for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, mediate various effector mechanisms to eliminate tumor cells *in vitro*. These include complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and inhibition of proliferation. Several studies in human and in animal models suggest that effective recruitment of Fc $\gamma$ R receptor (Fc $\gamma$ R) expressing effector cells and hence mediation of ADCC may represent a relevant mechanism of action *in vivo*. For example, the expression of distinct Fc $\gamma$ R alleles which bind immunoglobulin G with higher affinity correlates with improved response rates to treatment with monoclonal antibodies and coherently with prolonged overall survival. Therefore, new strategies to enhance ADCC may represent a promising approach to enhance the efficacy of antibody-based therapies.

In the current study, a bispecific antibody [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] was constructed, which binds to CD20 on lymphoma cells and to Fc $\gamma$ RIII (CD16) on effector cells. In addition, binding analyses revealed no differences in affinity to Fc $\gamma$ RIIIa allelic variants for the bispecific molecule, as described for rituximab. By inducing ADCC as a sole effector mechanism, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] was able to mediate efficient lysis of human lymphoma cell lines and isolated tumor cells of patients with different B cell lymphoma. Settings with isolated effector cells revealed that [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] induced lysis of tumor cells with a ninefold lower half maximal effective concentration than rituximab. Also in more complex analyses with whole blood samples [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] reduced the number of B cells to a higher amount compared to the monoclonal antibody, which was able to induce CDC beside ADCC in these settings, by activating autologous effector cells more efficiently. Furthermore, in models *in vivo* [(CD20)<sub>2</sub>xCD16] was able to mediate depletion of B cells in the presence of autologous effectors.

These results demonstrate that a bispecific antibody in the tribody format [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], specifically constructed to mediate ADCC as a sole effector mechanism, is able to eliminate human lymphoma cells effectively and can be superior to conventional CD20-antibodies. Since not all patients benefit from treatment with monoclonal antibodies, the investigated molecule may represent an attractive candidate for further development of antibody-based cancer therapy.



## 7 Literatur

- Adams, G. P. & Weiner, L. M.** (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." *Nat Biotechnol* **23**(9): 1147-1157.
- Allen, T. M., Sapra, P., Moase, E., Moreira, J. & Iden, D.** (2002). "Adventures in targeting." *Journal of Liposome Research* **12**(1-2): 5-12.
- Almeda, S., Rosenberg, R. D. & Bing, D. H.** (1983). "The binding properties of human complement component C1q. Interaction with mucopolysaccharides." *J Biol Chem* **258**(2): 785-791.
- Anderson, K. C., Bates, M. P., Slaughenhaupt, B. L., Pinkus, G. S., Schlossman, S. F. & Nadler, L. M.** (1984). "Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation." *Blood* **63**(6): 1424-1433.
- Ansell, S. M. & Armitage, J.** (2005). "Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment." *Mayo Clinic Proceedings* **80**(8): 1087-1097.
- Ansen, S., Sieber, M., Wingbermuhle, K., Josting, A. & Diehl, V.** (2002). "[Current therapeutic strategies in Hodgkin lymphoma]." *Internist (Berl)* **43**(12): 1544-1550.
- Armstrong, B. K. & Kricker, A.** (2007). "Sun exposure and non-Hodgkin lymphoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(3): 396-400.
- Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A. & Carter, P.** (1997). "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library." *J Mol Biol* **270**(1): 26-35.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A. & Kufer, P.** (2008). "Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody." *Science* **321**(5891): 974-977.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A. & Kufer, P.** (2008). "Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody." *Science (New York, N.Y)* **321**(5891): 974-977.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & Spies, T.** (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-729.
- Baum, W., Steininger, H., Bair, H. J., Becker, W., Hansen-Hagge, T. E., Kressel, M., Kremmer, E., Kalden, J. R. & Gramatzki, M.** (1996). "Therapy with CD7 monoclonal antibody TH-69 is highly effective for xenografted human T-cell ALL." *Br J Haematol* **95**(2): 327-338.
- Beers, S. A., Chan, C. H., French, R. R., Cragg, M. S. & Glennie, M. J.** (2010). "CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies." *Semin Hematol* **47**(2): 107-114.
- Bexborn, F., Engberg, A. E., Sandholm, K., Mollnes, T. E., Hong, J. & Nilsson Ekdahl, K.** (2009). "Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models." *J Biomed Mater Res A* **89**(4): 951-959.

## Literaturverzeichnis

---

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. & Whitlow, M. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* **242**(4877): 423-426.

Bird, R. E. & Walker, B. W. (1991). "Single chain antibody variable regions." *Trends Biotechnol* **9**(4): 132-137.

Boffetta, P. & de Vocht, F. (2007). "Occupation and the risk of non-Hodgkin lymphoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(3): 369-372.

Bondeson, J. & Maini, R. N. (2001). "Tumour necrosis factor as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases: the clinical experience with infliximab (REMICADE)." *Int J Clin Pract* **55**(3): 211-216.

Borchmann, P., Schnell, R., Fuss, I., Manzke, O., Davis, T., Lewis, L. D., Behnke, D., Wickenhauser, C., Schiller, P., Diehl, V. & Engert, A. (2002). "Phase 1 trial of the novel bispecific molecule H22xKi-4 in patients with refractory Hodgkin lymphoma." *Blood* **100**(9): 3101-3107.

Borghaei, H., Alpaugh, R. K., Bernardo, P., Palazzo, I. E., Dutcher, J. P., Venkatraj, U., Wood, W. C., Goldstein, L. & Weiner, L. M. (2007). "Induction of adaptive Anti-HER2/neu immune responses in a Phase 1B/2 trial of 2B1 bispecific murine monoclonal antibody in metastatic breast cancer (E3194): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group." *J Immunother* **30**(4): 455-467.

Boross, P., Jansen, J. H. M., de Haij, S., Beurskens, F. J., van der Poel, C. E., Bevaart, L., Nederend, M., Golay, J., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I. & Leusen, J. H. W. (2011). "The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden." *Haematologica*: haematol.2011.047159.

Boulianne, G. L., Hozumi, N. & Shulman, M. J. (1984). "Production of functional chimaeric mouse/human antibody." *Nature* **312**(5995): 643-646.

Bowles, J. A., Wang, S.-Y., Link, B. K., Allan, B., Beuerlein, G., Campbell, M.-A., Marquis, D., Ondek, B., Wooldridge, J. E., Smith, B. J., Breitmeyer, J. B. & Weiner, G. J. (2006). "Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab." *Blood* **108**(8): 2648-2654.

Brady, G., MacArthur, G. J. & Farrell, P. J. (2007). "Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma." *J Clin Pathol* **60**(12): 1397-1402.

Brekke, O. H. & Sandlie, I. (2003). "Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century." *Nat Rev Drug Discov* **2**(1): 52-62.

Brenner, C. D., King, S., Przewoznik, M., Wolters, I., Adam, C., Bornkamm, G. W., Busch, D. H., Rocken, M. & Mocikat, R. (2010). "Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells." *Eur J Immunol* **40**(2): 494-504.

Bruenke, J., Barbin, K., Kunert, S., Lang, P., Pfeiffer, M., Stieglmaier, K., Niethammer, D., Stockmeyer, B., Peipp, M., Repp, R., Valerius, T. & Fey, G. H. (2005). "Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16)." *British Journal of Haematology* **130**(2): 218-228.

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S. & Daeron, M. (2009). "Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses." *Blood* **113**(16): 3716-3725.

Bubien, J. K., Zhou, L. J., Bell, P. D., Frizzell, R. A. & Tedder, T. F. (1993). "Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes." *The Journal of Cell Biology* **121**(5): 1121-1132.

- Buhmann, R., Simoes, B., Stanglmaier, M., Yang, T., Faltin, M., Bund, D., Lindhofer, H. & Kolb, H. J.** (2009). "Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion." *Bone Marrow Transplant* **43**(5): 383-397.
- Burges, A., Wimberger, P., Kumper, C., Gorbounova, V., Sommer, H., Schmalfeldt, B., Pfisterer, J., Lichinitser, M., Makhson, A., Moiseyenko, V., Lahr, A., Schulze, E., Jager, M., Strohle, M. A., Heiss, M. M., Gottwald, T., Lindhofer, H. & Kimmig, R.** (2007). "Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study." *Clin Cancer Res* **13**(13): 3899-3905.
- Burton, D. R.** (1985). "Immunoglobulin G: functional sites." *Mol Immunol* **22**(3): 161-206.
- Byrd, J. C., Murphy, T., Howard, R. S., Lucas, M. S., Goodrich, A., Park, K., Pearson, M., Waselenko, J. K., Ling, G., Grever, M. R., Grillo-Lopez, A. J., Rosenberg, J., Kunkel, L. & Flinn, I. W.** (2001). "Rituximab Using A Thrice Weekly Dosing Schedule in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma Demonstrates Clinical Activity and Acceptable Toxicity." *Journal of Clinical Oncology* **19**(8): 2153-2164.
- Byrd, J. C., Waselenko, J. K., Maneatis, T. J., Murphy, T., Ward, F. T., Monahan, B. P., Sipe, M. A., Donegan, S. & White, C. A.** (1999). "Rituximab Therapy in Hematologic Malignancy Patients With Circulating Blood Tumor Cells: Association With Increased Infusion-Related Side Effects and Rapid Blood Tumor Clearance." *Journal of Clinical Oncology* **17**(3): 791.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. & Shepard, H. M.** (1992). "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(10): 4285-4289.
- Carter, P., Smith, L. & Ryan, M.** (2004). "Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology." *Endocrine-Related Cancer* **11**(4): 659-687.
- Cartron, G., Blasco, H., Piantaud, G., Watier, H. & Le Guellec, C.** (2007). "Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use?" *Crit Rev Oncol Hematol* **62**(1): 43-52.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P. & Watier, H.** (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene." *Blood* **99**(3): 754-758.
- Cartron, G., Zhao-Yang, L., Baudard, M., Kanouni, T., Rouille, V., Quittet, P., Klein, B. & Rossi, J. F.** (2008). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study." *J Clin Oncol* **26**(16): 2725-2731.
- Chan, H. T., Hughes, D., French, R. R., Tutt, A. L., Walshe, C. A., Teeling, J. L., Glennie, M. J. & Cragg, M. S.** (2003). "CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts." *Cancer Res* **63**(17): 5480-5489.
- Chari, R. V. J.** (2007). "Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs." *Accounts of Chemical Research* **41**(1): 98-107.
- Cheung, M. C., Haynes, A. E., Meyer, R. M., Stevens, A. & Imrie, K. R.** (2007). "Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario." *Cancer Treat Rev* **33**(2): 161-176.
- Clark, E. A., Shu, G. L., Luscher, B., Draves, K. E., Banchereau, J., Ledbetter, J. A. & Valentine, M. A.** (1989). "Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals." *The Journal of Immunology* **143**(12): 3873-3880.

## Literaturverzeichnis

---

- Clark, M.** (2000). "Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'?" *Immunol Today* **21**(8): 397-402.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V.** (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." *Nat Med* **6**(4): 443-446.
- Coloma, M. J. & Morrison, S. L.** (1997). "Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies." *Nat Biotechnol* **15**(2): 159-163.
- Colonna, M. & Samaridis, J.** (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." *Science* **268**(5209): 405-408.
- Congy-Jolivet, N., Bolzec, A., Ternant, D., Ohresser, M., Watier, H. & Thibault, G.** (2008). "Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype." *Cancer Res* **68**(4): 976-980.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. & Chalupny, N. J.** (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity* **14**(2): 123-133.
- Cragg, M. S. & Glennie, M. J.** (2004). "Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents." *Blood* **103**(7): 2738-2743.
- Cragg, M. S., Morgan, S. M., Chan, H. T., Morgan, B. P., Filatov, A. V., Johnson, P. W., French, R. R. & Glennie, M. J.** (2003). "Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts." *Blood* **101**(3): 1045-1052.
- Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. & Glennie, M. J.** (2005). "The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy." *Curr Dir Autoimmun* **8**: 140-174.
- Curnow, R. T.** (1997). "Clinical experience with CD64-directed immunotherapy. An overview." *Cancer Immunol Immunother* **45**(3-4): 210-215.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H. & Thibault, G.** (2004). "Rituximab-Dependent Cytotoxicity by Natural Killer Cells." *Cancer Research* **64**(13): 4664-4669.
- de Haas, M., Vosseveld, P. J., von dem Borne, A. E. & Roos, D.** (1995). "Fc gamma receptors of phagocytes." *J Lab Clin Med* **126**(4): 330-341.
- de Haij, S., Jansen, J. H., Boross, P., Beurskens, F. J., Bakema, J. E., Bos, D. L., Martens, A., Verbeek, J. S., Parren, P. W., van de Winkel, J. G. & Leusen, J. H.** (2010). "In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling." *Cancer Res* **70**(8): 3209-3217.
- de Weers, M., Tai, Y.-T., van der Veer, M. S., Bakker, J. M., Vink, T., Jacobs, D. I. C. H., Oomen, L. A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J. W., Mutis, T., Bleeker, W. K., Anderson, K. C., Lokhorst, H. M., van de Winkel, J. G. J. & Parren, P. W. H. I.** (2011). "Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors." *The Journal of Immunology* **186**(3): 1840-1848.
- Dechant, M., Bruenke, J. & Valerius, T.** (2003). "HLA class II antibodies in the treatment of hematologic malignancies." *Semin Oncol* **30**(4): 465-475.
- Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M. J., Gramatzki, M., van De Winkel, J. G. & Valerius, T.** (2002). "Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing." *Blood* **100**(13): 4574-4580.

- Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R. & van de Winkel, J. G.** (1997). "Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies." *Immunol Today* **18**(3): 127-135.
- Du, J., Wang, H., Zhong, C., Peng, B., Zhang, M., Li, B., Huo, S., Guo, Y. & Ding, J.** (2007). "Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab." *Journal of Biological Chemistry* **282**(20): 15073-15080.
- Du, J., Yang, H., Guo, Y. & Ding, J.** (2009). "Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody Ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20." *Molecular Immunology* **46**(11-12): 2419-2423.
- Edwards, J. C. & Cambridge, G.** (2005). "Prospects for B-cell-targeted therapy in autoimmune disease." *Rheumatology (Oxford)* **44**(2): 151-156.
- Ehrlich, P.** (1900). "Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life." *Proceedings of the Royal Society of London*(66): 424-448.
- Einfeld, D. A., Brown, J. P., Valentine, M. A., Clark, E. A. & Ledbetter, J. A.** (1988). "Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains." *EMBO J* **7**(3): 711-717.
- Eisenberg, R. & Looney, R. J.** (2005). "The therapeutic potential of anti-CD20: "What do B-cells do?"" *Clinical Immunology* **117**(3): 207-213.
- Ekstrand, B. C. & Horning, S. J.** (2002). "Hodgkin's disease." *Blood Reviews* **16**(2): 111-117.
- Ellerman, D., Scheer, J. M.** (2011). Generation of Bispecific Antibodies by Chemical Conjugation in *Bispecific Antibodies*. R. E. Kontermann, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 47-63.
- Elsasser, D., Stadick, H., Stark, S., Van de Winkel, J. G., Gramatzki, M., Schrott, K. M., Valerius, T. & Schafhauser, W.** (1999). "Preclinical studies combining bispecific antibodies with cytokine-stimulated effector cells for immunotherapy of renal cell carcinoma." *Anticancer Res* **19**(2C): 1525-1528.
- Ernst, J. A., Li, H., Kim, H. S., Nakamura, G. R., Yansura, D. G. & Vandlen, R. L.** (2005). "Isolation and Characterization of the B-Cell Marker CD20." *Biochemistry* **44**(46): 15150-15158.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M.** (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer* **127**(12): 2893-2917.
- Fischer, N. & Leger, O.** (2007). "Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies." *Pathobiology* **74**(1): 3-14.
- Fleit, H. B., Wright, S. D. & Unkeless, J. C.** (1982). "Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(10): 3275-3279.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. & Raulet, D. H.** (2005). "The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor." *Nature* **436**(7054): 1186-1190.
- Gessner, J. E., Grussenmeyer, T., Kolanus, W. & Schmidt, R. E.** (1995). "The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and III-B genes. Molecular characterization of the promoter regions." *J Biol Chem* **270**(3): 1350-1361.
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. & Schmidt, R. E.** (1998). "The IgG Fc receptor family." *Ann Hematol* **76**(6): 231-248.
- Getts, D. R., Getts, M. T., McCarthy, D. P., Chastain, E. M. & Miller, S. D.** (2010). "Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies?" *MAbs* **2**(6): 682-694.

## Literaturverzeichnis

---

- Gillies, S. D., Lan, Y., Williams, S., Carr, F., Forman, S., Raubitschek, A. & Lo, K.-M.** (2005). "An anti-CD20–IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma." *Blood* **105**(10): 3972-3978.
- Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S. & Taylor, R. P.** (2007). "Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies." *Mol Immunol* **44**(16): 3823-3837.
- Glennie, M. J. & Johnson, P. W. M.** (2000). "Clinical trials of antibody therapy." *Immunology Today* **21**(8): 403-410.
- Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T. & 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.
- Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Vago, L. & Introna, M.** (2006). "The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes." *Haematologica* **91**(2): 176-183.
- Golay, J., Zaffaroni, L., Vaccari, T., Lazzari, M., Borleri, G. M., Bernasconi, S., Tedesco, F., Rambaldi, A. & Introna, M.** (2000). "Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis." *Blood* **95**(12): 3900-3908.
- Golay, J. e., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A. & Introna, M.** (2001). "CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59." *Blood* **98**(12): 3383-3389.
- Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W. P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W. Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., Wu, Y., Meng, Y. G., Gribling, P., Lin, Z., Nguyen, K., Tran, T., Zhang, Y., Rosen, H., Martin, F. & Chan, A. C.** (2005). "Importance of Cellular Microenvironment and Circulatory Dynamics in B Cell Immunotherapy." *The Journal of Immunology* **174**(2): 817-826.
- Graziano, R. F. & Fanger, M. W.** (1987). "Fc gamma RI and Fc gamma RII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells." *The Journal of Immunology* **139**(10): 3536-3541.
- Greinacher, A. & Lubenow, N.** (2001). "Recombinant Hirudin in Clinical Practice : Focus on Lepirudin." *Circulation* **103**(10): 1479-1484.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. & Spies, T.** (2001). "Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." *Nat Immunol* **2**(3): 255-260.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H. & Spies, T.** (1999). "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6879-6884.
- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R. & Kranz, D. M.** (1994). "Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli." *J Immunol* **152**(11): 5368-5374.
- Guettinger, Y., Barbin, K., Peipp, M., Bruenke, J., Dechant, M., Horner, H., Thierschmidt, D., Valerius, T., Repp, R., Fey, G. H. & Stockmeyer, B.** (2010). "A recombinant bispecific single-chain fragment variable specific for HLA class II and Fc alpha RI (CD89) recruits polymorphonuclear neutrophils for efficient lysis of malignant B lymphoid cells." *J Immunol* **184**(3): 1210-1217.
- Harries, M. & Smith, I.** (2002). "The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin)." *Endocr Relat Cancer* **9**(2): 75-85.

- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichentopf, B., Kloft, M. & Pfreundschuh, M.** (1997). "Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody." *Blood* **89**(6): 2042-2047.
- Hayden, M. S., Linsley, P. S., Gayle, M. A., Bajorath, J., Brady, W. A., Norris, N. A., Fell, H. P., Ledbetter, J. A. & Gilliland, L. K.** (1994). "Single-chain mono- and bispecific antibody derivatives with novel biological properties and antitumour activity from a COS cell transient expression system." *Ther Immunol* **1**(1): 3-15.
- Hibbs, M. L., Selvaraj, P., Carpen, O., Springer, T. A., Kuster, H., Jouvin, M. H. & Kinet, J. P.** (1989). "Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16)." *Science* **246**(4937): 1608-1611.
- Holder, M., Grafton, G., MacDonald, I., Finney, M. & Gordon, J.** (1995). "Engagement of CD20 suppresses apoptosis in germinal center B cells." *Eur J Immunol* **25**(11): 3160-3164.
- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G.** (1993). ""Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6444-6448.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C. & Speck, B.** (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." *Blood* **75**(3): 555-562.
- Hosen, N., Park, C. Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Krensky, A. M. & Weissman, I. L.** (2007). "CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(26): 11008-11013.
- Huizinga, T. W., van der Schoot, C. E., Jost, C., Klaassen, R., Kleijer, M., von dem Borne, A. E., Roos, D. & Tetteroo, P. A.** (1988). "The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils." *Nature* **333**(6174): 667-669.
- Hundt, M. & Schmidt, R. E.** (1992). "The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils." *Eur J Immunol* **22**(3): 811-816.
- Ishibashi, K., Suzuki, M., Sasaki, S. & Imai, M.** (2001). "Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and [beta] subunit of the high-affinity IgE receptor." *Gene* **264**(1): 87-93.
- Ivanov, A., Beers, S. A., Walshe, C. A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K. L., Potter, K. N., Murray, S., Chan, C. H., Klymenko, T., Erenpreisa, J., Glennie, M. J., Illidge, T. M. & Cragg, M. S.** (2009). "Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells." *J Clin Invest* **119**(8): 2143-2159.
- Jaffe, E. S., Harris N.L., Stein H. & Vardiman J.W.** (2001). "Pathology and Genetics of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues". Lyon, IARC press.
- James, N. D., Atherton, P. J., Jones, J., Howie, A. J., Tchekmedyan, S. & Curnow, R. T.** (2001). "A phase II study of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-HER2 x CD64) with GM-CSF in HER2+ advanced prostate cancer." *Br J Cancer* **85**(2): 152-156.
- Johnson, P. & Glennie, M.** (2003). "The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells." *Semin Oncol* **30**(1 Suppl 2): 3-8.
- Johnson, S., Burke, S., Huang, L., Gorlatov, S., Li, H., Wang, W., Zhang, W., Tuailon, N., Rainey, J., Barat, B., Yang, Y., Jin, L., Ciccarone, V., Moore, P. A., Koenig, S. & Bonvini, E.** (2010). "Effector Cell Recruitment with Novel Fv-based Dual-affinity Re-targeting Protein Leads to Potent Tumor Cytolysis and in Vivo B-cell Depletion." *J Mol Biol*.

## Literaturverzeichnis

---

**Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G.** (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." *Nature* **321**(6069): 522-525.

**Kahl, B.** (2008). "Chemotherapy combinations with monoclonal antibodies in non-Hodgkin's lymphoma." *Semin Hematol* **45**(2): 90-94.

**Kalergis, A. M. & Ravetch, J. V.** (2002). "Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells." *J Exp Med* **195**(12): 1653-1659.

**Kaminski, M. S., Tuck, M., Estes, J., Kolstad, A., Ross, C. W., Zasadny, K., Regan, D., Kison, P., Fisher, S., Kroll, S. & Wahl, R. L.** (2005). "131I-Tositumomab Therapy as Initial Treatment for Follicular Lymphoma." *New England Journal of Medicine* **352**(5): 441-449.

**Karpovsky, B., Titus, J. A., Stephany, D. A. & Segal, D. M.** (1984). "Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fcγ receptor antibodies." *J Exp Med* **160**(6): 1686-1701.

**Kay, N. E., Hamblin, T. J., Jelinek, D. F., Dewald, G. W., Byrd, J. C., Farag, S., Lucas, M. & Lin, T.** (2002). "Chronic Lymphocytic Leukemia." *Hematology* **2002**(1): 193-213.

**Keating, M. J., O'Brien, S. & Albitar, M.** (2002). "Emerging information on the use of rituximab in chronic lymphocytic leukemia." *Semin Oncol* **29**(1 Suppl 2): 70-74.

**Kellner, C., Bruenke, J., Stieglmaier, J., Schwemlein, M., Schwenkert, M., Singer, H., Mentz, K., Peipp, M., Lang, P., Oduncu, F., Stockmeyer, B. & Fey, G. H.** (2008). "A novel CD19-directed recombinant bispecific antibody derivative with enhanced immune effector functions for human leukemic cells." *J Immunother* **31**(9): 871-884.

**Kellner, C., Valerius, T., Peipp, M.** (2011). Effector Cell Recruitment by Bispecific Antibodies in *Bispecific Antibodies*. R. E. Kontermann (Ed.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 217-241.

**Kennedy, A. D., Beum, P. V., Solga, M. D., DiLillo, D. J., Lindorfer, M. A., Hess, C. E., Densmore, J. J., Williams, M. E. & Taylor, R. P.** (2004). "Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia." *J Immunol* **172**(5): 3280-3288.

**Kiewe, P., Hasmuller, S., Kahlert, S., Heinrigs, M., Rack, B., Marme, A., Korfel, A., Jager, M., Lindhofer, H., Sommer, H., Thiel, E. & Untch, M.** (2006). "Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer." *Clin Cancer Res* **12**(10): 3085-3091.

**Kipriyanov, S. M., Cochlovius, B., Schäfer, H. J., Moldenhauer, G., Bähre, A., Le Gall, F., Knackmuss, S. & Little, M.** (2002). "Synergistic Antitumor Effect of Bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 Diabodies in a Preclinical Model of Non-Hodgkin's Lymphoma." *The Journal of Immunology* **169**(1): 137-144.

**Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., Von der Lieth, C. W., Matys, E. R. & Little, M.** (1999). "Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics." *J Mol Biol* **293**(1): 41-56.

**Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Wigzell, H. & Clifford, P.** (1968). "Surface IgM-kappa Specificity on a Burkitt Lymphoma Cell In Vivo and in Derived Culture Lines." *Cancer Research* **28**(7): 1300-1310.

**Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. S. & Mumford, D.** (1975). "An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection." *Intervirology* **5**(6): 319-334.



- Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A. E. & de Haas, M.** (1997). "Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype." *Blood* **90**(3): 1109-1114.
- Kohler, G. & Milstein, C.** (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-497.
- Kügler, M., Stein, C., Kellner, C., Mentz, K., Saul, D., Schwenkert, M., Schubert, I., Singer, H., Oduncu, F., Stockmeyer, B., Mackensen, A. & Fey, G. H.** (2010). "A recombinant trispesific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting." *British Journal of Haematology* **150**(5): 574-586.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F.** (1979). "Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens." *Science* **206**(4416): 347-349.
- Küppers, R.** (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 251-262.
- Küppers, R. & Hansmann, M. L.** (2005). "The Hodgkin and Reed/Sternberg cell." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(3): 511-517.
- Kurosaki, T. & Ravetch, J. V.** (1989). "A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII." *Nature* **342**(6251): 805-807.
- Kyogoku, C., Tsuchiya, N., Matsuta, K. & Tokunaga, K.** (2002). "Studies on the association of Fc[gamma] receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A." *Genes Immun* **3**(8): 488-493.
- Lanier, L. L.** (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-274.
- Lanier, L. L., Yu, G. & Phillips, J. H.** (1989). "Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells." *Nature* **342**(6251): 803-805.
- Lee, S. J.** (2010). "Have we made progress in the management of chronic graft-vs-host disease?" *Best Practice & Research Clinical Haematology* **23**(4): 529-535.
- Leiden, J. M., Karpinski, B. A., Gottschalk, L. & Kornbluth, J.** (1989). "Susceptibility to natural killer cell-mediated cytolysis is independent of the level of target cell class I HLA expression." *J Immunol* **142**(6): 2140-2147.
- Li, B., Shi, S., Qian, W., Zhao, L., Zhang, D., Hou, S., Zheng, L., Dai, J., Zhao, J., Wang, H. & Guo, Y.** (2008). "Development of Novel Tetravalent Anti-CD20 Antibodies with Potent Antitumor Activity." *Cancer Research* **68**(7): 2400-2408.
- Li, B., Zhao, L., Guo, H., Wang, C., Zhang, X., Wu, L., Chen, L., Tong, Q., Qian, W., Wang, H. & Guo, Y.** (2009). "Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma." *Blood* **114**(24): 5007-5015.
- Li, H., Ayer, L. M., Lytton, J. & Deans, J. P.** (2003). "Store-operated Cation Entry Mediated by CD20 in Membrane Rafts." *Journal of Biological Chemistry* **278**(43): 42427-42434.
- Liang, Y., Buckley, T. R., Tu, L., Langdon, S. D. & Tedder, T. F.** (2001). "Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12." *Immunogenetics* **53**(5): 357-368.
- Lim, S. H., Beers, S. A., French, R. R., Johnson, P. W., Glennie, M. J. & Cragg, M. S.** (2009). "Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives." *Haematologica* **95**(1): 135-143.

## Literaturverzeichnis

---

Lim, S. H., Vaughan, A. T., Ashton-Key, M., Williams, E. L., Dixon, S. V., Chan, C. H., Beers, S. A., French, R. R., Cox, K. L., Davies, A. J., Potter, K. N., Mockridge, C. I., Oscier, D. G., Johnson, P. W., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. (2011). "Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy." *Blood*.

Lindhofer, H., Mocikat, R., Steipe, B. & Thierfelder, S. (1995). "Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies." *J Immunol* **155**(1): 219-225.

Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. (1993). "Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type." *J Exp Med* **178**(4): 1321-1336.

Ljunggren, H. G. & Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* **11**(7): 237-244.

Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L. & Civin, C. I. (1987). "Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development." *Blood* **70**(5): 1316-1324.

Lu, D., Jimenez, X., Zhang, H., Bohlen, P., Witte, L. & Zhu, Z. (2002). "Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments." *J Immunol Methods* **267**(2): 213-226.

Lu, H., Shi, M., Wang, M., Xie, Z., Hu, M., Yu, M., Shen, B., Ma, Y. & Guo, N. (2008). "In vitro and in vivo antitumor effect of a trivalent bispecific antibody targeting ErbB2 and CD16." *Cancer Biol Ther* **7**(11): 1744-1750.

Mack, M., Riethmuller, G. & Kufer, P. (1995). "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7021-7025.

Maeda, T., Yamada, Y., Tawara, M., Yamasaki, R., Yakata, Y., Tsutsumi, C., Onimaru, Y., Kamihira, S. & Tomonaga, M. (2001). "Successful treatment with a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) for a patient with relapsed mantle cell lymphoma who developed a human anti-chimeric antibody." *Int J Hematol* **74**(1): 70-75.

Mahadevan, D. & Fisher, R. I. (2011). "Novel Therapeutics for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology* **29**(14): 1876-1884.

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* **348**(6301): 552-554.

McCall, A. M., Adams, G. P., Amoroso, A. R., Nielsen, U. B., Zhang, L., Horak, E., Simmons, H., Schier, R., Marks, J. D. & Weiner, L. M. (1999). "Isolation and characterization of an anti-CD16 single-chain Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity." *Molecular Immunology* **36**(7): 433-446.

McCall, A. M., Shahied, L., Amoroso, A. R., Horak, E. M., Simmons, H. H., Nielson, U., Adams, G. P., Schier, R., Marks, J. D. & Weiner, L. M. (2001). "Increasing the Affinity for Tumor Antigen Enhances Bispecific Antibody Cytotoxicity." *The Journal of Immunology* **166**(10): 6112-6117.

McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B. K. (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." *J Clin Oncol* **16**(8): 2825-2833.

McLaughlin, P., Hagemeister, F. B. & Grillo-Lopez, A. J. (1999). "Rituximab in indolent lymphoma: the single-agent pivotal trial." *Semin Oncol* **26**(5 Suppl 14): 79-87.

- Meijer, A. J. & Codogno, P.** (2004). "Regulation and role of autophagy in mammalian cells." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2445-2462.
- Meng, R., Smallshaw, J. E., Pop, L. M., Yen, M., Liu, X., Le, L., Ghetie, M. A., Vitetta, E. S. & Ghetie, V.** (2004). "The evaluation of recombinant, chimeric, tetravalent antihuman CD22 antibodies." *Clin Cancer Res* **10**(4): 1274-1281.
- Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G. & Carter, P.** (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." *Nat Biotechnol* **16**(7): 677-681.
- Mertens, N.** (2011). Tribodies: Fab-scFv Fusion Proteins as a Platform to Create Multifunctional Pharmaceuticals in *Bispecific Antibodies*. R. E. Kontermann, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 135-149.
- Michl, M.** (2010). "Basics Hämatologie". München, Fischer Verlag.
- Milstein, C. & Cuello, A. C.** (1983). "Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry." *Nature* **305**(5934): 537-540.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. & Moretta, L.** (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **19**: 197-223.
- Morgan, A. W., Griffiths, B., Ponchel, F., Montague, B. M. N., Ali, M., Gardner, P. P., Gooi, H.-C., Situnayake, R. D., Markham, A. F., Emery, P. & Isaacs, J. D.** (2000). "Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups." *Arthritis & Rheumatism* **43**(10): 2328-2334.
- Morgan, A. W., Keyte, V. H., Babbage, S. J., Robinson, J. I., Ponchel, F., Barrett, J. H., Bhakta, B. B., Bingham, S. J., Buch, M. H., Conaghan, P. G., Gough, A., Green, M., Lawson, C. A., Pease, C. T., Markham, A. F., Ollier, W. E. R., Emery, P., Worthington, J. & Isaacs, J. D.** (2003). "FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study." *Rheumatology* **42**(4): 528-533.
- Morton, L. M., Hartge, P., Holford, T. R., Holly, E. A., Chiu, B. C., Vineis, P., Stagnaro, E., Willett, E. V., Franceschi, S., La Vecchia, C., Hughes, A. M., Cozen, W., Davis, S., Severson, R. K., Bernstein, L., Mayne, S. T., Dee, F. R., Cerhan, J. R. & Zheng, T.** (2005). "Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph)." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(4): 925-933.
- Müller, D. & Kontermann, R. E.** (2007). "Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy." *Curr Opin Mol Ther* **9**(4): 319-326.
- Muller, H. P. & Varmus, H. E.** (1994). "DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes." *EMBO J* **13**(19): 4704-4714.
- Munz, M., Baeuerle, P. A. & Gires, O.** (2009). "The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling." *Cancer Res* **69**(14): 5627-5629.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M. & 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.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M. & 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." *Journal of Clinical Oncology* **26**(11): 1789-1796.

## Literaturverzeichnis

---

- Musshoff, K.** (1977). "[Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]." *Strahlentherapie* **153**(4): 218-221.
- Nakagawa, T., Natsume, A., Satoh, M. & Niwa, R.** (2009). "Nonfucosylated anti-CD20 antibody potentially induces apoptosis in lymphoma cells through enhanced interaction with Fc[gamma]RIIIb on neutrophils." *Leukemia Research* **34**(5): 666-671.
- Navarro-Sarabia, F., Ariza-Ariza, R., Hernandez-Cruz, B. & Villanueva, I.** (2006). "Adalimumab for treating rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **33**(6): 1075-1081.
- Nechansky, A., Schuster, M., Jost, W., Siegl, P., Wiederkum, S., Gorr, G. & Kircheis, R.** (2007). "Compensation of endogenous IgG mediated inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by glyco-engineering of therapeutic antibodies." *Mol Immunol* **44**(7): 1815-1817.
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G. & Rabbitts, T. H.** (1985). "A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function." *Nature* **314**(6008): 268-270.
- Ng, A. K., LaCasce, A. & Travis, L. B.** (2011). "Long-Term Complications of Lymphoma and Its Treatment." *Journal of Clinical Oncology* **29**(14): 1885-1892.
- Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G. J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Sloopstra, J. W., Timmerman, P., Brännström, A., Lindstrom, F., Mössner, E., Umana, P., Hopfner, K.-P. & Klein, C.** (2011). "Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies." *Blood* **118**(2): 358-367.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V.** (2005). "Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding." *Science* **310**(5753): 1510-1512.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V.** (2006). "Fc[gamma] Receptors: Old Friends and New Family Members." *Immunity* **24**(1): 19-28.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V.** (2007). "Antibodies, Fc receptors and cancer." *Curr Opin Immunol* **19**(2): 239-245.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V.** (2008). "Fcgamma receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 34-47.
- Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K. & Shitara, K.** (2004). "Enhancement of the Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity of Low-Fucose IgG1 Is Independent of FcgammaRIIIa Functional Polymorphism." *Clinical Cancer Research* **10**(18): 6248-6255.
- Nugent, L. J. & Jain, R. K.** (1984). "Extravascular Diffusion in Normal and Neoplastic Tissues." *Cancer Research* **44**(1): 238-244.
- O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Davies, S. L. & Neuberger, M. S.** (1998). "Mice carrying a CD20 gene disruption." *Immunogenetics* **48**(2): 125-132.
- O'Reilly, M. K., Tian, H. & Paulson, J. C.** (2011). "CD22 Is a Recycling Receptor That Can Shuttle Cargo between the Cell Surface and Endosomal Compartments of B Cells." *The Journal of Immunology* **186**(3): 1554-1563.
- Oettgen, H. C., Bayard, P. J., Van Ewijk, W., Nadler, L. M. & Terhorst, C. P.** (1983). "Further biochemical studies of the human B-cell differentiation antigens B1 and B2." *Hybridoma* **2**(1): 17-28.
- Park, C. Y., Tseng, D. & Weissman, I. L.** (2009). "Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic." *Mol Ther* **17**(2): 219-230.

- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J. H. & Friedman, G. D.** (1994). "Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma." *N Engl J Med* **330**(18): 1267-1271.
- Parsons, S., Hennig, M., Linke, R., Klein, A., Lahr, A., Lindhofer, H. & Heiss, M.** (2009). "Clinical benefit of catumaxomab in malignant ascites in patient subpopulations in a pivotal phase II/III trial." *ASCO Meeting Abstracts* **27**(15S): e14000.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D.** (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-8396.
- Peipp, M., Kupers, H., Saul, D., Schlierf, B., Greil, J., Zunino, S. J., Gramatzki, M. & Fey, G. H.** (2002). "A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells." *Cancer Res* **62**(10): 2848-2855.
- Peipp, M., van de Winkel, J. G. & Valerius, T.** (2011). "Molecular engineering to improve antibodies' anti-lymphoma activity." *Best Pract Res Clin Haematol* **24**(2): 217-229.
- Pena, J., Alonso, C., Solana, R., Serrano, R., Carracedo, J. & Ramirez, R.** (1990). "Natural killer susceptibility is independent of HLA class I antigen expression on cell lines obtained from human solid tumors." *Eur J Immunol* **20**(11): 2445-2448.
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E. B., Izumi, Y., Campbell, R. B., Berk, D. A. & Jain, R. K.** (2001). "Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4628-4633.
- Polyak, M. J. & Deans, J. P.** (2002). "Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure." *Blood* **99**(9): 3256-3262.
- Polyak, M. J., Li, H., Shariat, N. & Deans, J. P.** (2008). "CD20 Homo-oligomers Physically Associate with the B Cell Antigen Receptor." *Journal of Biological Chemistry* **283**(27): 18545-18552.
- Polyak, M. J., Taylor, S. H. & Deans, J. P.** (1998). "Identification of a Cytoplasmic Region of CD20 Required for Its Redistribution to a Detergent-Insoluble Membrane Compartment." *The Journal of Immunology* **161**(7): 3242-3248.
- Posey, J. A., Raspet, R., Verma, U., Deo, Y. M., Keller, T., Marshall, J. L., Hodgson, J., Mazumder, A. & Hawkins, M. J.** (1999). "A pilot trial of GM-CSF and MDX-H210 in patients with erbB-2-positive advanced malignancies." *J Immunother* **22**(4): 371-379.
- Preithner, S., Elm, S., Lippold, S., Locher, M., Wolf, A., Silva, A. J. d., Baeuerle, P. A. & Prang, N. S.** (2006). "High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G." *Molecular Immunology* **43**(8): 1183-1193.
- Press, O. W., Farr, A. G., Borroz, K. I., Anderson, S. K. & Martin, P. J.** (1989). "Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies." *Cancer Res* **49**(17): 4906-4912.
- Pulvertaft, J. V.** (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." *Lancet* **1**(7327): 238-240.
- Qu, Z., Goldenberg, D. M., Cardillo, T. M., Shi, V., Hansen, H. J. & Chang, C. H.** (2008). "Bispecific anti-CD20/22 antibodies inhibit B-cell lymphoma proliferation by a unique mechanism of action." *Blood* **111**(4): 2211-2219.

## Literaturverzeichnis

---

**Quintero-Hernandez, V., Juarez-Gonzalez, V. R., Ortiz-Leon, M., Sanchez, R., Possani, L. D. & Becerril, B.** (2007). "The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies." *Mol Immunol* **44**(6): 1307-1315.

**Raulet, D. H.** (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 781-790.

**Ravetch, J. V. & Kinet, J. P.** (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol* **9**: 457-492.

**Ravetch, J. V. & Lanier, L. L.** (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science* **290**(5489): 84-89.

**Ravetch, J. V. & Perussia, B.** (1989). "Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions." *J Exp Med* **170**(2): 481-497.

**Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N. & Anderson, D. R.** (1994). "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." *Blood* **83**(2): 435-445.

**Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R.** (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3116-3120.

**Ridgway, J. B., Presta, L. G. & Carter, P.** (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." *Protein Eng* **9**(7): 617-621.

**Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G.** (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature* **332**(6162): 323-327.

**Robak, T., Lech-Maranda, E. & Robak, P.** (2011). "Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide or other agents in chronic lymphocytic leukemia." *Expert Review of Anticancer Therapy* **10**(10): 1529-1543.

**Robert-Koch-Institut** (2010). "Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.". Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)

**Roman, E. & Smith, A. G.** (2011). "Epidemiology of lymphomas." *Histopathology* **58**(1): 4-14.

**Roopenian, D. C. & Akilesh, S.** (2007). "FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 715-725.

**Ruf, P., Gires, O., Jager, M., Fellingner, K., Atz, J. & Lindhofer, H.** (2007). "Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer." *Br J Cancer* **97**(3): 315-321.

**Salles, G. A.** (2007). "Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 216-225.

**Salmon, J. E., Edberg, J. C. & Kimberly, R. P.** (1990). "Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities." *J Clin Invest* **85**(4): 1287-1295.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

**Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O.** (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J Exp Med* **97**(5): 695-710.

- Schlereth, B., Fichtner, I., Lorenczewski, G., Kleindienst, P., Brischwein, K., da Silva, A., Kufer, P., Lutterbuese, R., Junghahn, I., Kasimir-Bauer, S., Wimberger, P., Kimmig, R. & Baeuerle, P. A. (2005). "Eradication of Tumors from a Human Colon Cancer Cell Line and from Ovarian Cancer Metastases in Immunodeficient Mice by a Single-Chain Ep-CAM-/CD3-Bispecific Antibody Construct." *Cancer Research* **65**(7): 2882-2889.
- Schmitz, N., Buske, C. & Gisselbrecht, C. (2007). "Autologous Stem Cell Transplantation in Lymphoma." *Seminars in Hematology* **44**(4): 234-245.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Fiers, W., Grooten, J. & Mertens, N. (2000). "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives." *Journal of Immunology* **165**(12): 7050-7057.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Leoen, J., Grooten, J. & Mertens, N. (2001). "A new model for intermediate molecular weight recombinant bispecific and trispecific antibodies by efficient heterodimerization of single chain variable domains through fusion to a Fab-chain." *Biomolecular Engineering* **17**(6): 193-202.
- Schroeder Jr, H. W. & Cavacini, L. (2010). "Structure and function of immunoglobulins." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(2, Supplement 2): S41-S52.
- Schroff, R. W., Foon, K. A., Beatty, S. M., Oldham, R. K. & Morgan, A. C. (1985). "Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy." *Cancer Research* **45**(2): 879-885.
- Segal, D. M., Weiner, G. J. & Weiner, L. M. (1999). "Bispecific antibodies in cancer therapy." *Current Opinion in Immunology* **11**(5): 558-562.
- Sehn, L. H., Donaldson, J., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Klasa, R., MacPherson, N., O'Reilly, S., Spinelli, J. J., Sutherland, J., Wilson, K. S., Gascoyne, R. D. & Connors, J. M. (2005). "Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia." *J Clin Oncol* **23**(22): 5027-5033.
- Seimetz, D., Lindhofer, H. & Bokemeyer, C. (2010). "Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy." *Cancer Treat Rev* **36**(6): 458-467.
- Shahied, L. S., Tang, Y., Alpaugh, R. K., Somer, R., Greenspon, D. & Weiner, L. M. (2004). "Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format." *J Biol Chem* **279**(52): 53907-53914.
- Shan, D., Ledbetter, J. A. & Press, O. W. (1998). "Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies." *Blood* **91**(5): 1644-1652.
- Shashidharamurthy, R., Zhang, F., Amano, A., Kamat, A., Panchanathan, R., Ezekwudo, D., Zhu, C. & Selvaraj, P. (2009). "Dynamics of the Interaction of Human IgG Subtype Immune Complexes with Cells Expressing R and H Allelic Forms of a Low-Affinity Fcγ3 Receptor CD32A." *The Journal of Immunology* **183**(12): 8216-8224.
- Shawler, D. L., Bartholomew, R. M., Smith, L. M. & Dillman, R. O. (1985). "Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG." *The Journal of Immunology* **135**(2): 1530-1535.
- Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zarskiy, A. G., Lukyanov, S. & Chudakov, D. M. (2007). "Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging." *Nat Methods* **4**(9): 741-746.

## Literaturverzeichnis

---

- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Misaka, H., Mori, K., Yano, K., Shitara, K. & Satoh, M.** (2009). "Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils." *Exp Hematol* **37**(3): 309-321.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. & Presta, L. G.** (2002). "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity." *Journal of Biological Chemistry* **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. & 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 FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R." *J Biol Chem* **276**(9): 6591-6604.
- Shiokawa, M., Takahashi, T., Murakami, A., Kita, S., Ito, M., Sugamura, K. & Ishii, N.** (2010). "In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice." *Biochem Biophys Res Commun* **399**(4): 733-737.
- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L. & Handgretinger, R.** (2005). "Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R-null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells." *The Journal of Immunology* **174**(10): 6477-6489.
- Smith, G. P.** (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* **228**(4705): 1315-1317.
- Smith, S. L.** (1996). "Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review." *J Transpl Coord* **6**(3): 109-119; quiz 120-101.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U.** (2000). "The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex." *Nature* **406**(6793): 267-273.
- Stamenkovic, I. & Seed, B.** (1988). "Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B1, Bp35), a type III integral membrane protein." *J Exp Med* **167**(6): 1975-1980.
- Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. & Schlossman, S. F.** (1980). "Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen." *The Journal of Immunology* **125**(4): 1678-1685.
- Staudt, L. M. & Dave, S.** (2005). "The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling." *Adv Immunol* **87**: 163-208.
- Stein, R., Qu, Z., Chen, S., Rosario, A., Shi, V., Hayes, M., Horak, I. D., Hansen, H. J. & Goldenberg, D. M.** (2004). "Characterization of a New Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody, IMMU-106, and Its Use in Combination with the Humanized Anti-CD22 Antibody, Epratuzumab, for the Therapy of Non-Hodgkin's Lymphoma." *Clinical Cancer Research* **10**(8): 2868-2878.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K. & Spies, T.** (2001). "Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family." *Immunogenetics* **53**(4): 279-287.
- Stockmeyer, B., Valerius, T., Repp, R., Heijnen, I. A., Buhning, H. J., Deo, Y. M., Kalden, J. R., Gramatzki, M. & van de Winkel, J. G.** (1997). "Preclinical studies with Fc(gamma)R bispecific antibodies and granulocyte colony-stimulating factor-primed neutrophils as effector cells against HER-2/neu overexpressing breast cancer." *Cancer Res* **57**(4): 696-701.
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D. & Panoskaltsis, N.** (2006). "Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412." *N Engl J Med* **355**(10): 1018-1028.



- Suresh, M. R., Cuello, A. C. & Milstein, C.** (1986). "Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas." *Methods Enzymol* **121**: 210-228.
- Swerdlow, A. J.** (2003). "Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30 Suppl 1**: S3-12.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N.L., et al.** (2008). "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues". Lyon, France, IARC Press.
- Tamm, A. & Schmidt, R. E.** (1996). "The binding epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding." *The Journal of Immunology* **157**(4): 1576-1581.
- Tang, Y., Lou, J., Alpaugh, R. K., Robinson, M. K., Marks, J. D. & Weiner, L. M.** (2007). "Regulation of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity by IgG Intrinsic and Apparent Affinity for Target Antigen." *The Journal of Immunology* **179**(5): 2815-2823.
- Tedder, T. F.** (2009). "CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* **5**(10): 572-577.
- Tedder, T. F. & Engel, P.** (1994). "CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes." *Immunol Today* **15**(9): 450-454.
- Tedder, T. F., Klejman, G., Disteché, C. M., Adler, D. A., Schlossman, S. F. & Saito, H.** (1988). "Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19." *The Journal of Immunology* **141**(12): 4388-4394.
- Tedder, T. F. & Schlossman, S. F.** (1988). "Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes." *Journal of Biological Chemistry* **263**(20): 10009-10015.
- Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W., Hack, C. E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J. G. & Glennie, M. J.** (2004). "Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas." *Blood* **104**(6): 1793-1800.
- Teeling, J. L., Mackus, W. J., Wiegman, L. J., van den Brakel, J. H., Beers, S. A., French, R. R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Sloopstra, J. W., Parren, P. W., Glennie, M. J. & van de Winkel, J. G.** (2006). "The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20." *Journal of Immunology* **177**(1): 362-371.
- Tefferi, A., Bartholmai, B. J., Witzig, T. E., Li, C. Y., Hanson, C. A. & Phyllyk, R. L.** (1996). "Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Am J Clin Pathol* **106**(4): 457-461.
- Thie, H., Voedisch, B., Dubel, S., Hust, M. & Schirrmann, T.** (2009). "Affinity maturation by phage display." *Methods Mol Biol* **525**: 309-322, xv.
- Tiacci, E., Liso, A., Piris, M. & Falini, B.** (2006). "Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia." *Nat Rev Cancer* **6**(6): 437-448.
- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M. & Ishida, I.** (2000). "Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 722-727.

- Topp, M. S., Kufer, P., Gökbüget, N., Goebeler, M., Klinger, M., Neumann, S., Horst, H.-A., Raff, T., Viardot, A., Schmid, M., Stelljes, M., Schaich, M., Degenhard, E., Köhne-Volland, R., Brüggemann, M., Ottmann, O., Pfeifer, H., Burmeister, T., Nagorsen, D., Schmidt, M., Lutterbüese, R., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A., Kneba, M., Einsele, H., Riethmüller, G., Hoelzer, D., Zugmaier, G. & Bargou, R. C. (2011). "Targeted Therapy With the T-Cell Engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival." *Journal of Clinical Oncology* **29**(18): 2493-2498.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J. C., Lanzavecchia, A. & Manz, M. G. (2004). "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice." *Science* **304**(5667): 104-107.
- Trempe, G. L. (1976). "Human breast cancer in culture." *Recent Results Cancer Res*(57): 33-41.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv Immunol* **47**: 187-376.
- Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J. A., Bowen, K., Steeber, D. A., Haas, K. M., Poe, J. C. & Tedder, T. F. (2004). "Mouse CD20 expression and function." *International Immunology* **16**(1): 119-129.
- Valone, F. H., Kaufman, P. A., Guyre, P. M., Lewis, L. D., Memoli, V., Deo, Y., Graziano, R., Fisher, J. L., Meyer, L., Mrozek-Orlowski, M. & et al. (1995). "Phase Ia/Ib trial of bispecific antibody MDX-210 in patients with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses the proto-oncogene HER-2/neu." *J Clin Oncol* **13**(9): 2281-2292.
- van der Kolk, L. E., Grillo-Lopez, A. J., Baars, J. W., Hack, C. E. & van Oers, M. H. (2001). "Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment." *Br J Haematol* **115**(4): 807-811.
- van Spriël, A. B., van Ojik, H. H. & van de Winkel, J. G. J. (2000). "Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies." *Immunology Today* **21**(8): 391-397.
- Vitale, C., Romagnani, C., Falco, M., Ponte, M., Vitale, M., Moretta, A., Bacigalupo, A., Moretta, L. & Mingari, M. C. (1999). "Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15091-15096.
- Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Winter, C. C., Peruzzi, M. & Long, E. O. (1995). "Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer." *Immunity* **3**(6): 801-809.
- Walshe, C. A., Beers, S. A., French, R. R., Chan, C. H., Johnson, P. W., Packham, G. K., Glennie, M. J. & Cragg, M. S. (2008). "Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling." *J Biol Chem* **283**(25): 16971-16984.
- Wang, S. Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzing, D. C., Vogel, C. W., St John, W. & Weiner, G. J. (2009). "Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model." *Blood* **114**(26): 5322-5330.
- Weiner, L. M., Holmes, M., Adams, G. P., LaCreta, F., Watts, P. & de Palazzo, I. G. (1993). "A Human Tumor Xenograft Model of Therapy with a Bispecific Monoclonal Antibody Targeting c-erbB-2 and CD16." *Cancer Research* **53**(1): 94-100.
- Weiner, L. M., Holmes, M., Richeson, A., Godwin, A., Adams, G. P., Hsieh-Ma, S. T., Ring, D. B. & Alpaugh, R. K. (1993). "Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1." *J Immunol* **151**(5): 2877-2886.

- Weiner, L. M., Padavic-Shaller, K., Kitson, J., Watts, P., Krigel, R. L. & Litwin, S.** (1991). "Phase I evaluation of combination therapy with interleukin 2 and gamma-interferon." *Cancer Res* **51**(15): 3910-3918.
- Weng, W. K. & Levy, R.** (2003). "Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma." *J Clin Oncol* **21**(21): 3940-3947.
- Wierda, W. G., Kipps, T. J., Mayer, J., Stilgenbauer, S., Williams, C. D., Hellmann, A., Robak, T., Furman, R. R., Hillmen, P., Trneny, M., Dyer, M. J. S., Padmanabhan, S., Piotrowska, M., Kozak, T., Chan, G., Davis, R., Losic, N., Wilms, J., Russell, C. A. & Österborg, A.** (2010). "Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* **28**(10): 1749-1755.
- Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J. M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G. & Ashkenazi, A.** (2011). "An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells." *Cancer Cell* **19**(1): 101-113.
- Witzig, T. E., Flinn, I. W., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Czuczman, M. S., Saleh, M. N., Cripe, L., Wiseman, G., Olejnik, T., Multani, P. S. & White, C. A.** (2002). "Treatment With Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy in Patients With Rituximab-Refractory Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology* **20**(15): 3262-3269.
- Wolf, E., Hofmeister, R., Kufer, P., Schlereth, B. & Baeuerle, P. A.** (2005). "BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity." *Drug Discov Today* **10**(18): 1237-1244.
- Wu, J., Edberg, J. C., Redecha, P. B., Bansal, V., Guyre, P. M., Coleman, K., Salmon, J. E. & Kimberly, R. P.** (1997). "A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease." *J Clin Invest* **100**(5): 1059-1070.
- Xie, Z., Guo, N., Yu, M., Hu, M. & Shen, B.** (2005). "A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis." *J Immunol Methods* **296**(1-2): 95-101.
- Zeidler, R., Mysliwietz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B. & Lindhofer, H.** (2000). "The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells." *Br J Cancer* **83**(2): 261-266.
- Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B. & Lindhofer, H.** (1999). "Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing." *J Immunol* **163**(3): 1246-1252.

### 8 Patienten Charakteristika

Tabelle 19: Patienten Charakteristika

Patient	Alter (a) / Geschlecht	Diagnose	CD20 Expression (RFI)	Herkunft
1	75 / m	CLL	1,4	KM
2	70 / m	CLL	1,3	PB
3	71 / m	CLL	4,7	PB
4	86 / m	CLL	8,5	KM
5	82 / m	CLL	1,9	PB
6	63 / m	CLL	5,2	KM
7	74 / w	CLL	5,5	PB
8	66 / m	CLL	3,4	PB
9	81 / w	MCL	31,1	PB
10	56 / m	MCL	27,8	PB
11	47 / m	MCL	9,3	PB
12	73 / m	MZL	24,5	PB
13	76 / m	MCL	19,3	PB
14	82 / w	CLL	2,4	PB

M, männlich; w, weiblich; RFI, relative Fluoreszenzintensität;  
KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
*	Stern
#	Doppelkreuz
A	Adenin
α-	Anti-
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolinsulonat (6)] Diammoniumsalz
ADCC	Antibody dependent cell mediated cytotoxicity; Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
ALL	Akut lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Colletion
BSA	Bovines Serumalbumin
bsscFv	<i>Bispecific single-chain Fv</i>
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , immunphänotypische Unterscheidungsgruppen
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity</i> ; komplementabhängige Zytotoxizität
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	<i>Complemenarity determining region</i> ; hypervariablen Regionen
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Kette
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette
CLL	Chromisch lymphatische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	<i>Counts per minute</i> ; Zählungen pro Minute
DLB	Denaturierender Lyse-Puffer
DLBCL	<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> ; diffuses, großzelliges B-Zell Lymphom
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol

## Abkürzungsverzeichnis

---

E	Einheiten
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay; Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
E:T	Ratio von Effektorzelle zu Zielzelle (Target)
Fab	Fragment antigen binding; Antigen-bindendes Fragment
FACS	Fluorescence activated cell sorting; Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fc	Fragment crystallizable; konstanter Teil eines Antikörpers
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	Neonataler FC-Rezeptor
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
Fd	Fragment difficult
Fv	Variabler Teil eines Antikörpers
G	Guanin
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	<i>Graft versus host disease</i> ; Transplantat-gegen-Wirt Reaktion
GvL	<i>Graft versus leukemia reaction</i> ; Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HABA	<i>Human anti bispecific antibodies</i> ; humane Anti-bispezifische-Antikörper
HACA	<i>Human anti chimeric antibodies</i> ; humane Anti-chimäre-Antikörper
HAMA	<i>Human anti mouse antibodies</i> ; humane Anti-Maus-Antikörper
HARA	<i>Human anti rat antibodies</i> ; humane Anti-Ratte-Antikörper
HBS	<i>HEPES buffered saline</i> ; HEPES-gepufferte Saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Markierung
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
hu	Human
Ig	Immunglobulin
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> ; Immunrezeptor Tyrosin basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> ; Immunrezeptor Tyrosin basiertes Inhibitionsmotiv
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark

L	Leichte Kette
l	Liter
L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub>	Flexibler Linker 1 (G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> , flexibler Linker 2 (G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub>
M	Molar
m	männlich
mA	Milliampere
MCL	<i>Mantle cell lymphoma</i> ; Mantelzell-Lymphom
min	Minute
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Magermilchpulver
MTX	Methotrexathydrat
MZL	Marginal zone lymphoma; Marginalzonen-Lymphom
n. b.	Nicht bestimmt
n. r.	Nicht reduzierende Bedingungen
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
NOD	<i>Non-obese diabetic</i> ; nicht-fettleibige Diabetes
P	Patient
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PB	Peripheres Blut
PBA	PBS mit BSA
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Saline
PC7	R-Phycoerythrin-Cyanin 7
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pM	Pikomolar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
red.	Reduzierende Bedingungen
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
s	Sekunde

## Abkürzungsverzeichnis

---

scFv	<i>Single-chain fragment variable</i> ; einkettiges, variables Fragment
SCID	<i>Severe combined immune deficiency</i> ; schwerer, kombinierter Immundefekt
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> ; superoptimale Brühe mit Katabolitrepession
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Tribody
TBS	<i>Tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Saline
TBS-T	TBS mit Tween
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U/ml	Umdrehungen pro Milliliter
V <sub>H</sub>	Variable Region der schweren Kette
V <sub>L</sub>	Variable Region der leichten Kette
vs.	<i>Versus</i> ; gegen
w	weiblich
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i> ; Zeta-Kette-assozierte Proteinkinase 70



### 10 Eigene Veröffentlichungen

**Glorius P.\***, Baerenwaldt A.\*, Kellner C., Staudinger M., Dechant M., Stauch M., Beurskens F.J., Parren P.W., van de Winkel J.G., Valerius T., Humpe A., Repp R., Gramatzki M., Nimmerjahn F. & Peipp M. „The novel tribody [(CD20)<sub>2</sub>×CD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of B cell tumors.“ *Leukemia*. In Revision. \* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Kellner C., Hallack D., **Glorius P.**, Staudinger M., Mohseni Nodehi S., de Weers M., van de Winkel J.G., Parren P.W., Stauch M., Valerius T., Repp R., Humpe A., Gramatzki M. & Peipp M. (2011) „Fusion proteins between ligands for NKG2D and CD20-directed single-chain variable fragments sensitize lymphoma cells for natural killer cell-mediated lysis and enhance antibody dependent cellular cytotoxicity“. *Leukemia*. Akzeptiert und im Druck.

Repp R., Kellner C., Muskulus A., Staudinger M., Mohseni Nodehi S., **Glorius P.**, Akramiene D., Dechant M., Fey G.H., van Berkel P.H., van de Winkel J.G., Parren P.W., Valerius T., Gramatzki M. & Peipp M. (2011) „Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC.“ *J Immunol Methods*. 373(1-2):67-78.

Kellner C.\*, Bleeker W.K.\*, Lammerts van Bueren J.J., Staudinger M., Klausz K., Derer S., **Glorius P.**, Muskulus A., de Goeij, B.E., van de Winkel J.G., Parren P.W., Valerius T., Gramatzki M. & Peipp M. (2011) „Human kappa light chain targeted Pseudomonas exotoxin A-identifying human antibodies and Fab fragments with favorable characteristics for antibody-drug conjugate development.“ *J Immunol Methods*. 371(1-2):122-133. \* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

#### Kongress-Beiträge

**Glorius P.**, Baerenwaldt A., Kellner C., Staudinger M., Parren P.W., van de Winkel J.G., Humpe A., Valerius T., Repp R., Nimmerjahn F., Gramatzki M. & Peipp M. (2010) „Effector mechanisms of a novel [(CD20)<sub>2</sub>×CD16]-directed bispecific antibody *in vitro* and *in vivo*.“ *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie*. Abstract V331.

#### Poster

**Glorius P.**, Baerenwaldt A., Kellner C., Staudinger M., Parren P.W., van de Winkel J.G., Humpe A., Valerius T., Repp R., Nimmerjahn F., Gramatzki M. & Peipp M. (2010) „The novel bispecific antibody [(CD20)<sub>2</sub>×CD16] efficiently triggers lysis of neoplastic B cells.“ *52<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition*. Abstract 2846.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Pia Glorius  
Geboren: am 16.05.1979  
Geburtsort: Groß-Umstadt  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulischer Werdegang

1993-1998 Max-Planck-Schule, Gymnasium, Groß-Umstadt

## Berufsausbildung

1998-2001 Ausbildung zur Biologielaborantin, Merck KGaA, Darmstadt

## Berufserfahrung

2001-2002 Biologielaborantin, Merck KGaA, Darmstadt  
2003 Biologielaborantin, Merck KGaA, Darmstadt  
2003-2004 Laborangestellte, EnviChem, Groß-Umstadt  
2005 Biologielaborantin, Merck KGaA, Darmstadt

## Studium

2002-2005 Studium der Biologie (Diplom), mit abgeschlossenem Vordiplom  
Technische Universität Darmstadt; 5 Semester  
2005-2008 Abgeschlossenes Studium der Biologie (Diplom),  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 6 Semester  
2008 Diplomarbeit an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des  
Universitätsklinikums Würzburg  
Thema: „Der mitotische Zellzykluskontrollpunkt astrozytärer  
Gliome: Funktions- und Expressionsanalysen von PA28γ, Ubc9  
und der neuen Proteine RIKEN 1700017B05 und KIAA 1731.“  
Betreuer: Prof. Dr. med. Roosen

## Promotion

Seit Juni 2008 Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel;  
7 Semester  
Thema: „Effektormechanismen eines rekombinanten,  
bispezifischen Antikörpers, [(CD20)<sub>2</sub>xCD16], im Tribody-Format.“  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C.G. Bosch



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Teile dieser Dissertation sind zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, ..... (Pia Glorius)



## Danksagung

In allen Phasen meiner Promotion habe ich vielfältige Unterstützung und Anregung erfahren. Es war eine inspirierende und lehrreiche Zeit für mich. Dafür möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn **Professor Martin Gramatzki** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die wissenschaftlichen Ratschläge bedanken. Unter den ausgezeichneten Bedingungen und den gebotenen Fortbildungsmöglichkeiten war es mir eine Freude zu promovieren.

Herrn **Professor Thomas G. C. Bosch** danke ich für die Übernahme der Betreuung, das Interesse an meiner Arbeit und die anregende, wissenschaftliche Diskussion.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Matthias Peipp** für das entgegengebrachte Vertrauen, den unvergleichbaren Optimismus und die Weitergabe seiner Erfahrung und seines grenzenlos scheinenden Wissens. Danke für die ausdauernde Motivation und die optimale Dosis Glukose zur rechten Zeit. Forschung macht tatsächlich Spaß!

Außerdem möchte ich mich beim gesamten **Forschungsteam des Dr. Mildred Scheel Hauses** für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die familiäre Atmosphäre bedanken.

Allen voran bedanke ich mich bei **Dr. Christian Kellner** und **Dr. Matthias Staudinger** für ihre fachliche Kompetenz und die geduldigen Hilfestellungen zu meinem Projekt.

Ganz herzlicher Dank gilt meiner Büro-Mitbewohnerin **Dr. Stefanie Derer** für die anregenden Gespräche auch über nicht-forschungsrelevante Themen und den Beistand während meiner „Durchhänger“.

Bei den fleißigen Bienen im Labor, vor allem bei **Anja Muskulus, Daniela Hallack, Heidi Bosse** und **Britta von Below**, bedanke ich mich für die zahlreichen Tipps, Tricks und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente.

Unseren Kooperationspartnern Herrn **Professor Falk Nimmerjahn, Anne Bärenwaldt** und den Mitarbeitern (Erlangen), sowie **Dr. Sanjay Tiwari** (Kiel) danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Durchführung des *in vivo* Imaging.

Additionally, I would like to thank **Professor Jan G. J. van de Winkel, Dr. Paul W. H. I. Parren, Dr. Wim Bleeker, Jeroen van den Brakel** and all the other employees of Genmab for their support and expertise. I am grateful for our successful collaboration.

Ganz herzlichen Dank möchte ich meinen **Freunden** in Kiel und verteilt in ganz Deutschland zukommen lassen. Danke für die Ablenkung, das Ertragen meiner Launen, die unzähligen Freizeitgestaltungen und die Unterstützung (in Form von Blutspenden). Ganz besonders meinen Mädels, allen voran **Angie, Katja, Ina & Dani**, danke ich fürs Zuhören und die Durchhalteparolen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren grenzenlose Unterstützung und Rückhalt ich nicht so weit gekommen wäre. **Mama, Papa, Jan, Iris, Astrid & Opa Willi**: Danke für euer Vertrauen und eure Liebe.