

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. M. Gramatzki)

im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel
an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

**ANALYSE DER TUMORZELLYSE HEXAMERISIERENDER
IgG1-ANTIKÖRPER**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anna-Lina Tammen

aus

Hannover

Kiel 2017

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas
Valerius

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Daniela Wesch

Tag der mündlichen Prüfung:

17. Mai 2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 7.
Februar 2018

gez. Prof. Dr. Maser

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Glossarium | III |
| 1 Einleitung..... | 4 |
| 1.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor | 4 |
| 1.2 Antikörper..... | 5 |
| 1.3 Effektormechanismen von Antikörpern..... | 6 |
| 1.3.1 Fab-vermittelte Wirkmechanismen..... | 7 |
| 1.3.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen..... | 7 |
| 1.3.2.1 Antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität..... | 8 |
| 1.3.2.2 Komplement-vermittelte Zytotoxizität | 9 |
| 1.4 Strategien zur Optimierung Antikörper-basierter Tumorthérapien | 11 |
| 1.5 Zielsetzung..... | 15 |
| 2 Material..... | 16 |
| 2.1 Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software..... | 16 |
| 2.2 Zelllinien und ihre Kultivierung | 18 |
| 2.4 Antikörper..... | 19 |
| 3 Methoden | 21 |
| 3.1 Durchflusszytometrie..... | 21 |
| 3.2 EGFR-Internalisierung und Proliferationsinhibition | 22 |
| 3.3 Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay | 23 |
| 3.4 Experimente mit speziellem Material..... | 24 |
| 3.5 Gewinnung von Serum, Vollblut und Effektorzellen | 24 |
| 3.6 CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay | 25 |
| 3.7 Zytotoxizitäts-Analyse..... | 26 |
| 3.8 Auswertung, Darstellung und Statistik..... | 26 |
| 4 Ergebnisse..... | 28 |
| 4.1 Funktionelle Charakterisierung von IgG1-2F8-E345K..... | 28 |
| 4.1.1 Fab-vermittelte Wirkmechanismen | 28 |
| 4.1.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen | 31 |
| 4.1.2.1 ADCC | 31 |
| 4.1.2.1.1 Fc γ -Rezeptor-Bindung..... | 31 |
| 4.1.2.2 CDC | 32 |
| 4.1.2.2.1 C1q-ELISA | 32 |
| 4.1.2.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz | 33 |
| 4.1.2.2.3 Zytotoxizitäts-Analyse..... | 34 |
| 4.1.2.2.4 Einfluss des EGFR-Expressionslevels..... | 36 |
| 4.1.2.2.5 Hemmung der Fc-Fc-Interaktion | 37 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.2 | Vergleich von Antikörpern gegen verschiedene Epitope | 39 |
| 5 | Diskussion..... | 43 |
| 9 | Zusammenfassung | 50 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 51 |
| 11 | Erklärung | 56 |
| 12 | Curriculum vitae | 57 |
| 13 | Danksagung | 58 |
| 14 | Veröffentlichungen | 59 |

Glossarium

| | |
|-----------|--|
| A. dest. | destilliertes Wasser |
| ADCC | Antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität |
| Ak | Antikörper |
| BR | Basalrate |
| B-RAF | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| C4BP | C4-bindendes Protein |
| CD | Cluster der Differenzierung |
| CDC | Komplement-vermittelte Zytotoxizität |
| CFHR1 | complement factor H related protein 1 |
| CR1g | Complement rezeptor of the immunoglobulin superfamily |
| CRP | komplementregulatorisches Protein |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide USP Grade |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (eng. Epidermal Growth Factor) |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| ELISA | Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| Kontr. | Kontrolle |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma viral oncogene |
| MAK | Membran-Angriffs-Komplex |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| mCRP | Membran-gebundenes CRP |
| MEM NEAA | minimum essential medium non essential amino acids |
| MNC | Mononukleäre Zellen |
| MoA | Aktionsmechanismus (eng. Mechanism of Action) |
| MR | Maximalrate |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| n.s. | nicht signifikant |
| OPD | O-Phenylenediamin Dihydrochlorid |
| PDB | Protein Data Bank |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMN | Polymorphnukleäre Zellen |
| PTEN | Phosphoinositide-3-kinase, phosphatase and kinase |
| rh GM-CSF | Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| TKI | Tyrosinkinase-Inhibitor |

1 Einleitung

Krebsleiden sind die häufigste Todesursache nach Herz- und Kreislauferkrankungen (Xu et al., 2016). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht in ihrem World Cancer Report 2014 (Stewart et al., 2014) zudem von einem deutlichen Anstieg von Krebserkrankungen aus. Ihre Prävention, Diagnostik und Therapie stellen somit eine große Herausforderung für unsere Gesellschaft dar. Bereits in den 1960er Jahren wurde intensiv an der Erforschung neuer Therapien gearbeitet. Neben einer Vielzahl von Medikamenten entstand auch die molekulare zielgerichtete Tumorthherapie, zu der unter anderem die monoklonalen Antikörper (van Cutsem et al., 2009) gehören. Diese erkennen selektiv Zielantigene, die idealerweise überwiegend auf der Oberfläche maligner Zellen exprimiert werden. In den 1990er Jahren konnte der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (engl. Epidermal growth factor receptor, EGFR) als Schlüsselmolekül beschrieben werden, dessen Blockade zur Hemmung des Zellwachstums führen kann (Mendelsohn, 2002). In den 90er Jahren konnte darüber hinaus die Überexpression des EGFR in zahlreichen epithelialen Tumoren gezeigt werden (Ozanne et al., 1986). Zu den mit EGFR-assoziierten Tumoren gehören Kopf-Hals-Tumoren und Tumoren der Brust, der Blase, der Niere, der Eierstöcke und des Darms sowie der Lunge (Mendelsohn et al., 2006). Damit galt der Rezeptor schon früh als aussichtsreiches Zielmolekül für molekulare Therapien in der Onkologie.

1.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor

Der EGFR gehört zur Familie der ErbB Rezeptoren (ErbB, engl. erythroblastic leukemia viral oncogene), die aus vier transmembranären Typ I Proteinen (Her1 – Her4) bestehen. Die Mitglieder der ErbB Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Organentwicklung und regulieren Zelldifferenzierung und Zellwachstum. Der EGFR (Her1) ist ein membranständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa und besteht strukturell aus extrazellulärer Liganden-Bindestelle, Transmembranregion und intrazellulärer Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität.

Als Liganden des EGFR konnten verschiedene Peptide identifiziert werden: Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF), Transformierender Wachstumsfaktor α (engl. Transforming Growth Factor alpha, TGF α), Amphiregulin, Heparin-bindender EGF,

β -Cellulin, Epiregulin, Epigen (Harris, R. C. et al., 2003). Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren mit Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomänen. Die phosphorylierten Tyrosinreste ermöglichen die Bindung weiterer Proteine und so die Initiierung der nachgeschalteten Signalkaskaden. Dabei handelt es sich weniger um direkt ablaufende Kaskaden als vielmehr um ein komplexes Netzwerk von ineinander greifenden Signalwegen.

Die Effektivität einer EGFR-gerichteten Therapie hängt unter anderem entscheidend vom Aktivierungsverhalten des Rezeptors ab. Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapieresistenz mit aktivierenden Mutationen in folgenden Genen assoziiert ist: KRAS (engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene) (Lièvre et al., 2008), (van Cutsem et al., 2009), BRAF (engl. v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) (Di Nicolantonio et al., 2008) (Bokemeyer et al., 2012) und PTEN (engl. Phosphoinositide-3-kinase, phosphatase and kinase) (Frattini et al., 2007). Die Mutationen bewirken eine Liganden-unabhängige Aktivierung des EGFR, die besonders für Therapeutika von Konsequenz sind, die in den Aktivierungsprozess eingreifen.

Mit dem Verständnis der molekularen Strukturen und Signalwege des EGFR ist ein weites Spektrum an Therapeutika entstanden, die in die Signalwege des Rezeptors eingreifen. Dazu gehören neben den mAk auch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) und Antisense-Oligodesoxynukleotide (Yewale et al., 2013).

1.2 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, setzen sich aus zwei schweren Ketten (engl. heavy chains) und zwei leichten Ketten (engl. light chains) zusammen (Lièvre et al., 2008). Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Strukturell lassen sich zwei antigenbindende Fragmente (Fab-Fragmente oder Fab-Teile) von einem Fc-Fragment (Fc-Teil) abgrenzen. Der Fab-Teil wird durch die variable Domäne, die die Antigenbindestelle bestimmt, und einen Teil der konstanten Domäne gebildet, die sich in den Fc-Teil fortsetzt. Immunglobuline können anhand ihrer konstanten Region in fünf Isotypen unterteilt werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Rassow, 2008).

Da für diese Arbeit nur IgG von Relevanz sind, soll hier nicht weiter auf die anderen Isotypen eingegangen werden. IgG können in den Isoformen IgG1 bis IgG4 vorliegen. Am Übergang

der Fab-Teile in den Fc-Teil befindet sich die sogenannte Hinge-Region, die eine gewisse Beweglichkeit des Fc-Teils gegenüber den Fab-Teilen erlaubt.

Da das IgM-Molekül später noch eine Rolle spielt, hier dennoch einige Worte: Lösliche IgM-Moleküle nehmen meist eine pentamere Form an, wobei die einzelnen Moleküle durch eine J-Kette verbunden werden. Eine hexamere Form des IgM ohne J-Kette ist ebenfalls möglich (Nimmerjahn, 2013). Czajkowsky und Shao konnten zeigen, dass das IgM-Pentamer nicht plan im Raum vorliegt, sondern eine Pilz-ähnliche Form einnimmt, wobei die Fc-Teile aus der Fab-Ebene herausragen (Czajkowsky et al., 2009).

1.3 Effektormechanismen von Antikörpern

Die Wirkmechanismen von Antikörpern lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen einteilen: die direkten, durch die Antigen-Bindung vermittelten Effekte (Fab-vermittelte Wirkmechanismen) und die indirekten, durch das Immunsystem-vermittelten Effekte (Fc-vermittelte Wirkmechanismen). Für viele der heute zugelassenen mAk werden immunvermittelte Wirkmechanismen diskutiert. Eine schematische Zusammenfassung der Wirkmechanismen von EGFR-gerichteten Antikörpern gibt Abbildung 1.

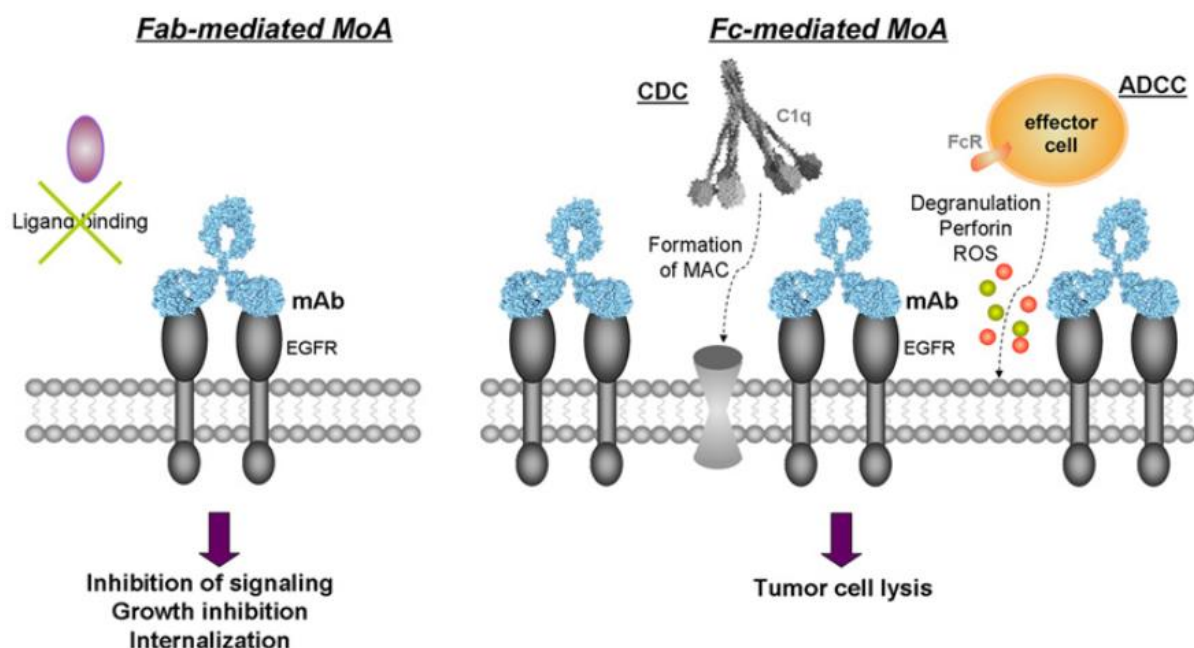


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Effektormechanismen von EGFR-Antikörpern aus Derer et al., 2013. Die direkten Wirkmechanismen werden durch die Bindung des Antikörpers an sein Antigen vermittelt, während die indirekten Wirkmechanismen durch Aktivierung von Effektorzellen oder der Komplementkaskade vermittelt werden. Zu den Fab-vermittelten Effekten (links) gehören die Inhibition der Liganden-Bindung und damit die Hemmung der Proliferation, die Induktion von Apoptose und Internalisierung und die Störung der Dimerisierung der Rezeptoren. Die Fc-vermittelten Effekte (rechts) werden durch die Bindung des Fc-Teils an C1q und damit der Initiierung der Komplementkaskade oder die Aktivierung der Effektorzelle durch Bindung an den Fc-Rezeptor vermittelt. Die Effektorzelle löst daraufhin die antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität aus.

1.3.1 Fab-vermittelte Wirkmechanismen

Die Fab-vermittelten Wirkmechanismen werden durch die Antigenbindung induziert. Sie führt zur Blockade der für die Ligandenbindung wichtigen Stellen und einer Stabilisierung des Rezeptors in seiner inaktiven Form. Außerdem wird eine vermehrte Internalisierung des Rezeptors beschrieben, die so zu einer sinkenden EGFR-Expression führt (Peipp et al., 2008). Auf diese Weise wird die Rezeptoraktivierung unterbunden und die nachfolgende Signaltransduktion gestört. Damit greift der Antikörper in wichtige Zellfunktionen ein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch Antigenbindung ein Zellzyklusarrest ausgelöst werden kann, der teilweise auch zu Apoptose führt. Zudem konnte eine Inhibition der Produktion von angiogenen Faktoren wie VEGF und IL-8 beobachtet werden sowie eine Hemmung der Expression von Matrix-Metalloproteinasen, die Voraussetzung für Adhäsion, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen sind (Peipp et al., 2008).

1.3.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen

Die Fc-vermittelten Wirkmechanismen werden durch den Fc-Teil des Antikörpers und seine Interaktion mit Serumproteinen oder Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems vermittelt. Es handelt sich folglich um indirekte Effekte. Dazu gehören Antikörperabhängige Zell-vermittelte - und Komplement-vermittelte Zytotoxizität (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC; complement-dependent cytotoxicity, CDC) sowie Phagozytose.

1.3.2.1 Antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität

Die Antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität ist von einer Rezeptoraktivierung auf Seiten der Effektorzelle abhängig. IgG-Antikörper interagieren mit Fc-Rezeptoren (FcR) vom γ -Subtyp, die wiederum in unterschiedliche Klassen unterschieden werden können. Die Fc γ -Rezeptoren finden sich auf verschiedenen humanen Zelllinien, über die Tabelle 1 einen Überblick gibt. Neben den Rezeptortypen kann das Bindevverhalten des Rezeptors in hoch-affin und niedrig-affin differenziert werden (Rajasekaran et al., 2015). Die Zahl der Fc-Rezeptoren erhöht sich zusätzlich durch eine Anzahl von Polymorphismen im Bereich der extrazellulären Domäne des jeweiligen Rezeptors. Aufgrund von Genduplikationen besteht für Fc γ RIIIb die Möglichkeit eines parallelen Vorliegens mehrerer Polymorphismen in einem Individuum. IgG1 können von allen Fc γ R gebunden werden. Je nach Effektorzelltyp unterscheiden sich die durch Rezeptoraktivierung hervorgerufenen Effekte. So werden Phagozytose induziert, Apoptose vermittelt, Zytokine und Chemokine ausgeschüttet oder Zielzellen lysiert (Bruhns et al., 2009), (Wang, W. et al., 2015).

Tabelle 1. Übersicht über die Fc γ -Rezeptoren nach Bruhns et al., 2009

| FcγR | Isoform | Polymorphismus | Affinität | Vorkommen (Auswahl) |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|------------------|---|
| Fc γ RI (CD 64) | Fc γ RIa | | hoch | Monozyten, Makrophagen, Granulozyten |
| Fc γ RII (CD32) | Fc γ IIa | H ₁₃₁ | niedrig | Monozyten, Makrophagen, Granulozyten |
| | | R ₁₃₁ | | |
| | Fc γ IIb | | niedrig | Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten |
| Fc γ RIII (CD16) | Fc γ IIIa | V ₁₅₈ | niedrig | Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, B-Lymphozyten, NK-Zellen |
| | | F ₁₅₈ | | |
| | Fc γ IIIb | NA1 NA2 | niedrig | Neutrophile |

Die Effektivität einer EGFR-gerichteten Antikörpertherapie hängt nicht zuletzt auch von den oben beschriebenen Polymorphismen ab (Krawczyk et al., 2014).

Da die Präparation der einzelnen Zelltypen aus humanem Blut komplex ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich zwischen mononukleären Zellen (engl. mononuclear cell, MNC) und polymorphnukleären Zellen (engl. polymorphnuclear cell, PMN) unterschieden. Aufgrund der Entnahme peripheren Blutes und der im Blut auftretenden zahlenmäßigen Unterschiede fallen unter MNC vor allem Monozyten und NK-Zellen, während zu den PMN vor allem Neutrophile Granulozyten (Neutrophile) gerechnet werden.

1.3.2.2 Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen, die von der Leber synthetisiert werden und in inaktiver Form frei im Blut oder auch gebunden auf Zelloberflächen vorliegen. Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr und kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. Unterschieden werden klassischer, alternativer und Lectin-abhängiger Weg. Einen Überblick gibt Abbildung 2. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass es weitere Wege der Komplementaktivierung gibt wie z.B. über die Serumprotease Thrombin oder Plasmin (Ricklin et al., 2010).

Schlüssel der Komplementkaskade und „limitierender Schritt ist immer die Umwandlung von C3 in C3b und C3a, die sogenannte C3-Konvertierung“ (Löffler et al., 2014). Diese führt zur Umwandlung von C5 in C5a und C5b und zur Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (engl. membrane attack complex, MAC) durch Zusammenlagerung von C5b, C6, C7, C8 und mehreren C9-Molekülen. Der MAC ermöglicht, vermittelt durch den hydrophoben Teil von C9, die Bildung einer Pore in der Plasmamembran, die durch Ionen- und Wassereinstrom in die Zelle zu deren Lyse führt (Löffler et al., 2014). Diese durch Komplement ausgelöste Zytotoxizität bezeichnet man als Komplement-vermittelte Zytotoxizität. C3b wirkt zusätzlich opsonierend und spielt damit eine Schlüsselrolle in der Aktivierung weiterer Teile des Immunsystems.

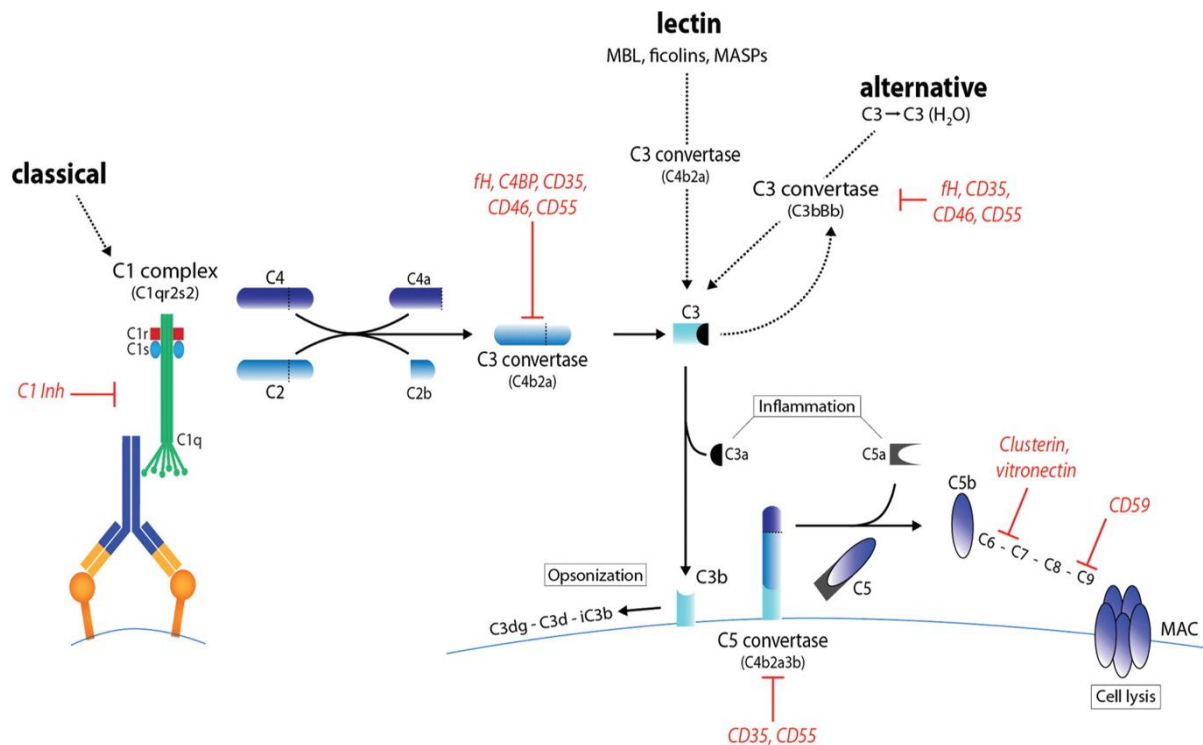


Abbildung 2. Schema der Komplementkaskade mit klassischem und alternativem Weg sowie Lektin-Weg. Aus (Meyer et al., 2014)

Antikörper aktivieren das Komplementsystem typischerweise über den klassischen Weg, der deshalb auch Antikörper-abhängig genannt wird. Dazu sind Antikörper vom IgG- und vom IgM-Isotyp in der Lage. Die Aktivierung durch IgM ist höchsteffektiv. Im Vergleich zu IgG wird eine Effektivitätssteigerung *in vitro* um den Faktor 1000 beschrieben (Nimmerjahn, 2013). Dabei aktivieren ein IgM-Molekül bzw. mindestens zwei IgG-Moleküle den C1q-Komplex (Borsos et al., 1965), bestehend aus C1q und den Serinproteasen C1s und C1r. Die Bindung von C1q an die Fc-Teile der Antikörper erfolgt dabei im Bereich der CH₂-Domäne (Duncan et al., 1988). Die Bindung von C1q führt zur autokatalytischen Aktivierung von C1s und C1r, die wiederum C4 und C2 in C4a und C4b bzw. C2a und C2b spalten. C2a und C4b lagern sich auf der Oberfläche der Zielzelle ab und bilden so die C3-Konvertase des klassischen Weges, womit der Schlüssel der Kaskade gebildet ist und die Bildung des MAC beginnt.

Solide Tumoren gelten als weitgehend Komplement-resistent (Dechant et al., 2008), da sie sogenannte Komplement-inhibitorische Proteine stark überexprimieren (Yan et al., 2008). Dies sind Proteine, die löslich oder gebunden das Komplementsystem regulieren und so eine Überaktivierung verhindern. Zu den membranständigen komplementregulatorischen

Proteinen (engl. membrane-bound complement regulatory proteins, mCRPs) zählen CD35 (Komplement-Rezeptor Typ-1), CD46 (Membran Kofaktor Protein), CD55 (eng. decay accelerating factor, DAF), CD59 (Protektin) (Fishelson et al., 2003) und CRIg (eng. complement receptor of the immunoglobulin superfamily). Daneben wurden verschiedene lösliche Regulatoren beschrieben, die im Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorkommen. Dazu gehören Faktor H, FHL1 (eng. factor H like protein 1), Carboxypeptidase N, C1q, C1-Inhibitor, C4-bindendes Protein (C4BP), Clusterin, Vitronctin, CFHR1 (eng. complement factor H related protein 1) Diese Regulatoren wirken in unterschiedlicher Weise auf das Komplementsystem. So induziert der C1-Inhibitor die Dissoziation der C1-Komponenten, während beispielsweise CFHR1 die C5 Konvertase inhibiert, C4BP den Abbau der C3 Konvertase beschleunigt und CD59 die Zusammenlagerung des MAK stört (Zipfel et al., 2009).

1.4 Strategien zur Optimierung Antikörper-basierter Tumorthérapien

Klinisch zugelassen sind von den monoklonalen EGFR-gerichteten Antikörpern heute (Stand Dezember 2016) in Europa Cetuximab (seit 2004) und Panitumumab (seit 2006). Cetuximab wurde zur Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome und Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion zugelassen (Weiner et al., 2012). Panitumumab wurde ebenfalls zur Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome zugelassen (Weiner et al., 2012). Seit 2015 ist zusätzlich in den USA Necitumumab zur Therapie von metastasierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Untergruppe der NSCLC, non-small-cell lung carcinoma) zugelassen (Thatcher et al., 2015). Bei den drei Antikörpern handelt es sich um IgG-Antikörper, wobei Cetuximab ein chimärer IgG1, Panitumumab ein humaner IgG2 und Necitumumab ein humaner IgG1-Antikörper ist. IgG-Antikörper zeichnen unter anderem die Fähigkeiten aus ADCC und CDC vermitteln oder die Plazentaschranke überwinden zu können. Trotz dieser Gemeinsamkeiten zeigen die einzelnen IgG-Subtypen charakteristische Unterschiede. So nimmt die Fähigkeit C1q zu binden von IgG3, über IgG1 zu IgG2 ab. IgG4 kann kein C1q binden. Außerdem ist das Potential mit Fc-Rezeptoren zu interagieren, ebenfalls für IgG1 und IgG3 besonders stark, während es für IgG4 gering kaum vorhanden ist (Vidarsson et al., 2014). Schneider-Merck et al. konnten für Panitumumab (IgG2) eine IgG1 ähnliche Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten zeigen, die über FcγIIIa vermittelt wurde. Eine NK-Zell-Rekrutierung erfolgte durch Panitumumab nicht (Schneider-Merck et

al., 2010). Damit ergeben sich für IgG2 und für IgG1 sowohl Fab-vermittelte Effekte als auch die durch Interaktion mit dem Immunsystem hervorgerufenen indirekten Effekte wie ADCC und CDC. Hinzu kommen pharmakokinetische Aspekte wie die mit 21 Tagen relativ lange Halbwertszeit von IgG1 (Natsume et al., 2009).

Trotz der zahlreichen hoffnungsvollen Ansätzen bleibt der große Bedarf und die Notwendigkeit an effektiven und nebenwirkungsarmen Therapeutika für die Onkologie bestehen, sodass wir auch heute noch nach neuen Wegen und Verbesserungsmöglichkeiten für bestehende Therapeutika suchen. Das betrifft auch die monoklonalen Antikörper, die trotz ihrer klinischen Erfolge zahlreiche Schwierigkeiten in der klinischen Anwendung offenbart haben.

Am Beispiel der EGFR-gerichteten Antikörper sollen die Herausforderungen und Optimierungsansätze aufgezeigt werden. Analog zu den Wirkmechanismen der Antikörper sind das:

- a. Immunreaktionen. Dies betrifft besonders nicht-humane Antikörper, die somit als körperfremd erkannt werden und so selbst Ziel einer Immunantwort werden können und dadurch das Nebenwirkungsprofil des Antikörpers beeinflussen.
- b. Pharmakokinetik. Antikörper können kurzen Halbwertszeiten unterliegen.
- c. Abhängigkeit des Antikörpers von einer hohen Antigendichte.
- d. Internalisierung der Antikörper-Rezeptor-Komplexe und damit fehlende Präsentation für Fc-vermittelte Wirkmechanismen.
- e. Mutationen in den nachgeschalteten Signalkaskaden mit rezeptor-unabhängiger Aktivierung und damit fehlender Relevanz von Fab-vermittelten Wirkmechanismen.
- f. Überexpression komplementregulatorischer Proteine auf der Oberfläche der Tumorzelle und damit reduzierte Komplement-vermittelte Zytotoxizität.
- g. Makroskopischer Aufbau solider Tumoren mit der Schwierigkeit der Erreichbarkeit der einzelnen Tumorzelle.
- h. genetische Selektionsprozesse mit der Entwicklung von Resistenzen.

Die hier aufgeführten Herausforderungen beziehen sich zu großen Teilen auf die Fab-vermittelten Effekte und die pharmakologischen Eigenschaften des Antikörpers, was eine

Optimierung besonders der Fc-vermittelten Wirkmechanismen nahe legt, das sogenannte Fc-Engineering.

Die Erfolge von Cetuximab, der schon seit über 10 Jahren klinische Anwendung findet, werden zu großen Teilen seiner Fähigkeit ADCC zu vermitteln zugeschrieben (Kimura et al., 2007). Aus Vorarbeiten ist das Versagen von IgG1-Antikörper in Bezug auf die Komplementaktivierung bei soliden Tumoren bekannt (Dechant et al., 2008). Dem in der Hämatookologie eingesetzten CD20-Antikörper Rituximab konnten in Vorarbeiten jedoch Effekte zugeschrieben werden, die auf einer Komplementaktivierung beruhen (Glennie et al., 2007). Zusätzlich konnten Hakulinen und Meri zeigen, dass Komplement in der Lage ist, solide Microtumoren zu infiltrieren (Hakulinen et al., 1998) und zu lysieren.

Diese Beobachtungen und das besondere Potential des Komplementsystems begründen die Bestrebungen, die Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper zu optimieren. Dabei werden unter anderem folgende Ansätze verfolgt: Herunterregulierung der komplementregulatorischen Proteine auf der Tumorzelle, Isotyp-Wechsel, Modifikation der C1q-Bindung und Optimierung der Initiation der Kaskade.

Die Hemmung der Komplementaktivierung durch CRP kann geschwächt werden, indem Antikörper eingesetzt werden, die besagte Proteine in ihrer Funktion blockieren (Gelderman et al., 2002), (Harris, C. L. et al., 1997), (Macor et al., 2007). Ihr Potential kann jedoch noch nicht abschließend beurteilt werden, da die in den Studien eingesetzten Antikörper aufgrund ihres Isotyps selbst in der Lage sind, Komplement zu aktivieren. Alternativ ist auch eine Senkung der CRP-Expression durch den gezielten Einsatz von spezifischen siRNA (engl. silencer RNA) denkbar. Hier konnten beispielsweise Mamidi et al. in-vitro signifikant gesteigerte CDC durch die Herunterregulierung von CD46, CD55 und CD59 erreichen (Mamidi et al., 2013).

Durch einen Isotyp-Wechsel von IgG1 zu IgG3 kann ebenfalls die CDC optimiert werden, was einerseits an einer erhöhten Affinität des IgG3 zum C1q-Molekül und andererseits an seiner erhöhten Flexibilität liegt, die eine Unabhängigkeit vom EGFR-Expressionslevel bedingt (Rösner et al., 2014).

Daneben bestehen verschiedene Strategien, die eine verstärkte Initiation der Komplementkaskade zum Ziel haben. Dies kann durch Steigerung der Bindungsaffinität des Antikörpers zum Startmolekül C1q erreicht werden. Natsume et al. konnten durch Herstellung

einer IgG1/IgG3 Chimäre positive Effekte in Bezug auf die CDC beobachten (Natsume et al., 2008). Dabei tauschten sie sowohl die CH2- als auch die CH3-Domäne eines IgG1 gegen die eines IgG3 aus. Moore et al. konnten zudem zeigen, dass Mutationen im Bereich der C1q-Bindestelle innerhalb der CH2-Domäne zu einer Verstärkung der CDC führen (Moore et al., 2010). Idusogie et al. erreichten ebenfalls durch Mutationen im Bereich der C1q-Bindestelle eine Verstärkung der CDC-Aktivität für IgG1- und IgG2-Antikörper (Idusogie et al., 2001).

Weiterhin wurde 2014 erstmals die Fähigkeit humaner IgG1 beschrieben, Hexamere zu bilden (Diebolder et al., 2014). Damit besteht Ähnlichkeit zum IgM-Pentamer, das hochpotent in seiner Fähigkeit ist Komplement zu aktivieren. Diese Erkenntnis beruht auf früheren Kristallisationsexperimenten mit b12-IgG1. Eine Verstärkung der Fc:Fc-Interaktion konnte als Schlüssel ihrer Hexamerisierung ausgemacht werden.

Diebolder et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass IgG1-Antikörper per se in der Lage sind, Hexamere zu bilden. Diese Fähigkeit lässt sich durch das Einfügen von Mutationen im Fc-Teil in einem Maße verstärken, das zu einer Multimer-Bildung in Lösung führt (Diebolder et al., 2014). Wang et al. konnten diese Erkenntnisse weiter entwickeln und Antikörper-Varianten vorstellen, die sowohl bevorzugt multimerisieren als auch unter Anwesenheit von C1q verstärkt Hexamere bilden (Wang, G. et al., 2016). De Jong et al. konnten zeigen, dass Varianten, die in Lösung Multimere ausbilden, auch verstärkt Komplement in Lösung, wie zum Beispiel Blut, aktivieren. Diese Aktivierung von Komplement in Lösung birgt sowohl ein hohes Nebenwirkungspotential als auch pharmakokinetische Nachteile durch beispielsweise eine reduzierte Plasmahalbwertszeit. Deshalb erfolgte eine weitere Auslese, die schlussendlich unter anderem die Variante E345K hervorbrachte (de Jong et al., 2016), die in dieser Arbeit charakterisiert wurde. Die Position der Mutation ist in Abbildung 3 A dargestellt. Nach Antigenbindung kommt es durch die verstärkte Fc:Fc-Interaktion zu einer Zusammenlagerung der Fc-Teile auf der Zelloberfläche. Dadurch entsteht ein hexameres Multimer, das schematisch in Abbildung 3 B dargestellt ist.

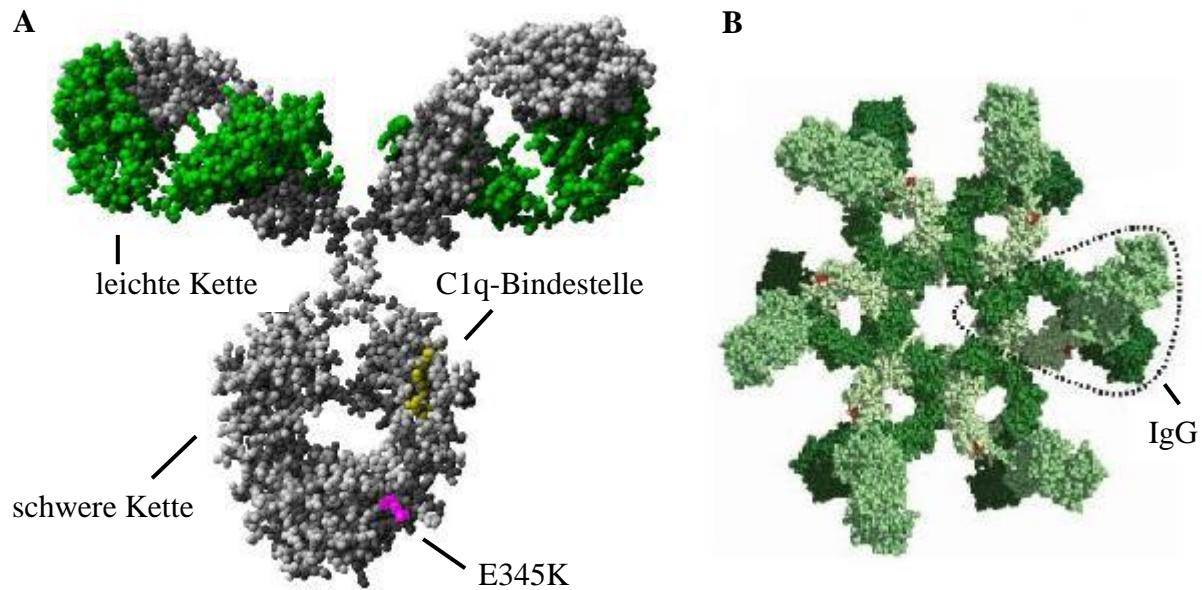


Abbildung 3. Schematische Darstellung des 2F8-E345K und eines Hexamers. A. IgG1 mit markierter E345K-Position (magenta) und C1q-Bindestelle (gelb). Die leichte Kette ist in grün, die schwere Kette in grau dargestellt. B. Hexamerstruktur, ein einzelner IgG1 ist durch eine gestrichelte Linie umrandet. In rot wurde die C1q-Bindestelle hervorgehoben. Aus (Diebolder et al., 2014).

1.5 Zielsetzung

Für die vorliegende Dissertation wurde eine Mutation in der Fc-Region von EGFR-gerichteten IgG1-Antikörpern inseriert (E345K), um die Interaktion von Fc-Teilen zu verstärken und so eine Hexamerisierung zu ermöglichen bzw. zu potenzieren. Dieser Antikörper (2F8-E345K) mit verstärkter Kapazität zur Hexamerisierung sollte funktionell charakterisiert werden. Ziel dieser Arbeit war die Steigerung des zytotoxischen Potentials EGFR-gerichteter Antikörper.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller, Ort, Land |
|---|---|
| 0,05 % Trypsin-EDTA (1x) | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Natrium Chromat (^{51}Cr), (Na_2CrO_4); 185 MBq/ml | Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D |
| Aqua dest. | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Accutase | GE Healthcare, Solingen, D |
| Albumin Fraktion V, proteasefrei (aus Rinderplasma) | Carl ROTH, Karlsruhe, D |
| C1q Protein | Complement Technologies, Tyler, TX, USA |
| C1q-depletiertes Serum | Complement Technologies, Tyler, TX, USA |
| CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay | Promega, Mannheim, D |
| DeLano-Peptid (DCAWHLGELVWCT, Kontroll-Peptid (GWTVFQKRLDGSV) | Pepscan, Lelystad, NL |
| Dimethylsulfoxide USP Grade | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x/10x) | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Easycoll Separating Solution | Biochrom AG, Berlin, D |
| Eculizumab | Alexion, Cheshire, CA, USA |
| Ethanol vergällt, ca 99% | BÜFA Chemikalien, Hude, D |
| Fetal calf serum (FCS) | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Genitricin 50 mg/ml | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Hank's Balanced Salt Solution (1x) | PAA Laboratories, Pasching, D |
| Hygromycin B 50 mg/ml | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Lepirudin (Refludan®) | Celgene, München, D |
| MEM Non-essential amino acids (NEAA) 100x | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Methanol | Merck, Darmstadt, D |
| Methotrexate hydrate powder (MTX) | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt, D |
| Optiphase Supermix | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA |
| Paraformaldehyde ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, 30.03 g/mol) | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) | gibco life technologies, Paisley, UK |
| Polysorbat 20 | Merck, Darmstadt, D |
| recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rh GM-CSF) | Cellgro, CellGenix GmbH/ Metreon Bioproducts, Freiburg, D |
| RPMI-1640 Medium | gibco life technologies, Paisley, UK |

| Bezeichnung | Hersteller, Ort, Land |
|--|-----------------------------------|
| Salzsäure 25% | Carl ROTH, Karlsruhe, D |
| Sigmafast OPD (OPD peroxidase substrate) | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Sodium pyruvate 100 mM | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| TritonX 100 | Merck, Darmstadt, D |
| Trypan Blue Solution 100ml (0,4%) | Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA |

Tabelle 3. Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller, Ort, Land |
|--|--|
| 96well Platte (flacher Boden/ runder Boden) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| 96well Platte (v-förmiger Boden) | Anicrin, Scorze, I |
| BD Falcon Cell Strainer (70 µl Nylon) | BD Biosciences, Bedford, MA, USA |
| Citrat-Röhrchen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Combitips advanced 2,5 ml (steril/ unsteril) | Eppendorf, Hamburg, D |
| FACS-Röhrchen (5ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Falcons (15 ml/ 50 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Immuno Module (ELISA-Streifen) | Nunc, Roskilde, DK |
| Micro-Schraubröhrchen (2 ml/ 1,5 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Parafilm Verschlussfolie | Th. Geyer, Renningen, D |
| Reagent Reservoir (50 ml) | VWR International, West Chester, PA, USA |
| Safe Seal micro tube (2 ml/ 1,5 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Safety-Multifly-Set | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Serologische Pipetten (2/ 10/ 25/ 50 ml, steril) | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Serum-Röhrchen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Zellkulturflaschen (160 und 400 ml) | Greiner, Frickenhausen, D |

Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten technischen Geräte

| Bezeichnung | Hersteller, Ort, Land |
|--|---|
| 1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter ; Wallac | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA |
| Brutschrank (Hera Safe 240) | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA |
| Durchflusszytometer (Epics XL-MCL bzw. Navios 3L 10C) | Beckmann Coulter, Krefeld, D |
| ELISA Plate Reader (Sunrise) | TECAN, Männedorf, CH |
| Lichtmikroskop (Axiovert 40C/ Axiostarplus) | Zeiss, Oberkochen, D |
| Magnetrührer (Hi-Mix S) | Heidolph Instruments, Schwabach, D |
| Plattenschüttler (Titramax101) | Heidolph Instruments, Schwabach, D |
| Reinluftbank (Hera safe) | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Waage (XB 2200C) | Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach, D |
| Zentrifuge (Galaxy Mino) | VWR, Darmstadt, D |
| Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3S+, Megafuge 1.0R) | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |

Tabelle 5. Übersicht über die verwendete Software

| Bezeichnung | Hersteller, Ort, Land |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1450 MicroBeta Workstation Software | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA |
| Excel 2010 | Microsoft, Redmond, WA, USA |
| Yasara 12.7.16 | Yasara Bioscience, Wien, Österreich |
| Kaluza 1.1 | Beckmann Coulter, Krefeld, D |
| Prism 4.0 bzw. 5.0 | Graphpad Software, La Jolla, CA, USA |

2.2 Zelllinien und ihre Kultivierung

Es wurden A431 und DiFi sowie verschiedene BHK-EGFR⁺-Zelllinien verwendet. Die BHK-EGFR⁺ wurden hergestellt, indem BHK-21 stabil mit einem Plasmid für den humanen EGFR (pUSE-EGFR) transfiziert wurden. Dabei sind Zelllinien entstanden, die in unterschiedlichem Maße EGFR exprimieren (Derer et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Zelllinien mit aufsteigenden Expressionsleveln verwendet (sehr niedriges/ niedriges/ mittleres/ hohes Expressionslevel). Dabei wurde die EGFR-Expression der einzelnen Linien auf $0,4 \times 10^6$ / Zelle für das sehr niedrige Level, ca. $0,7 \times 10^6$ / Zelle für das niedrige Level, ca. $1,0 \times 10^6$ / Zelle für das mittlere Level und ca. $1,4 \times 10^6$ / Zelle für das hohe Level berechnet.

Ob Mutationen im sogenannten Downstream-Signalweg des EGFR eine Resistenz der Tumorzelle gegenüber den untersuchten Antikörpern bedingen, wurde am Beispiel der A431 KRAS^{G12V} untersucht. Dazu wurden A431 mit einem Plasmid für KRAS^{G12V} (pSec KRAS4b^{G12V}) stabil transfiziert (Schlaeth et al., 2010). Die von der DSMZ bezogene A431 tragen keine KRAS-Mutation. Die mit der Transfektion herbeigeführte Mutation der GTPase KRAS4b führt zur rezeptorunabhängigen Aktivierung des Downstream-Signalwegs.

Für die Aktivierung von Effektorzellen ist die Bindung an die jeweiligen Fcγ-Rezeptoren entscheidend. Um das Bindeverhalten der untersuchten Antikörper zu analysieren, wurde BHK-21 und CHO-K1 stabil für die humanen Fcγ-Rezeptoren IIIa (=CD16a) und IIIb (=CD16b) transfiziert. Es entstanden FcγRIIIa-exprimierende BHK-21 vom niedrig-affinen Bindungstyp (158 FF) und vom hoch-affinen Bindungstyp (158 VV) sowie FcγRIIIb-exprimierende CHO-K1 vom NA1- und vom NA2-Typ.

Tabelle 6. Humane Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Bezugsquelle | Kulturbedingungen |
|-----------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| A431 | Plattenepithelkarzinom der Vulva | DSMZ, Braunschweig, D | RPMI-1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep |

| | | | |
|---------------------------|---|-------------------------|---|
| A431 KRAS ^{G12V} | Plattenepithelkarzinom der Vulva, KRAS ^{G12V} -mutiert | (Schlaeth et al., 2010) | RPMI-1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 0,7 mg/ml Hygromycin B |
| DiFi | Kolorektales Adenokarzinom | (Olive et al., 1993) | DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep |

Tabelle 7. Hamster Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Bezugsquelle | Kulturbedingungen |
|-----------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| BHK-21 | Fibroblasten-Zellreihe der Niere | DSMZ, Braunschweig, D | RPMI-1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep |
| CHO-K1 | Ovarialkarzinom | Lonza Group Ltd., CH | DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep |

Tabelle 8. Transfizierte Zelllinien

| Ursprungszelllinie | Transfizierte Zelllinie | Kulturbedingungen |
|--------------------|---------------------------|--|
| BHK-21 | BHK-EGFR ⁺ | RPMI-1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1 mg/ml Geneticin |
| BHK-21 | BHK-CD16a 158FF und 158VV | RPMI-1640 + 1% MEM NEAA + 0,1% Sodumpyruvat + 5mM MTX + 1mg/ml Geneticin |
| CHO-K1 | CHO-CD16b NA1 und NA2 | RPMI-1640 + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 0,5 mg/ml Geneticin |

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten mit sterilen Einmalplastikprodukten in sterilen Reinluftbänken. Die verwendeten Zelllinien sind adhärent wachsende Zellen, die in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert wurden.

Die für Experimente benötigten Zellen wurden gewonnen, indem die mit 0,05% EDTA-Trypsin bzw. Accutase vom Boden der Kulturflasche abgelöst, dann mit Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 688 × g abzentrifugiert wurden, um tote Zellen von vitalen zu trennen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zellkammer verwendet. Die Zellvitalität wurde mit Trypanblau geprüft.

2.4 Antikörper

Der Fokus der Arbeit lag auf der Untersuchung der 2F8-IgG1-Variante E345K im Vergleich zu 2F8-IgG1 und zu zwei weiteren CDC-optimierten Antikörpern. Natsume et al. konnten durch Herstellung einer IgG1/IgG3 Chimären positive Effekte in Bezug auf die CDC beobachten (Natsume et al., 2008). Dabei tauschten sie sowohl die CH2- als auch die CH3-Domäne eines IgG1 gegen die eines IgG3 aus. Eine derartiges IgG1/IgG3 Chimäre wurde für

2F8 hergestellt und dann mit 2F8-IgG1-E345K verglichen. Moore et al. konnten außerdem zeigen, dass Mutationen im Bereich der C1q-Bindestelle innerhalb der CH2-Domäne zu einer Verstärkung der CDC führen (Moore et al., 2010). Die von Moore et al. beschriebene Mutation wurde für 2F8 hergestellt und ebenfalls als Vergleich für 2F8-IgG1-E345K herangezogen. 2F8 ist auch als Zalutumumab bekannt. Darüber hinaus wurden die Effekte der E345K-Mutation auf die Antikörper 003 (Dechant et al., 2008), C225 und H425, alle ebenfalls im IgG1-Hintergrund, untersucht. Bei C225 handelt es sich um Cetuximab und bei H425 um Matuzumab.

Tabelle 9. Antikörper

| Bezeichnung | Abkürzung | Hersteller / Referenz |
|---------------------------------------|--------------|---|
| 003 | | Genmab, Utrecht, NL |
| 003-E345K | | Genmab, Utrecht, NL |
| 2F8 Wildtyp | 2F8 | Genmab, Utrecht, NL |
| 2F8-113F | 113F | (Natsume et al., 2008) |
| 2F8-DFTE | DFTE | (Moore et al., 2010) |
| 2F8-E345K | E345K | Genmab, Utrecht, NL |
| b12-DFTE | Kontr.-DFTE | Genmab, Utrecht, NL |
| b12-E345K | Kontr.-E345K | Genmab, Utrecht, NL |
| 225 | | Merck Serono, Darmstadt, D |
| 225-E345K | | Genmab, Utrecht, NL |
| eculizumab | | Alexion, Cheshire, USA |
| goat anti-human kappa chain/FITC | | AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, USA |
| H425 | | Genmab, Utrecht, NL |
| H425-E345K | | Genmab, Utrecht, NL |
| monoclonal mouse anti-human C3b | | QUIDEL, San Diego, CA, USA |
| monoclonal mouse anti-human C5b9 | | QUIDEL, San Diego, CA, USA |
| monoclonal murine anti-human C1q | | QUIDEL, San Diego, CA, USA |
| ofatumumab | Kontr. | Genmab, Utrecht, NL |
| polyclonal goat anti-mouse IgG/FITC | | Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA |
| polyclonal goat anti-mouse/HRP | | DAKO, Glostrup, DK |
| polyclonal rabbit anti-human C1q/FITC | | DAKO, Glostrup, DK |
| polyclonal rabbit anti-human C4c/FITC | | DAKO, Glostrup, DK |
| polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP | | DAKO, Glostrup, DK |
| Rituximab | | Roche, Basel, CH |
| α -kappa-Endotoxin A | | (Kellner et al., 2011) |

3 Methoden

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis durchgeführt, um eine frühe Internalisierung des EGFR zu verhindern. Die Durchführung erfolgte jeweils mindestens in Triplikaten. Wurden humane Blutprodukte benutzt, stammten sie von mindestens drei verschiedenen freiwilligen gesunden Spendern. Die Experimente wurden durch die Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität genehmigt.

3.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der direkten oder indirekten Markierung von Zellen oder Zelloberflächenmolekülen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Im Durchflusszytometer wird die Probe durch eine Kapillare geleitet, was zur Vereinzelung der Zellen führt. So können einzelne Zellen mit Laser angeregt werden. Photodetektoren registrieren die Streuung des Lichts als Maß für Zellgröße und –granularität und die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs (Murphy et al., 2009). Die im Rahmen der Experimente benutzen Antikörper waren FITC konjugiert, also an Fluorescein Isothiocyanat-gekoppelt.

Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens des Primärantikörpers an die Zielzelle wurden 100.000 Zellen pro well in eine 96-well-Platte (v-förmiger Boden) pipettiert und abzentrifugiert ($688 \times g$). Das Zellpellet wurde danach in 50 μl des jeweiligen Primärantikörpers in aufsteigenden Konzentrationen von 0,016 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ resuspendiert und 30 min inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 100 μl kaltem Puffer und anschließender Zentrifugation bei 4°C entfernt. Der Puffer enthielt 1 \times DPBS mit 5% Natriumazid und 5% Albumin Fraktion V. Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in goat anti-human kappa chain/FITC (1:500) aufgenommen und 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen dann je in 500 μl 1% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Die Affinität zu den unterschiedlichen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) wurde durch Inkubation der Fc γ R-transfizierten BHK-21- und CHO-K1-Zellen für 30 min mit den Antikörpern in aufsteigender Konzentration untersucht. Da die transfizierten Zellen kein EGFR besitzen, sind sie ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der Antikörper an die

Fc γ -Rezeptoren. Für die Bindung waren hohe Antikörperkonzentrationen nötig. Eine Sättigung wurde bei 80 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Nach der Inkubation erfolgte dreimaliges Waschen und eine weitere Inkubation mit goat anti-human kappa chain/FITC (1:500). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen dann je in 500 μl 1% PFA fixiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Die Fähigkeit des jeweiligen Primärantikörpers, Komplement zu aktivieren und an der Oberfläche der Zielzelle zu halten, wurde durch Nachweis der einzelnen Bestandteile der Komplementkaskade untersucht. Da es während des Experiments zu Zelluntergang durch Bildung des MAC kommt, resultieren daraus Messschwierigkeiten bei zu geringer Anfangszellzahl. Daher wurden hier statt 100.000 Zellen pro well 200.000 Zellen pro well eingesetzt. Die Inkubation mit den zu untersuchenden Antikörpern erfolgte in sättigender Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) für 15 min. Anschließend wurde 25% humanes Serum pro well pipettiert und die Platte bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank 10 min inkubiert. Überschüssiges Serum und nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend erfolgte der Nachweis von C1q und C4b/c durch Inkubation mit dem jeweiligen FITC-markierten Antikörper (1:10). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde. Nach den Inkubationsschritten wurde wie bereits beschrieben gewaschen. Das Zellpellet wurde schließlich in 500 μl Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

3.2 EGFR-Internalisierung und Proliferationsinhibition

Zur Untersuchung der direkten Wirkmechanismen wurden Internalisierungsexperimente mit α -kappa-ETA durchgeführt. α -kappa-ETA ist ein Konjugat aus einem humanen Fab-Fragment (kappa-Leichtkette) und dem Pseudomonas-Exotoxin A (Kellner et al., 2011). Kommt es zur Internalisierung des EGFR, wird ETA mit in die Zelle aufgenommen und führt zur Apoptose. Der Grad des Zelluntergangs ist damit ein Maß für die Internalisierung des Zielantigens. Vor der Durchführung des Experiments wurde die α -kappa-ETA Konzentration austitriert, die allein noch nicht zum Zelluntergang führt. Dann wurden aufsteigende Konzentrationen der Primärantikörper von 0,128 ng/ml bis 2 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1 \times DPBS als Kontrolle, 0,4 ng/well α -kappa-ETA und 5000 Zellen pro well in 96 well Platten (flacher Boden) steril pipettiert und 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation Assay.

Um zu bestimmen, inwieweit das Wachstum der jeweiligen Zelllinie EGFR-abhängig ist, wurden die Primärantikörper in aufsteigender Konzentration von 0,016 µg/ml bis 50 µg/ml bzw. 1 × DPBS zur Kontrolle steril in 96 well Platten (flacher Boden) und 5000 Zellen pro well pipettiert und 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay.

3.3 Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay

Die Affinität zu humanem C1q wurde mittels Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA) untersucht. Es wurden die Primärantikörper in einer konstanten Konzentration von 10 µg/ml bzw. 1 × DPBS als Kontrolle am Vortag in ELISA-Streifen pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl ELISA-Waschpuffer (1 × DPBS mit 0,05 % Polysorbat 20) eine einstündige Inkubation mit je 300 µl Reagenzverdünnungslösung (1 × PBS mit 0,05 % Polysorbat 20 und 0,1 % Albumin Fraktion V). Die Qualität der Antikörper-Beschichtung in die Platte wurde mittels polyclonal rabbit anti-human IgG/HRP kontrolliert. Die Verdünnungen erfolgten in Reagenzverdünnungslösung. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler. Auf jeden Inkubationsschritt folgte ein Waschschrift bestehend aus dreimaligem Waschen mit je 200 µl Waschpuffer. Zur Untersuchung der Affinität wurde reines humanes C1q in aufsteigender Konzentration von 0 µg/ml bis 100 µg/ml in die Platte titriert und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde zunächst mit murinem anti-C1q (1:1000) für eine Stunde und dann mit polyclonal goat anti-mouse/HRP (1:1000) für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde nach Herstelleranweisung ELISA-Substrat (Sigmafast OPD) zugegeben und der Versuch nach der Bildung des Farbumschlags durch Zugabe von Salzsäure gestoppt. Das Verfahren entspricht damit der Methodik des indirekten Sandwich-ELISA. Der Farbumschlag entsteht durch Umsetzung des ELISA-Substrats durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase (Murphy et al., 2009). Die Intensität des Farbumschlags ist damit ein indirektes Maß für die Affinität des jeweiligen Antikörpers zu C1q. Die Detektion erfolgte mittels ELISA-Plate-Reader (Sunrise) bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm. Die Datenauswertung erfolgte mit Excel durch Normalisierung auf den Wert der höchsten C1q-Konzentration.

3.4 Experimente mit speziellem Material

3.4.1 DeLano-Peptid

Das DeLano-Peptid ist eine von DeLano et al. im Jahr 2000 beschriebene Aminosäuresequenz (DCAWHLGELVWCT), die durch Bindung in die Gelenk-Region zwischen CH2 und CH3-Domäne von IgG die Fc-Fc-Interaktion hemmt (DeLano et al., 2000). Das DeLano-Peptid bzw. sein Kontroll-Peptid (GWTVFQKRLDGSV) wurde zum CDC-Versuchsaufbau und zu den Depositionsexperimenten zugefügt, um die Fähigkeit der E345K-Variante zur Hexamerisierung zu stören. Dazu wurden die Peptide in 50% DMSO und 50% Aqua dest gelöst und in einer konstanten Konzentration von 10 µg/ml in den CDC-Versuchen bzw. 50 µg/ml in den Durchflusszytometrie-Experimenten eingesetzt.

3.4.2 Eculizumab

Der Antikörper Eculizumab greift in die Komplementkaskade ein, indem es C5 bindet, seine Spaltung verhindert und so den weiteren Ablauf der Kaskade unterbricht. Eculizumab wurde eingesetzt, um Messschwierigkeiten durch erhöhten Zelluntergang bei Experimenten mit langen Inkubationszeiten zu verhindern oder CDC-Aktivität anzuzeigen. Eculizumab wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet.

3.5 Gewinnung von Serum, Vollblut und Effektorzellen

Das Probenmaterial wurde wie anfangs bereits erwähnt von freiwilligen gesunden Spendern durch eine periphere venöse Blutentnahme gewonnen. Die Spender stimmten der Verwendung zu Forschungszwecken zu. Vollblut wurde direkt nach der Entnahme als Citrat-Blut zusätzlich mit Lepirudin antikoaguliert. Dabei wurde ein Verhältnis von 1:5000 (v/v) verwendet. Serum wurde nach Entnahme für 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und dann auf Eis für 20 Minuten gekühlt. Danach erfolgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei $849 \times g$ und 4°C. Das Serum wurde abgenommen, aliquotiert und bei minus 80°C bis zur Verwendung gelagert. PMN und MNC wurden aus Citrat-Blut gewonnen. Dazu wurde mit Easycoll Separating Solution, Hank's Balanced Salt Solution und $1 \times$ DPBS ein Gradient erstellt, der mit Citrat-Blut überschichtet wurde (70% Percoll und 63% Percoll). Nach Zentrifugation ergaben sich zwei Fraktionen: eine MNC-Fraktion und eine Erythrozyten-

PMN-Fraktion (Abbildung 4). Die Fraktionen wurden einzeln abgenommen, die Erythrozyten mit 4°C kaltem A. dest lysiert und die Zellen auf die gewünschte Effektor-Target-Ratio (80:1) eingestellt. Die Aufreinigung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

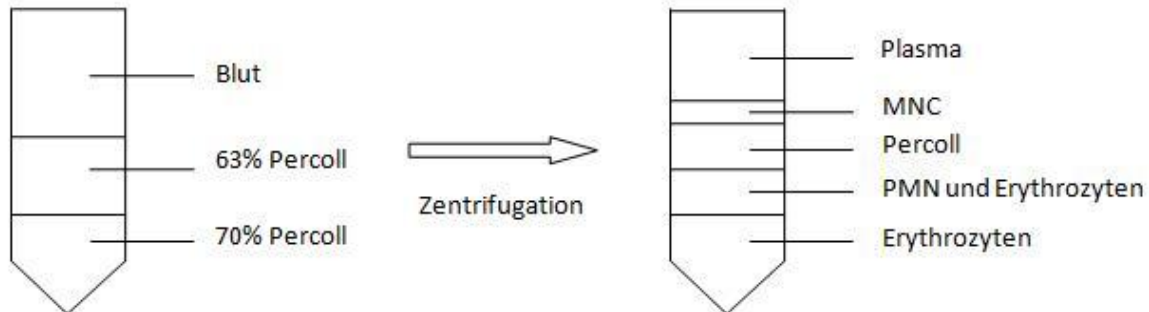


Abbildung 4. Schema des Gradienten vor und nach Zentrifugation mit Kennzeichnung der einzelnen Phasen.

3.6 CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay

Der Assay wurde zur Bestimmung der Zellvitalität im Rahmen der Internalisierungsexperimente und der Experimente zur Proliferationsinhibition eingesetzt. Der Einsatz erfolgte laut der Angaben des Herstellers. Das Prinzip des Assays beruht auf der Umsetzung (Reduktion) des MTS-Substrats¹ zu einem Formazan-Produkt, dessen Absorption von Licht mittels ELISA-Plate-Reader gemessen werden kann. Die Messung erfolgte bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm. Der Kontrollwert wurde als Mittelwert aus der Absorption der unbehandelten Proben berechnet. Die Absorption ist ein Maß für die Zellvitalität. Diese wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Messwert}}{\text{Kontrollwert}} \times 100 = \text{Zellvitalität [\%]}$$

¹Als Substrat dient [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium.

3.7 Zytotoxizitäts-Analyse

Die Fähigkeit der Antikörper CDC oder ADCC zu vermitteln, wurde mittels Zytotoxizitäts-Analyse im Chromfreisetzungssassay untersucht. Dabei wurde die benötigte Zellzahl mit $^{51}\text{Chrom}$ für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit nahmen die Zellen das $^{51}\text{Chrom}$ in ihr Zytoplasma auf. Als Effektoren wurden Serum, Vollblut, PMN und MNC eingesetzt. Die PMN wurden zuvor durch rhGM-CSF stimuliert (1:5000). Um den Einfluss der CDC-Aktivität von der reinen ADCC-Aktivität im Vollblut differenzieren zu können, wurden zusätzliche Versuche in Anwesenheit von Eculizumab durchgeführt. Durch einen Waschschrift nach der Inkubation wurde nicht-inkorporiertes $^{51}\text{Chrom}$ entfernt. Anschließend wurden 5000 Zellen pro well mit 50 μl Serum, 50 μl Vollblut oder mit einer Effektor zu Target-Ratio von 80:1 von MNC oder PMN und aufsteigenden Antikörperkonzentrationen von 0,016 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ für Serum und Vollblut bzw. 0,0032 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ für Effektorzellen für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das vorher aufgenommene $^{51}\text{Chrom}$ von lysierten Zellen ins Medium freigesetzt. Die Berechnung der Lyse erfolgte nach Abzug der spontanen Lyse (Basalrate, BR) im Verhältnis zur Maximalrate (MR), welche durch die Behandlung mit TritonX 100 erzeugt wurde, die eine Zerstörung der Zellmembran zur Folge hat (Formel s.u.). Nach der Inkubation wurden durch Zentrifugation die Überstände gewonnen und mit einem Szintilationscocktail 15 min auf dem Plattenschüttler gemischt. Die Auswertung erfolgte mit dem Szintilationscounter (1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter ; Wallac). Mit folgender Formel wurde aus der gemessenen Radioaktivität das Maß des Zelluntergangs berechnet.

$$\frac{(\text{Messwert} - \text{BR})}{(\text{MR} - \text{BR})} \times 100 = \text{Lyse} [\%]$$

3.8 Auswertung, Darstellung und Statistik

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden zuvor mit der Flow Analysis Software Kaluza ausgewertet. Die Daten der Zytotoxizitäts-Assays wurden mit 1450 MicroBeta Workstation Software erstellt. Die Erstellung der Modellgraphik erfolgte mit Yasara 12.7.16, dabei diente das Modell von Clark als Grundlage (Clark, 1997). Die Berechnung der Statistik sowie die

graphische Darstellung der Daten erfolgten mit Prism 5.0. Dazu wurden Balken-, Säulen und xy-Punktogramme verwendet. Die Höhe der Balken bzw. die Punkte im Punktogramm stellen den jeweiligen Mittelwert dar, die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardfehler (engl. *standard error of mean*, SEM). Die Punkte im Punktogramm wurden durch Berechnung der nicht-linearen Regressionskurve zu einer Dosis-Wirkungskurve konstruiert. Aus der Kurve wurden die Werte der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) bestimmt. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden T-Test und einfaktoriellen oder zweifaktoriellen ANOVA mit Post-hoc Analyse (Bonferroni) herangezogen.

Die Nullhypothese lautete: „Die untersuchten Antikörper unterscheiden sich je Dosisstufe nicht.“ Die Alternativhypothese lautete: „Die untersuchten Antikörper unterscheiden sich je Dosisstufe.“ Das Signifikanzniveau betrug fünf Prozent. War der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde die Nullhypothese verworfen.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Charakterisierung von IgG1-2F8-E345K

Zur Charakterisierung wurden sowohl Fab-vermittelte als auch Fc-vermittelte Effekte untersucht. Als Zelllinien dienten die humanen Zelllinien A431 und DiFi, die relativ ähnliche Level an EGFR exprimieren (Rösner et al., 2014), sowie die verschiedene Level an EGFR exprimierenden BHK-EGFR⁺. Daneben kamen A431 KRAS^{G12V} beispielhaft für im Downstream-Signalweg-mutierte Tumorzellen zum Einsatz. Zur Untersuchung der Antikörperbindung an Effektorzellen wurden folgende transfizierte Zellen eingesetzt: BHK-CD16a 158 FF und BHK-CD16a 158 VV, CHO-CD16b NA1 und CHO-CD16b NA2.

4.1.1 Fab-vermittelte Wirkmechanismen

Zunächst wurde die Bindung der Antikörper an den EGF-Rezeptor (EGFR) auf A431-Zellen überprüft. So sollte untersucht werden, ob die in die Antikörper eingefügten Mutationen das Bindeverhalten beeinflussen. Aus Abbildung 5, B geht hervor, dass diese für die untersuchten Antikörper sehr ähnlich ist. Die Bindung von 2F8-E345K, 2F8-DFTE und 2F8-113F unterscheidet sich statistisch nicht signifikant von der Bindung des 2F8 (Wildtyp), siehe dazu auch Tabelle 10. Die Kontrollantikörper binden den EGFR nicht. Exemplarisch ist in Abbildung 5, A ein Histogramm, das Grundlage der berechneten EGFR-Bindungskurven ist, für 2F8-E345K und 2F8 dargestellt. Da sich das Bindungsverhalten der 2F8-Varianten nicht signifikant von 2F8 unterscheidet, werden die Fab-vermittelten Wirkmechanismen im Weiteren am Beispiel von 2F8-E345K dargestellt.

Tabelle 10. Bindungsaffinitäten der Antikörper zum EGFR. (Friedman Test mit multiplem Vergleich nach Dunn)

| Antikörper | K _D -Werte [$\mu\text{g/ml}$] \pm Standardfehler | p-Wert (Wildtyp vs. Ak) |
|------------|---|-------------------------|
| 2F8 | 0,49 \pm 0,13 | |
| 2F8-E345K | 0,38 \pm 0,13 | n.s. |
| 2F8-113F | 0,41 \pm 0,10 | n.s. |
| 2F8-DFTE | 0,38 \pm 0,09 | n.s. |

Wie in der Einleitung erläutert, gehören zu den Fab-vermittelten Wirkmechanismen von EGFR-gerichteten Antikörpern vor allem die Verdrängung der Liganden vom Rezeptor mit u.a. negativen Effekten für das Zellwachstum und die verstärkte Rezeptorinternalisierung. Inwieweit die Bindung des Antikörpers an EGFR das Wachstum der jeweiligen Zelllinie inhibiert, wurde deshalb in Proliferationsinhibitions-Analysen auf A431- und DiFi-Zellen getestet. Die Proliferationsinhibition zeigt keine Unterschiede zwischen 2F8-E345K und 2F8 (Abbildung 5, C). A431-Zellen weisen eine geringe EGFR-Abhängigkeit in ihrem Wachstum auf, während auf DiFi-Zellen aufsteigende Antikörperkonzentrationen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der vitalen Zellmasse führen.

Auch im Rahmen der Internalisierungsexperimente konnte kein relevanter Unterschied der Internalisierung für die E345K-Mutation gegenüber 2F8 gezeigt werden (Abbildung 5, D). Lediglich bei 0,64 ng/ml ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen 2F8-E345K und 2F8 mit einer verstärkten Internalisierung für 2F8-E345K. Methodisch beruht der Versuchsaufbau auf der Internalisierung von Antikörper-Rezeptor-Komplexen, an die α -kappa-ETA gebunden ist. α -kappa-ETA, ein Konjugat aus einem humanen Fab-Fragment (kappa-Leichtkette) und dem Pseudomonas-Exotoxin A, ist ein von Kellner et al. beschriebenes Instrument, das es ermöglicht, eine Internalisierung indirekt nachzuweisen (Kellner et al., 2011). Das Exotoxin A löst nach Internalisierung eine Apoptose aus. Die Zahl der nicht vitalen Zellen ist folglich ein indirektes Maß für die Internalisierung der Antikörper-Rezeptor-Komplexe.

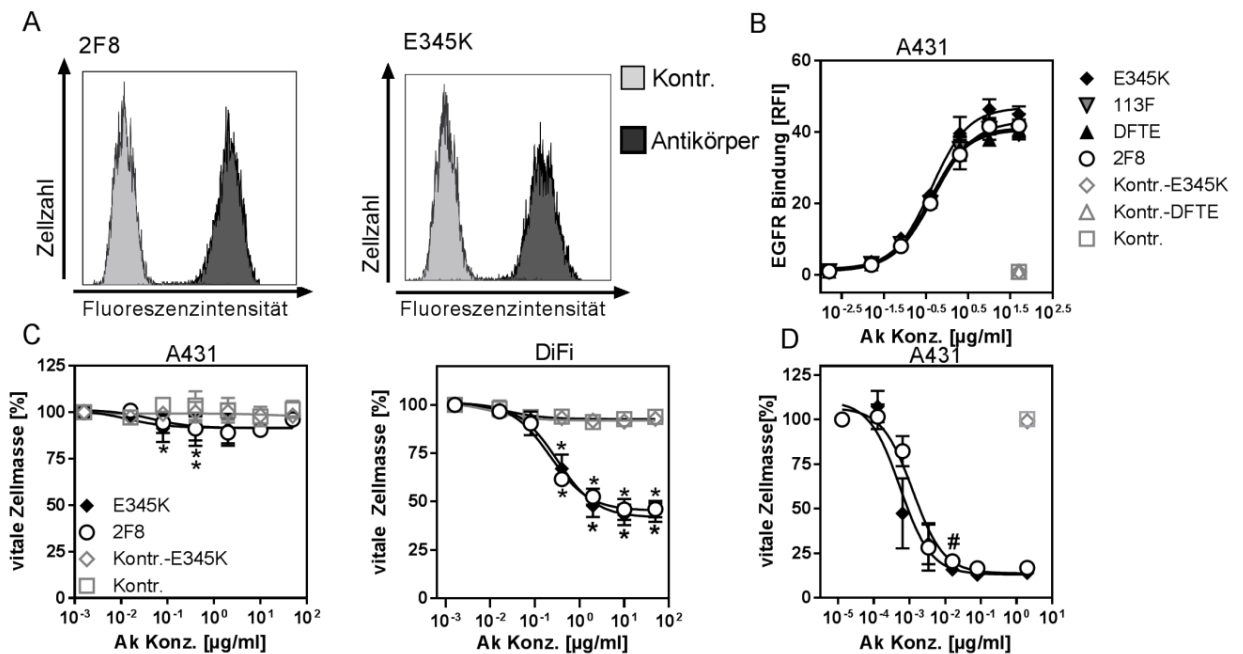


Abbildung 5. Fc-optimierte Antikörper zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber 2F8 in Bezug auf Fab-vermittelte Wirkmechanismen. (A) Zugrunde liegende Histogramme für (B) exemplarisch für 2F8 und 2F8-E345K, Konzentration 10 µg/ml. (B) Die Bindung von 2F8-E345K, 2F8, 2F8-DFTE, 2F8-113F und den jeweiligen Kontrollantikörpern an den EGFR auf A431-Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz gemessen. (C) In Proliferationsinhibitions-Analysen wurden A431 und DiFi mit aufsteigenden Antikörperkonzentrationen (0,016 µg/ml bis 50 µg/ml) von 2F8, 2F8-E345K bzw. deren Kontrollen für 72 h inkubiert und mittels „CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay“ ausgewertet. * $p \leq 0,05$ 2F8/ 2F8-E345K gegenüber Kontrolle. (D) Internalisierungsexperimente erfolgten durch Inkubation von A431-Zellen über 72 h mit aufsteigenden Antikörperkonzentrationen (0,128 ng/ml bis 2 µg/ml) von 2F8, 2F8-E345K und deren Kontrollen zusammen mit 0,4 ng/ 100 µl α -kappa-ETA. Auswertung wie bei (C) # $p \leq 0,05$ 2F8-E345K gegenüber 2F8 (0,64 ng/ml).

Zusammenfassend ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen 2F8 und seinen Fc-optimierten Varianten für die Fab-vermittelten Wirkmechanismen.

4.1.2 Fc-vermittelte Wirkmechanismen

4.1.2.1 ADCC

Zur Charakterisierung der Fc-vermittelten Wirkmechanismen wurde die Effektorzell-vermittelte Zytotoxizität betrachtet. Die ADCC wurde exemplarisch auf A431-Zellen charakterisiert. Untersucht wurden sowohl PMN-, als auch MNC-ADCC, wobei PMN mittels GM-CSF vorstimuliert wurden. Es zeigt sich für 2F8-E345K eine 2F8 entsprechende PMN-vermittelte ADCC (Abbildung 6, F). In der MNC-vermittelten ADCC ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen 2F8-E345K und 2F8 (Abbildung 6, C). 2F8 vermittelt mit signifikant geringerem EC50 bereits bei geringeren Antikörperkonzentrationen eine MNC-ADCC. Die E345K-Mutation scheint folglich die durch MNC-vermittelte ADCC zu verschlechtern.

4.1.2.1.1 Fc γ -Rezeptor-Bindung

Zur weiteren Charakterisierung der ADCC wurde zusätzlich die Bindung der Antikörper an die unterschiedlichen Fc γ -Rezeptoren untersucht. Hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen 2F8-E345K und 2F8 in der Bindung von CD16a V/V und CD16b NA1. CD16a (Fc γ IIIa) charakterisiert eine mittlere Bindungsaffinität und findet sich vor allem auf Makrophagen und NK-Zellen, während CD16b (Fc γ IIIb) GPI-verankert ist, eine niedrige Bindungsaffinität auszeichnet und sich vor allem auf neutrophilen Granulozyten findet. 2F8-E345K bindet sowohl CD16a als auch CD16b schlechter im Vergleich zu 2F8. Die reduzierte Bindung an CD16b scheint sich funktionell nicht auszuwirken (Abbildung 6, D, E und F), während die reduzierte Bindung an CD16a in der MNC-vermittelten ADCC funktionell von Bedeutung zu sein scheint (Abbildung 6, A, B und C).

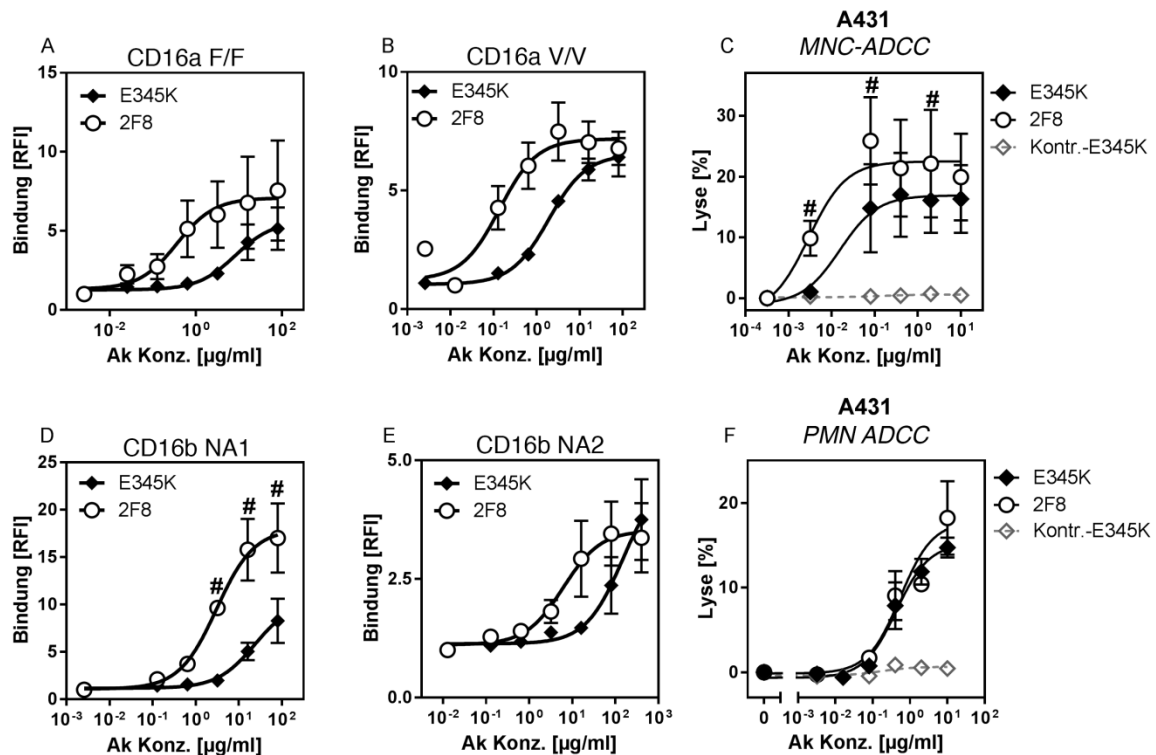


Abbildung 6. 2F8-E345K zeigt signifikant verminderte MNC-vermittelte Zytotoxizität. (A), (B) Zytotoxizitätsanalyse mit ^{51}Cr , Inkubation von A431-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, 2F8 und den jeweiligen Kontrollen und (A) GM-CSF-stimulierten PMN (80:1), (B) MNC (80:1) mit jeweiliger tabellarischer Darstellung der EC50-Werte. (C), (D) Durch indirekte Immunfluoreszenz ermittelte Bindung von CD16b (C) und CD16a (D) an 2F8-E345K und 2F8. # $p \leq 0,05$ 2F8 gegenüber 2F8-E345K.

Damit ergeben sich für die ADCC folgende Unterschiede: 2F8-E345K bindet sowohl an CD16a als auch an CD16b schlechter als 2F8, was sich funktionell in der durch MNC-vermittelten ADCC in einer verminderten Zytotoxizität und höheren EC50-Werten niederschlägt, während sich die PMN-vermittelte ADCC für 2F8-E345K und 2F8 nicht signifikant unterscheidet.

4.1.2.2 CDC

Anschließend wurde die Komplement-vermittelte Zytotoxizität untersucht, deren Verbesserung Ziel der Insertion der E345K-Mutation war.

4.1.2.2.1 C1q-ELISA

Mithilfe des C1q-ELISA wurde die Affinität der Antikörper zum C1q-Molekül untersucht. Hierbei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Affinitäten zu C1q für 2F8-E345K und 2F8. Somit scheint 2F8-E345K gegenüber 2F8 nicht affinitäts-optimiert zu sein.

Für 2F8-DFTE und 2F8-113F ergeben sich dagegen signifikante Unterschiede gegenüber 2F8. Diese CDC-optimierten Antikörper scheinen sich folglich durch eine gesteigerte Affinität zum Startmolekül des klassischen Weges auszuzeichnen (Abbildung 7 und Tabelle 11).

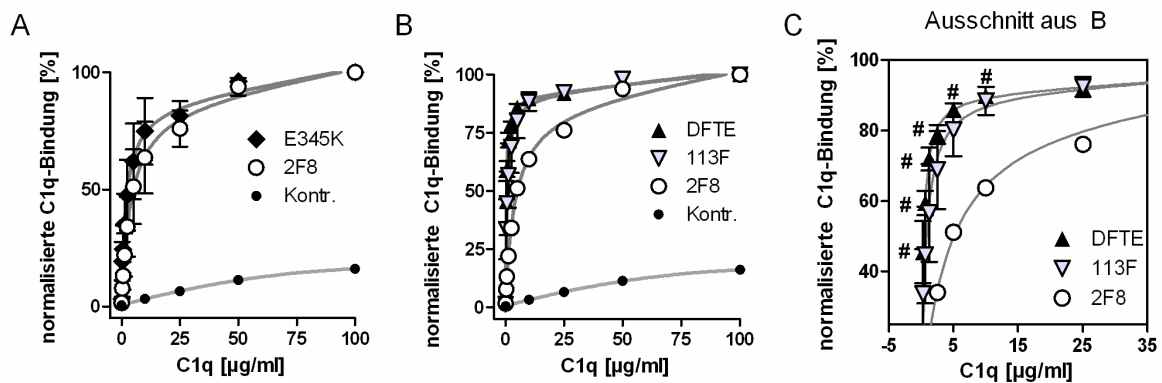


Abbildung 7. 2F8-E345K erscheint im Gegensatz zu 2F8-DFTE und 2F8-113F gegenüber 2F8 nicht C1q-affinitäts-optimiert. Affinitätsbestimmung mittels Sandwich-ELISA. Nach Beschichtung der Platte mit den Antikörpern (je 10 µg/ml) bzw. 1xDPBS als Kontrolle, erfolgte die Inkubation mit humanem C1q in aufsteigender Konzentration (0 µg/ml bis 100 µg/ml) für 1h. (A) 2F8-E345K im Vergleich zu 2F8, (B) 2F8-DFTE und 2F8-113F im Vergleich zu 2F8, (C) Ausschnitt aus (B). #p ≤ 0,05 2F8-DFTE (10 bis 0,3125 µg/ml)/2F8-113F (5 bis 0,3125 µg/ml) gegenüber 2F8.

Tabelle 11. K_D -Werte zeigen eine gegenüber 2F8 erhöhte Affinität von 2F8-113F und 2F8-DFTE zum C1q-Molekül. Berechnung der Signifikanzen zu 2F8 nach einem nicht-parametrischen ANOVA (Friedman Test mit multiplem Vergleich nach Dunn).

| Antikörper | K_D -Werte [µg/ml] ± Standardfehler | p-Wert (Ak vs. 2F8) | p-Wert (E345K vs. Ak) |
|------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| 2F8 | 4.7 ± 1.6 | | n.s. |
| 2F8-E345K | 3.7 ± 1.9 | n.s. | |
| 2F8-113F | 1.1 ± 0.3 | p ≤ 0,05 | n.s. |
| 2F8-DFTE | 0.6 ± 0.1 | p ≤ 0,05 | p ≤ 0,05 |

4.1.2.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Nachdem im ELISA gezeigt werden konnte, dass 2F8-DFTE und 2F8-113F in ihrer Affinität zu C1q gesteigert sind, sollte die Anlagerung von Komplementbestandteilen auf der Zelle untersucht werden. Dazu wurden C1q und C4(b/c) mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 8, A bis C). Dabei fällt zuerst auf, dass trotz im ELISA gezeigter gleicher Affinität zu C1q für 2F8 und 2F8-E345K, 2F8 nicht in der Lage ist, C1q auf der

Zelloberfläche anzulagern. Die Anlagerung von 2F8 entspricht der Höhe des Negativ-Kontrollantikörpers. Die drei CDC-optimierten Antikörper lagern dagegen stark C1q auf der Zelloberfläche an. Während 2F8-E345K signifikant weniger C1q anlagert als 2F8-DFTE und 2F8-113F, lagert er interessanterweise signifikant mehr C4(b/c) an (Abbildung 8, C). Die im C1q-ELISA für 2F8-DFTE und 2F8-113F beschriebene Affinitätssteigerung gegenüber C1q zeigt sich also auch bei der C1q-Anlagerung auf der Zelle. 2F8-DFTE und 2F8-113F lagern mehr C1q an als 2F8-E345K. Das Verhältnis zwischen C1q-Anlagerung und C4(b/c)-Anlagerung ist nicht proportional.

4.1.2.2.3 Zytotoxizitäts-Analyse

In der mit $^{51}\text{Chrom}$ durchgeführten Zytotoxizitäts-Analyse mit humanem Serum bestätigt sich wieder die nicht vorhandene Kompetenz des 2F8 Antikörpers die Komplementkaskade zu aktivieren. Dagegen initiieren die CDC-optimierten Antikörper eine starke Zelllyse. Dabei initiiert 2F8-E345K gegenüber 2F8-DFTE und 2F8-113F signifikant mehr CDC (Abbildung 8, E). Dies gilt sowohl auf A431- als auch auf DiFi-Zellen. Trotz starker C1q-Anlagerung initiieren 2F8-DFTE und 2F8-113F also nur mäßig die Komplementkaskade und erreichen insgesamt signifikant geringere Lyseraten als die 2F8-Variante.

Aktivierende Mutationen im weiteren Verlauf des EGFR-Signalweges wie z.B. Mutationen im Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) können die Effektivität von Antikörpertherapien herabsetzen. Aus diesem Grund wurden A431-Zellen ohne KRAS-Mutation und A431-Zellen, die die als negativer prädiktiver Marker bekannte KRAS- $^{\text{G12V}}$ -Mutation tragen, im Hinblick auf die CDC verglichen. Dabei zeigte sich für die KRAS- $^{\text{G12V}}$ -Mutation ein dem A431-Wildtyp ähnliches Bild, wobei die Lyseraten insgesamt etwas niedriger lagen. Die stärkste Lyse war hierbei bei beiden Zelllinien bei 2F8-E2345K zu beobachten, während 2F8-DFTE und 2F8-113F geringere Lyseraten aufwiesen. Zudem sinkt die erreichte Lyse für 2F8-DFTE und 2F8-113F auf A431-KRAS- $^{\text{G12V}}$ etwas stärker als für 2F8-E345K (Abbildung 8, F). Die E345K-Variante weist somit auch für KRAS-mutierte Zellen die höchste CDC-Aktivität der untersuchten Antikörper auf.

Im Vollblut (Abbildung 8, D) zeigt 2F8-E345K im Vergleich zur CDC mit Serum eine deutlich verringerte Zytotoxizität, in Anwesenheit von Eculizumab ist keine Lyse mehr nachweisbar. Eculizumab greift in die Komplementkaskade ein, indem es C5 bindet und so

den weiteren Ablauf der Kaskade unterbricht. Somit ist die nachweisbare Lyse im Vollblut auf CDC und nicht auf eine mögliche ADCC zurückzuführen.

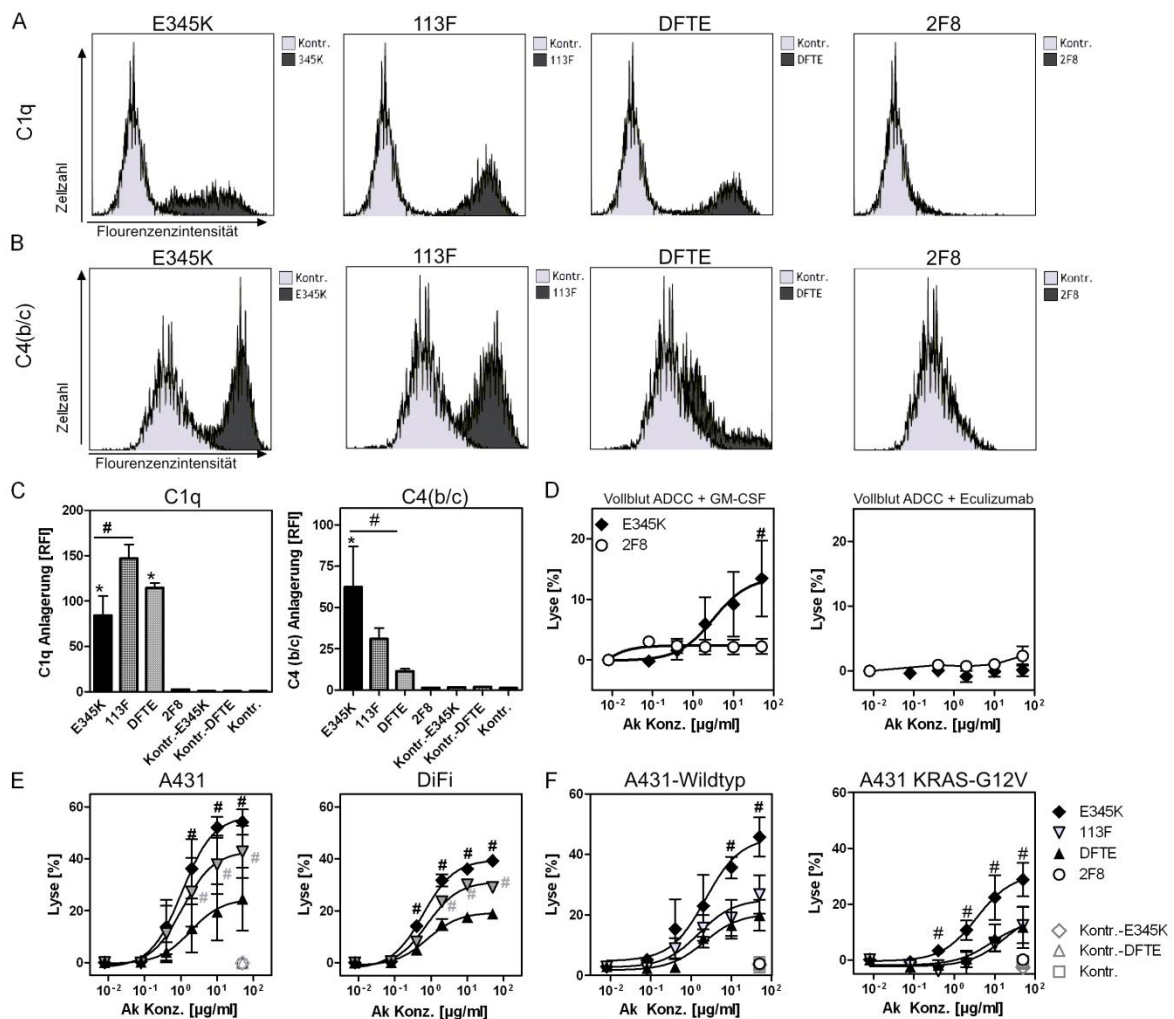


Abbildung 8. 2F8-E345K initiiert effektiv CDC bei vergleichsweise geringer C1q-Anlagerung. (A) bis (C) Indirekte Immunfluoreszenz, Anlagerung (A) von C1q bzw. (B) von C4(b/c) auf A431-Zellen (Histogramme). (C) (C, links) Die affinitäts-optimierten 2F8-DFTE und 2F8-113F lagern mehr C1q an als 2F8-E345K. *p<0,05 2F8-E345K/ 2F8-DFTE gegenüber der entsprechenden Kontrolle. #p<0,05 2F8-E345K gegenüber 2F8-113F.(C, rechts) im einfaktoriellen ANOVA. Trotz hoher C1q-Anlagerungen, lagern 2F8-DFTE und 2F8-113F weniger C4(b/c) als 2F8-E345K an. *p<0,05 2F8-E345K gegenüber Kontrolle #p<0,05 2F8-E345K gegenüber 2F8-DFTE. (D), (E), (F) Zytotoxizitäts-Analyse mit ⁵¹Cr, Inkubation von A431-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, 2F8 sowie (D) 25% v/v Vollblut, (E), (F) 25% v/v humanem Serum. (D, links) Stimulation des Vollbluts mit GM-CSF, ohne Eculizumab. #p<0,05 2F8-E345K gegenüber 2F8 (D, rechts) Stimulation des Vollbluts mit GM-CSF, mit Eculizumab. (E) 2F8-E345K initiiert mehr CDC als 2F8-DFTE und 2F8-113F. A431: #p<0,05 2F8-E345K/ 2F8-113F gegenüber 2F8-DFTE (50 bis 2 µg/ml), #p<0,05 2F8-E345K gegenüber 2F8-113F (10 µg/ml), DiFi: #p<0,05 2F8-E345K gegenüber 2F8-113F/2F8-DFTE, #p<0,05 2F8-113F gegenüber 2F8-DFTE. (F) 2F8-E345K ist weniger vom KRAS-Wildtyp abhängig als 2F8-DFTE und 2F8-113F.

A431-Wildtyp: # $p \leq 0,05$ 2F8-E345K gegenüber 2F8-113F/ 2F8-DFTE. A431-KRAS-GV12: # $p \leq 0,05$ 2F8-E345K gegenüber 2F8-113F/2F8-DFTE. D-F: zweifaktorieller ANOVA.

Folglich initiiert 2F8-E345K bei im Vergleich zu 2F8-DFTE und 2F8-113F geringer C1q-Anlagerung effektiv, erfolgreich und nachhaltig CDC.

4.1.2.2.4 Einfluss des EGFR-Expressionslevels

Mithilfe des BHK-EGFR⁺-Modells wurde der Einfluss unterschiedlicher EGFR-Expressionslevel auf die Fähigkeit von 2F8-E345K, CDC zu induzieren, untersucht (Abbildung 9, A). Es zeigt sich, dass 2F8-E345K sowohl bei niedrigem als auch hohem EGFR-Level CDC initiieren kann, wobei ein gewisses Level an Rezeptoren vorhanden sein muss (BHK-EGFR⁺ *sehr gering*). Ob das Expressionsniveau dann mittel (BHK-EGFR⁺ *mittel*) oder hoch (BHK-EGFR⁺ *hoch*) ist, spielt eine untergeordnete Rolle. 2F8-E345K ist damit in der Lage auch Zielzellen mit geringer EGFR-Expression zu lysieren. Dies gilt für 2F8-DFTE und 2F8-113F nicht (Abbildung 9, B), die zur Vermittlung einer effektiven CDC eine hohe EGFR-Dichte auf der Oberfläche benötigen. 2F8-113F und 2F8-DFTE benötigen zur Initiation relevanter Komplement-vermittelter Lyseraten ein hohes EGFR-Expressionslevel, ca. ab $1,4 \times 10^6$ Rezeptoren pro Zelle.

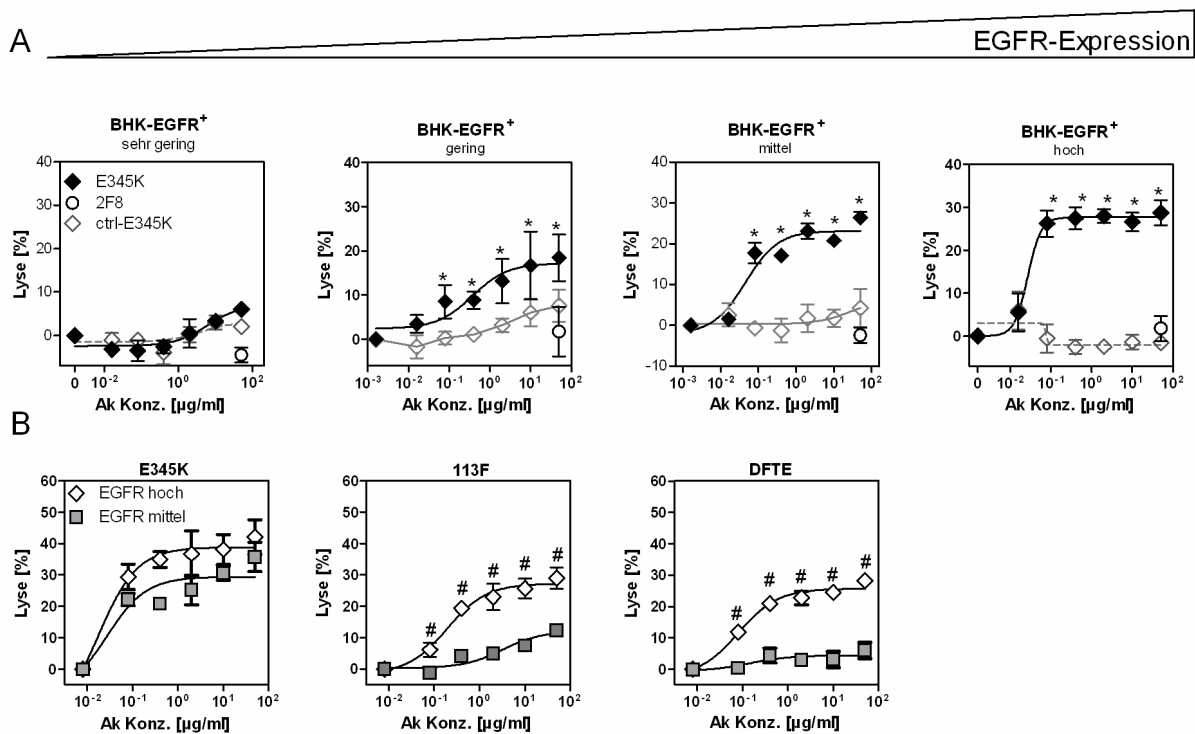


Abbildung 9. 2F8-E345K aktiviert die Komplementkaskade auch bei niedriger EGFR-Expression. (A) Zytotoxizitäts-Analyse mit ^{51}Cr , Inkubation von BHK-EGFR⁺-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, 2F8 und den jeweiligen Kontrollen, sowie 25% v/v humanem Serum. Das EGFR-Expressionslevel steigt von links nach rechts an. 2F8-E345K kann sowohl bei niedrigen als auch hohen EGFR-Expressionsleveln CDC initiieren. * $p \leq 0,05$ 2F8-E345K gegenüber Kontrolle (B) Zytotoxizitäts-Analyse mit ^{51}Cr wie in (A) mit EGFR⁺ bei mittlerem und hohem Expressionslevel für 2F8-E345K, 2F8-113F und 2F8-DFTE. Dabei erweisen sich 2F8-DFTE und 2F8-113F als abhängiger von hohen EGFR-Expressionsleveln. A und B: zweifaktorieller ANOVA.

4.1.2.2.5 Hemmung der Fc-Fc-Interaktion

Die von Diebold et al. beschriebene Hexamerisierung von IgG-Antikörpern könnte die Wirkungsweise des 2F8-E345K erklären (Diebold et al., 2014). Diese Hexamerisierung setzt eine Fc-Fc-Interaktion voraus, die durch das sogenannte DeLano-Peptid (DCAWHLGELVWCT) gestört werden kann (DeLano et al., 2000). Das DeLano-Peptid ist ein dreizehn Aminosäuren langes Peptid, das zwischen der C_{H2}- und der C_{H3}-Domäne das Fc-Fragment bindet und so die für eine Interaktion der Fc-Teile wichtigen Stellen blockiert. Als Kontrolle diente das sogenannte Kontroll-Peptid (GWTVFQKRLDGSV). Die Peptide wurden im Folgenden sowohl Zytotoxizitäts-Analysen, als auch Komplementanlagerungen zugefügt. Die C1q- und die C4(b/c)-Anlagerung sinkt bei Zugabe des DeLano-Peptids für 2F8-E345K. Diese reduzierte Bindung ist für C1q und C4(b/c) statistisch signifikant (Abbildung 10, A). Außerdem zeigt sich sowohl für 2F8-E345K als auch 2F8-113F und 2F8-DFTE eine verminderte CDC in Anwesenheit des DeLano-Peptids. Die Unterschiede in der CDC sind für 2F8-E345K und 2F8-DFTE statistisch signifikant (Abbildung 10, B). Die Versuche erfolgten auf A431.

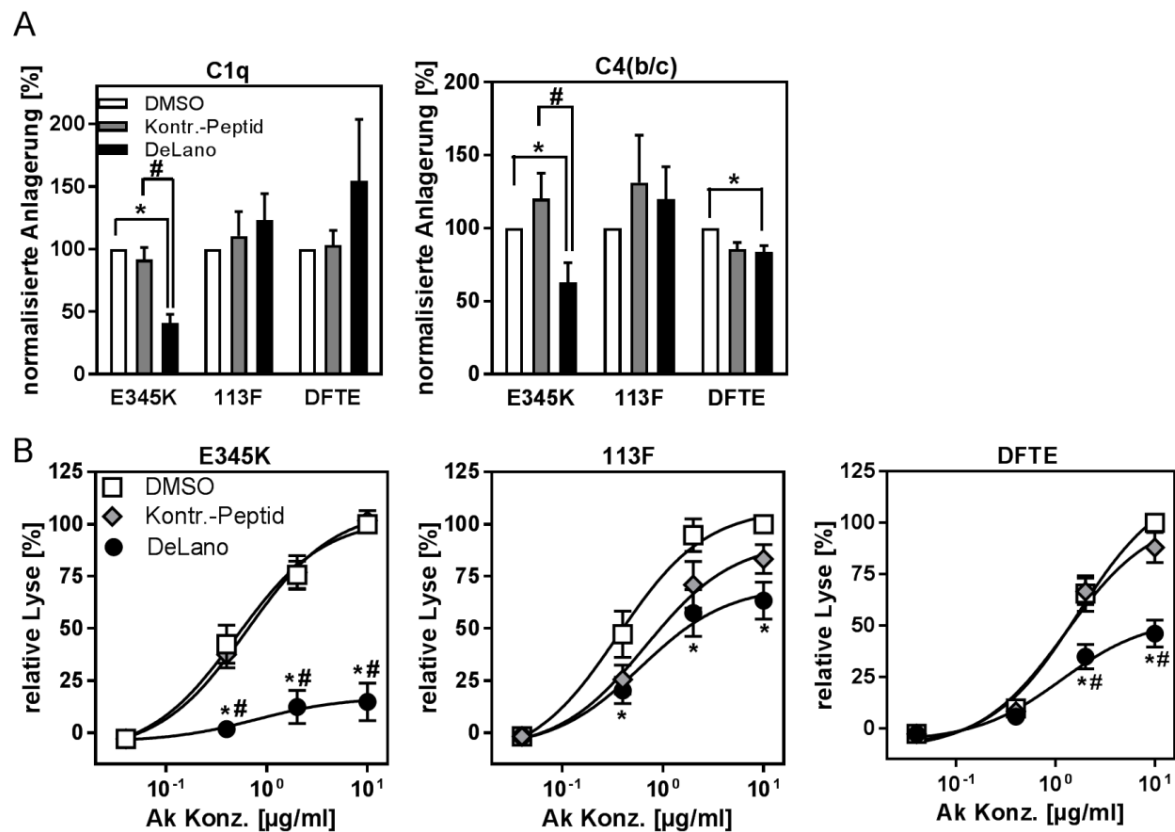


Abbildung 10. 2F8-E345K benötigt Fc-Fc-Interaktionen, um C1q anzulagern. (A) Nachweis der Anlagerung von C1q und C4(b/c) mittels indirekter Immunfluoreszenz (A431). * $p \leq 0,05$ DeLano-Peptid gegenüber DMSO, # $p \leq 0,05$ DeLano-Peptid gegenüber Kontroll-Peptid im einfaktoriellen ANOVA. (B) Zytotoxizitäts-Analyse mit ^{51}Cr , Inkubation von A431-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, 2F8-113F, 2F8-DFTE und 50 $\mu\text{g/ml}$ DeLano-Peptid/ Kontroll-Peptid/ DMSO, sowie 25% v/v humanem Serum. * $p \leq 0,05$ DeLano-Peptid gegenüber DMSO, # $p \leq 0,05$ DeLano-Peptid gegenüber Kontroll-Peptid im zweifaktoriellen ANOVA.

Insgesamt ergeben sich somit erhebliche Unterschiede in der funktionellen Charakterisierung zwischen 2F8-E345K und 2F8 einerseits und zwischen 2F8-E345K und 2F8-DFTE und 2F8-113F andererseits. Typischerweise wird der klassische Weg der Komplementkaskade durch die Zusammenlagerung mehrerer IgG Moleküle auf der Zelloberfläche aktiviert. In Vorarbeiten konnte die im Fc-Teil liegende Punktmutation E345K aufgrund ihrer Fähigkeit, verstärkt Fc-Fc-Interaktionen einzugehen, ausgewählt werden (de Jong et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass 2F8-E345K bei unveränderter C1q-Affinität, also dem 2F8-Wildtyp entsprechender Bindung an C1q, die C1q-Bindungsavidität steigert. Dies ist besonders zu betonen, da die Wildtyp-Variante fast keinerlei C1q auf der Zelloberfläche binden kann. Zusätzlich konnte durch eine starke C4b/c- Anlagerung gezeigt werden, dass die Kaskade effektiv und nachhaltig aktiviert wird. Diese Beobachtung deckt sich u.a. mit der von

Rösner et al. beschriebenen Tatsache, dass eine C1q-Anlagerung oberhalb einer gewissen Grenze nicht automatisch auch eine Anlagerung weiterer Komplement-Faktoren und die Aktivierung der CDC zur Folge hat (Rösner et al., 2014).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 2F8-E345K in der Lage ist, verschiedene Zelllinien zu lysieren. Dabei entsprechen die Lyse-Daten der vorher beschriebenen Anlagerung von Komplementbestandteilen auf der Zelle. Während der 2F8-Wildtyp keine Lyse vermittelt, zeigt 2F8-E345K eine effektive CDC. Zusätzlich konnte anhand des BHK-EGFR⁺-Modells gezeigt werden, dass CDC-Aktivität bei sowohl niedrigen als auch hohen EGFR-Expressionsleveln vermittelt wird. Obwohl die transfizierten BHK-Zellen als Hamsterzelllinie keine schützenden humanen Komplementregulatoren tragen, konnte auch hier für den 2F8-Wildtyp eine nur minimale bis keine Lyse beobachtet werden.

Der Vergleich von 2F8-E345K und dem C1q-optimierten 2F8-IgG1-DFTE bzw. dem IgG1/IgG3 Chimär 2F8-IgG1-113F deckte erhebliche Unterschiede im Ablauf der Komplementkaskade nach der Anlagerung von C1q auf. Trotz massiver C1q-Anlagerung wurde weniger C4b/c auf der Zelle gebunden als für 2F8-E345K, was sich ebenfalls auf die CDC-Aktivität auswirkte, wo sich besonders für 2F8-IgG1-DFTE eine erheblich geringere Lyse zeigte.

Die Verwendung des DeLano-Peptids (DCAWHLGELVWCT), das selektiv die Fc:Fc-Interaktion stört, führte zu einem starken Abfall der C1q-Anlagerung auf der Zelle für 2F8-E345K. Dies ließ sich nicht für 2F8-IgG1-DFTE oder 2F8-IgG1-113F zeigen. Ähnliches ließ sich für die CDC darstellen: Hier kam es ebenfalls zu einem deutlichen Abfall der Zelllyse für 2F8-E345K, während der Effekt für 2F8-IgG1-DFTE geringer und für 2F8-IgG1-113F nicht nachweisbar war.

4.2 Vergleich von Antikörpern gegen verschiedene Epitope

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die E345K-Mutation für den Antikörper 2F8 signifikant die CDC verbessert, wurde untersucht, ob die Mutation auch für andere Antikörper einen Vorteil in der CDC darstellt. Aus Abbildung 11, A und B wird ersichtlich, dass die Mutation die IgG1 Antikörper 003, H425 und 225 in ihrer CDC signifikant verbessert, wobei keine signifikante Veränderung der EGFR-Bindung auftritt. Besonders groß ist der Effekt für H425-E345K und 225-E345K, die beide auch in ihrer EC50 gesteigert werden. Es ergeben

sich EC50-Werte von 0,614 µg/ml für 2F8-E345K, 19,55 für 003-E345K, 0,205 µg/ml für 225-E345K und 0,188 µg/ml für H425-E345K. Die Wildtyp-Varianten der Antikörper sind durchgängig nicht in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren. Deutlich wird hier außerdem der Unterschied zwischen den einzelnen Antikörpern, der die Wahl des Epitops als zentrale Frage unterstreicht. Darüber hinaus konnten statistisch signifikante Unterschiede in der mit Vollblut durchgeführten Zytotoxizitäts-Analyse für 2F8-E345K und H425-E345K gezeigt werden (Abbildung 11, C). Diese Antikörper wurden auf Grund ihrer starken CDC-Lyseaktivität für die Vollblut-Experimente ausgewählt. Aus Abbildung 11,D wird ersichtlich, dass es sich bei der Zytotoxizität im Vollblut um CDC und nicht um ADCC handelt. Dies ist analog zu den in Abbildung 8, D gezeigten Experimenten.

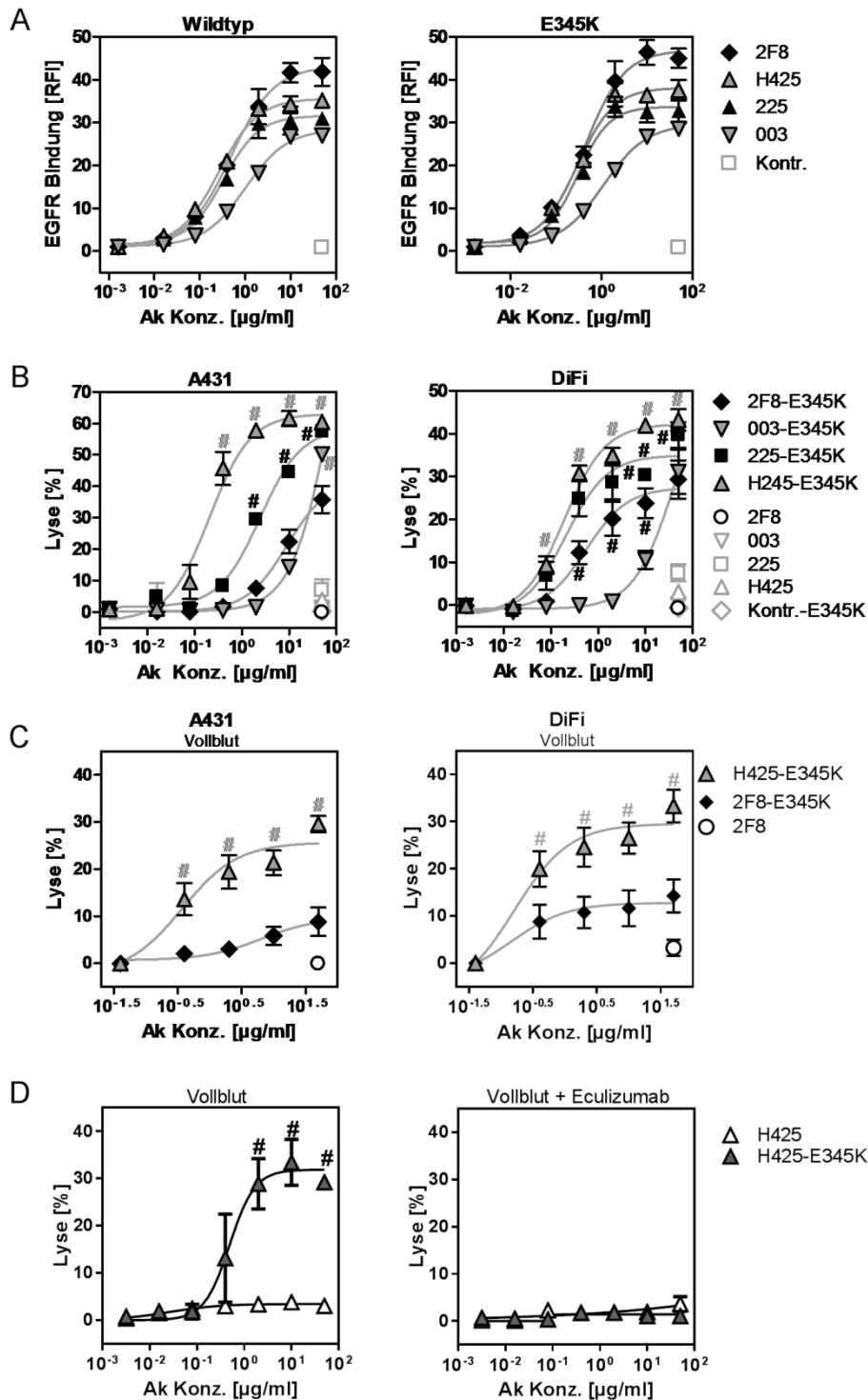


Abbildung 11. Die E345K-Mutation verbessert die CDC-Aktivität aller untersuchten Antikörper. (A) indirekte Immunfluoreszenz. Bindung der Antikörper an den EGF-Rezeptor (A431), links für die Wildtyp-Antikörper, rechts für die E345K-Mutation. (B) Zytotoxizitäts-Analyse mit ^{51}Cr , Inkubation von A431- bzw. DiFi-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, 003-E345K, 225-E345K, H425-E345K und den jeweiligen Kontrollen, sowie 25% v/v humanem Serum. A431: # $p \leq 0,05$ für H425-E345K gegenüber 2F8-E345K (50 bis 0,4 $\mu\text{g/ml}$), H425-E345K gegenüber 003-E345K/ 225-E345K (10 bis 0,4 $\mu\text{g/ml}$); # $p \leq 0,05$ für 225-E345K gegenüber 2F8-E345K (50 bis 2 $\mu\text{g/ml}$), # $p \leq 0,05$ für 225-E345K gegenüber 003-E345K (10 bis 2

$\mu\text{g/ml}$); # $p \leq 0,05$ für 2F8-E345K gegenüber 003-E345K (50 $\mu\text{g/ml}$) DiFi: # $p \leq 0,05$ für H425-E345K gegenüber 2F8-E345K/ 003-E345K (50 bis 0,08 $\mu\text{g/ml}$), H425-E345K gegenüber 225-E345K (10 $\mu\text{g/ml}$); # $p \leq 0,05$ für 225-E345K gegenüber 2F8-E345K (50 bis 2 $\mu\text{g/ml}$), # $p \leq 0,05$ für 225-E345K gegenüber 003-E345K (10 bis 2 $\mu\text{g/ml}$); # $p \leq 0,05$ für 2F8-E345K gegenüber 003-E345K (10 bis 0,4 $\mu\text{g/ml}$) (C) Zytotoxizitäts-Analyse mit ^{51}Cr , Inkubation von A431- bzw. DiFi-Zellen für 3 h mit aufsteigenden Konzentrationen von 2F8-E345K, H425-E345K und den jeweiligen Kontrollen, sowie 25% v/v humanem Vollblut. # $p \leq 0,05$ für H425-E234K gegenüber 2F8-E345K. (D) wie C, für A431 mit und ohne Eculizumab. # $p \leq 0,05$ für H425-E345K gegenüber H425 (50 bis 2 $\mu\text{g/ml}$). B-D: zweifaktorieller ANOVA.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das EGFR-Epitop somit in hohem Maße die CDC beeinflusst und damit eine entscheidende Rolle für die Effektivität des Antikörpers spielt. Während die Bindung der jeweiligen Antikörper an den EGFR durch Einführung von E345K nicht erheblich verändert wurde, konnten große Unterschiede in der CDC gezeigt werden. Hier vermittelte H425 (Matuzumab) die potenteste CDC, gefolgt von 225 (Cetuximab), 2F8 (Zalutumumab) und 003. Keiner der Wildtyp-Antikörper vermittelte CDC. Die Zytotoxizitäts-Analysen mit humanem Vollblut, die eine Interaktion zwischen Komplementsystem einerseits und den im Vollblut enthaltenen Effektorzellen andererseits erlauben, betonten den Unterschied zwischen den Epitopen weiter.

5 Diskussion

In der Therapie maligner Erkrankungen nehmen rekombinante monoklonale Antikörper eine zunehmend wichtigere Rolle ein. Jedoch ist der jeweilige Beitrag verschiedener Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper für das Ansprechen der Patienten auf Antikörper-basierte Tumorthérapien nicht geklärt und möglicherweise für verschiedene Zielantigene oder Tumorentitäten unterschiedlich. Für viele der heute zugelassenen monoklonalen Antikörper werden immun-vermittelte Funktionen wie Antikörper-abhängige Zell-vermittelte- oder Komplement-vermittelte Zytotoxizität als wesentliche Wirkmechanismen diskutiert. Dies gilt besonders auch für hämatoonkologische Tumoren. Die Notwendigkeit, neue Strategien zu entwickeln, die die Effektivität Antikörper-basierter Tumorthérapien verbessern, bleibt auch heute aktuell. Das Komplementsystem ist essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems und spielt eine Schlüsselrolle im Erkennen und Abwehren von Pathogenen sowie der Aktivierung weiterer Teile des Immunsystems und damit der Vernetzung von angeborener und erworbener Immunantwort. Gerade deshalb stellt seine Aktivierung einen attraktiven Mechanismus für monoklonale Antikörper in der Tumorthérapie dar. Während solide Tumoren bisher als weitestgehend Komplement-resistent galten (Dechant et al., 2008), ist die Rolle des Komplementsystems für Rituximab, Ofatumumab und Alemtuzumab bei hämatologischen Tumoren gut belegt (Taylor et al., 2016), (Glennie et al., 2007). Nach Infusion von Rituximab oder Ofatumumab konnten eine Aktivierung des Komplementsystems und der Verbrauch von Komplementbestandteilen im Patientenblut nachgewiesen werden (Beurskens et al., 2012), (Tempescul et al., 2016). Zusätzlich ist ein Therapieversagen bzw. eine Resistenz gegen Rituximab mit dem Vorhandensein Komplement-regulatorischer Proteine assoziiert (Bannerji et al., 2003). Für Rituximab konnte die Rolle der Komplementaktivierung zusätzlich im Mausmodell gezeigt werden (Di Gaetano et al., 2003). Auch wenn bei soliden Tumoren der Beitrag des Komplementsystems zum Erfolg von Antikörpern wie Cetuximab weniger etabliert ist (Kimura et al., 2007), so konnte doch auch hier im Mausmodell eine Komplementaktivierung gezeigt werden (Hsu et al., 2010). Aufgrund der beschriebenen Schlüsselrolle des Komplementsystems in der Vermittlung zwischen den einzelnen Komponenten und der Aktivierung des Immunsystems ist die Stärkung der Komplementaktivierung durch monoklonale Antikörper nicht zu unterschätzen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine potente CDC auf EGFR-exprimierenden Tumorzellen erreicht werden kann, wenn

monoklonale Antikörper gegen verschiedene, miteinander nicht konkurrierende Epitope kombiniert werden (Dechant et al., 2008). Grundlage der Komplementaktivierung über den klassischen Weg ist die Aktivierung von C1q, wozu mindestens zwei IgG zusammen nötig sind oder aber ein IgM-Pentamer, für das im Vergleich zu IgG eine Effektivitätssteigerung um den Faktor 1000 in vitro beschrieben wird (Nimmerjahn, 2013). Diese Tatsache und die Erkenntnisse aus den beschriebenen Vorarbeiten (Diebolder et al., 2014), (Wang, G. et al., 2016), (de Jong et al., 2016) legen nahe, dass eine Interaktion zwischen den Fc-Teilen der Antikörper wichtig für die Aktivierung von C1q ist. Diese Interaktion korreliert wahrscheinlich auch mit der räumlichen Struktur der Antikörper. Vom IgM-Pentamer ist bekannt, dass es nicht planar im Raum vorliegt, sondern vielmehr eine Pilz-ähnliche Konfiguration annimmt, die dazu führt, dass die Fc-Teile so in den Raum ragen, dass sie als idealer Bindungspartner für C1q vorliegen (Czajkowsky et al., 2009). Rösner et al. konnten zudem Vorteile des IgG3 gegenüber IgG1 beschreiben, die potentiell auf dessen erhöhter Flexibilität beruhen (Rösner et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit kam nun eine auf diesen Grundlagen basierende Technologie zum Einsatz, die auf neuen Erkenntnissen von Diebolder et al. und de Jong et al. basiert (Diebolder et al., 2014), (de Jong et al., 2016). Durch Einführung einer Mutation (E345K) im Fc-Teil konnte die Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers gesteigert werden, Fc-Fc-Interaktionen nach Antigenbindung einzugehen. Die neue Antikörper-Plattform wurde mit bereits etablierten Verfahren zur Verstärkung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität verglichen und das zytotoxische Potential des hexamerisierenden Antikörpers charakterisiert.

Da die Mutation des IgG1 im Fc-Teil erfolgte, konnte ein dem Wildtyp-ähnliches Verhalten im Rahmen der Fab-vermittelten Mechanismen erwartet werden. Diese Erwartung bestätigte sich in EGFR-Bindungsversuchen. Auch eine durch die Hexamerisierung möglicherweise veränderte Internalisierung der Antikörper-Rezeptor-Komplexe konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt verbessert die Mutation in Bezug auf die Fab-vermittelten Wirkmechanismen weder die Wildtyp-Variante noch verschlechtert sie sie. Die Varianten sind damit gleichwertig.

Darüber hinaus soll vor Diskussion der CDC die antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) näher beleuchtet werden. Die ADCC ist von einer Rezeptoraktivierung auf Seiten der Effektorzelle abhängig. IgG interagieren mit Fc-Rezeptoren (FcR) vom γ -Subtyp, die sich auf verschiedenen humanen Zellen finden. IgG1 können von allen Fc γ R

gebunden werden. Je nach Effektorzelltyp unterscheiden sich die durch Rezeptoraktivierung hervorgerufenen Effekte. So werden Phagozytose induziert, Apoptose vermittelt, Zytokine und Chemokine ausgeschüttet oder Zielzellen lysiert (Bruhns et al., 2009), (Wang, W. et al., 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit MNC und PMN durchgeführt. Aufgrund der Entnahme peripheren Blutes und der im Blut auftretenden zahlenmäßigen Unterschiede fallen unter MNC vor allem Monozyten und NK-Zellen, während zu den PMN vor allem Neutrophile Granulozyten (Neutrophile) gerechnet werden. Eine besondere Rolle spielen in der Vermittlung von ADCC die NK-Zellen, deren FcγRIIIa als starker ADCC-Aktivator gilt (Cartron et al., 2002). Ihre Rolle in der Effektorzell-vermittelten Zytotoxizität konnte bereits in den 90er Jahren *in vitro* nachgewiesen werden (Cooley et al., 1999). Die Abläufe *in vivo* dagegen sind weniger klar nachweisbar, da *in vivo* verschiedene Aktionsmechanismen parallel wirken können. Belege für die Rolle der ADCC *in vivo* stammen vor allem auch aus Untersuchungen der FcR-Polymorphismen, da die Bindung der Antikörper an die jeweiligen Fcγ-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielt. So konnte in Studien gezeigt werden, dass das Ansprechen von Patienten auf eine Therapie mit Rituximab vom Allotyp des Rezeptors abhängig ist. Patienten, die den hoch-affinen Typ FcγRIIIa 158V/V tragen, zeigten höhere Ansprechraten als Patienten, die den niedrig-affinen Typ FcγRIIIa 158F/F tragen (Cartron et al., 2002). Overdijk et al. konnten für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 2F8 (Zalutumumab) *in vitro* ADCC-Aktivität unter Verwendung von Makrophagen nachweisen. *In vivo* kam es jedoch nicht zu ADCC, da die Tumorzellen durch ein Mikromilieu eine Art Schutzumgebung zu bilden schienen, die eine Invasion von Effektorzellen erschwerte. (Overdijk et al., 2011). Durch weitere Effektorzellen vermittelte ADCC konnten unter anderem auch Schneider-Merck et al. für Zalutumumab nachweisen (Schneider-Merck et al., 2010). Damit gilt die ADCC als ein wichtiger Wirkmechanismus von Antikörpern (Peipp et al., 2008). Trotzdem ergibt sich ähnlich wie für die CDC die Notwendigkeit, Antikörper so zu optimieren, dass sie verstärkt ADCC vermitteln können. Gleichzeitig ist zu überlegen, ob eine parallele Optimierung von ADCC und CDC sinnvoll ist. Derer et al. konnten beispielsweise eine Verstärkung der PMN-ADCC durch CDC-Aktivität zeigen (Derer et al., 2015).

Im Hinblick auf die hier durchgeführten Zytotoxizitäts-Analysen zeigten sich keine Unterschiede in der PMN-ADCC zwischen 2F8 und 2F8-E345K, dagegen verschlechterte die E345K-Mutation die durch MNC vermittelte ADCC signifikant. Insgesamt wurden Lyseraten von maximal 20% auf A431 erreicht, während bis zu 60% Lyse auf A431 mittels CDC

beobachtet werden konnten. Die Analyse der Bindung der Antikörper an die für PMN (FcR γ IIIb) und MNC (FcR γ IIIa) entscheidenden Rezeptoren, ergab deutliche Unterschiede zwischen 2F8 und 2F8-E345K. Die insgesamt geringe Affinität zu den Rezeptoren kann durch den nicht ADCC-optimierten Fc-Teil der Antikörper erklärt werden. Unklar bleibt, warum sich die reduzierte Bindung von 2F8-E345K an CD16b nicht funktionell auswirkt, während die reduzierte Bindung an CD16a zu einer reduzierten MNC-ADCC führt. Sollte dies an der Fc:Fc-Interaktion des 2F8-E34K liegen, die auf der Zelloberfläche nach Antigenbindung stattfindet, ist eine Blockierung des FcR durch die zusammengelagerten Fc-Teile denkbar, was dann jedoch auch die PMN-ADCC inhibieren sollte. Hier ist also eine eingehendere Betrachtung zur Klärung nötig. Insbesondere die Bindung an den Fc γ RIIa (CD32) ist hier von besonderem Interesse für die Aktivierung von PMN.

Im Weiteren sollen die Auswirkungen der E345K-Mutation auf die Aktivierung des Komplementsystems diskutiert werden. Vor Untersuchung der CDC und deren Initiierung, konnte mittels ELISA gezeigt werden, dass die Mutation nicht zu einer erhöhten Bindungsaffinität zu C1q führt. Das ist anders bei den ebenfalls untersuchten Varianten 2F8-DFTE und 2F8-113F, einem IgG1/IgG3-Hybrid. Diese mit dem Ziel einer verstärkten C1q-Bindung entwickelten Antikörper, zeigten auch im ELISA eine verstärkte C1q-Affinität. Dies bestätigt die Ergebnisse von Moore et al. und Natsume et al. (Moore et al., 2010), (Natsume et al., 2008). In der Literatur sind beispielsweise auch CD20-Antikörper beschrieben, die durch Mutationen an Position K326A und E333A innerhalb der CH2 Domäne eine bis zu ~2.5 fach gesteigerten C1q-Affinität erreichen (Idusogie et al., 2001). Dies kann durch die unmittelbare Nähe der Mutationen zur C1q-Bindestelle erklärt werden und damit der direkten Veränderung der C1q-Bindeoberfläche. Die erhöhte Bindungsaffinität führt dann zu einer erhöhten Anlagerung von Komplementbestandteilen auf der Zelloberfläche und einer verstärkten CDC. Die unveränderte Affinität zu C1q für den hier untersuchten 2F8-E345K war zu erwarten, weil die Mutation distal der C1q-Bindestelle im Fc-Teil liegt (Tao et al., 1991). Damit wird deutlich, dass es sich bei der Verstärkung der Fc-Fc-Interaktion um einen neuen Ansatz des Fc-Engineerings handelt. Auf der Zelloberfläche konnte für die C1q-Affinitätsgesteigerten Antikörper eine verstärkte Anlagerung von C1q gezeigt werden, die interessanterweise aber nicht auch eine verstärkte Anlagerung von nachfolgenden Bestandteilen der Kaskade bedeutete. Dies macht deutlich, wie wichtig nicht nur die Bindung und Aktivierung des Startmoleküls ist, sondern welche entscheidende Rolle die nachhaltige Fixierung der Bestandteile auf der Zelloberfläche für den erfolgreichen Ablauf der Kaskade spielt. Eine

reine Affinitäts-Steigerung ist damit als Strategie zur Verbesserung der CDC in Frage zu stellen. Zu betonen ist außerdem, dass Wildtyp EGFR-Antikörper per se nicht in der Lage sind, Komplement auf der Zelloberfläche anzulagern oder CDC zu vermitteln, was sich mit der aktuellen Literatur deckt (Taylor et al., 2016). Durch Verstärkung der Fc:Fc-Interaktion kommt es auf der Zelloberfläche zu einer Zusammenlagerung der Fc-Teile (vgl. Abbildung 3 unter 1.4), die die Fixierung von C1q auf der Oberfläche erleichtert und durch Addition der Bindungsaffinitäten eine gestärkte Avidität bedeutet, die Schlüssel der nachhaltigen C1q-Fixierung ist.

Während hohe Lyseraten in der CDC mit humanem Serum erreicht werden konnten, fielen diese bei Verwendung von humanem Vollblut rapide ab. Peripher gewonnenes Vollblut enthält neben dem Blutplasma eine große Zahl von Erythrozyten, sowie Thrombozyten und die hier in PMN und MNC unterteilten Leukozyten. Unter die MNC fallen vor allem Monozyten und NK-Zellen, unter die PMN hauptsächlich neutrophile Granulozyten. Bei der Verwendung von Vollblut ist also theoretisch eine Vermittlung von CDC wie auch ADCC möglich. Da PMN eine Aktivierung benötigen, wurde das Vollblut mit GM-CSF vorstimuliert. Zur Unterscheidung zwischen CDC und ADCC wurden die Vollblut-Analysen mit und ohne den Komplement-Inhibitor Eculizumab durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die im Vollblut vermittelte Zytotoxizität allein auf CDC zurückgeht. Dieses Phänomen ist auch für andere Antikörper wie zum Beispiel Ofatumumab beschrieben worden (Bologna et al., 2013). Trotzdem muss diskutiert werden, warum die Lyseraten im Vollblut dann nicht denen mit reinem Serum entsprechen, sondern signifikant niedriger sind. Möglicherweise ist dies auf den Gehalt an membranständigen Komplement-regulatorischen Proteinen, besonders auf den zahlenmäßig vorherrschenden Erythrozyten, oder auch die im Blut gelösten Komplementregulatoren zurückzuführen. Andererseits ist auch eine Störung des Mikromilieus durch die Hemmung der Blutgerinnung denkbar, die nach Ricklin et al. mit dem Komplementsystem interagiert (Ricklin et al., 2010). Diese Phänomene sind es wert, in Zukunft näher betrachtet zu werden. Davon abgesehen fragt sich, welche Relevanz die Komplement-vermittelte Zytotoxizität im Vollblut für Antikörper hat, die sich gegen solide Tumoren richten. Hakulinen et al. konnten beispielsweise die Infiltration von Komplement in Microtumoren mikroskopisch nachweisen (Hakulinen et al., 1998). Darüber hinaus wird eine durch Komplement vermittelte verstärkte Einwanderung von Leukozyten in den Tumor in der Literatur berichtet. Damit kann eine Zytotoxizität im Vollblut als nachrangig hingenommen werden.

Derer et al. konnten weiterhin zeigen, dass EGFR-Antikörper in ihrer Aktivität von dem EGFR-Expressionslevel abhängig sind (Derer et al., 2012). Dies bestätigte sich im Rahmen dieser Arbeit, wobei 2F8-E345K weniger abhängig war bzw. auch bei geringeren Expressionsleveln in der Lage war, CDC zu vermitteln. Dies könnte an der verstärkten Zusammenlagerung der Fc-Teile zum Hexamer liegen, die eine sehr effektive Plattform für die Initiierung der Komplementkaskade durch das hexamere C1q darstellen kann. Der Unterschied zwischen A431-Wildtyp und KRAS-mutierten A431 beruht höchst wahrscheinlich ebenfalls auf der Abnahme des EGFR-Expressionslevels auf den KRAS-mutierten Zellen und betont den Vorteil eines Antikörpers, der auch bei niedrigen Expressionsleveln erfolgreich Lyse vermittelt.

Die oben beschriebene Fc-Fc-Interaktion lässt sich durch Zugabe des sogenannten DeLano-Peptids zum Versuchsaufbau stören. Das Delano-Peptid führte zu einer starken Reduktion der Anlagerung von Komplementbestandteilen auf die Zelle und zu einer stark reduzierten CDC. Diese Reduktion der Effektivität konnte für 2F8-DFTE und 2F8-113F nicht in diesem Maße gezeigt werden, obwohl auch hier bei 2F8-DFTE eine leichte Reduktion gesehen wurde. Dies ist damit zu erklären, dass auch diese Antikörper eine gewisse Fc-Interaktion zur Initiierung der Komplementkaskade benötigen.

Die Technologie der gesteigerten Fc-Fc-Interaktion ließ sich neben 2F8 ebenfalls auf andere EGFR-Antikörper übertragen und führte auch hier zu einer Ermöglichung einer CDC-Aktivität, die der Wildtyp Antikörper nicht besitzt. Damit präsentiert sich die Technologie als eine vielversprechende Methode zur Verbesserung der CDC auch für andere Zielantigene von Zielzellen. Deutlich wurde darüber hinaus, wie wichtig die Wahl des einzelnen Antikörpers bzw. seines Epitopes ist. 2F8-E345K zeigte zum Beispiel eine 100-fach höhere EC50 als H425-E345K. Diese Unterschiede sind nicht durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten erklärbar, da diese ähnlich waren und auch durch die Insertion der Mutation nicht verändert wurden. Vielmehr spielt es eine Rolle, wo der einzelne Antikörper an den EGFR bindet. So überlappt beispielweise die Bindestelle von 225 mit der EGF-Bindestelle in Domäne III und inhibiert so den EGFR-Signalweg. H425 bindet dagegen nicht-kompetitiv in Domäne III nahe des Übergangs zu Domäne II. Auf diese Weise hemmt H425 sterisch den Rezeptor an der für die Dimerisierung notwendigen Konformationsänderung (Schmiedel et al., 2008). Möglicherweise ist H425 so flexibler als 225 und dadurch stärker geeignet, sich durch Rotation im Raum und veränderte Avidität über die Fc-Fc-Interaktion zu einer hexameren Struktur zusammen zu lagern.

Die Stärkung der Fc-Fc-Interaktion stellt somit ein neues Konzept zur Verbesserung therapeutischer Antikörper dar. Mit Spannung kann die Weiterentwicklung dieser Strategie für die Behandlung solider Tumoren erwartet werden.

9 Zusammenfassung

In der Therapie maligner Erkrankungen nehmen rekombinante monoklonale Antikörper eine zunehmend wichtigere Rolle ein. Jedoch ist der jeweilige Beitrag verschiedener Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper für das Ansprechen der Patienten auf Antikörper-basierte Tumortherapien nicht geklärt und möglicherweise für verschiedene Zielantigene oder Tumorentitäten unterschiedlich. Für viele der heute zugelassenen monoklonalen Antikörper werden immun-vermittelte Funktionen wie Antikörper-abhängige Zell-vermittelte- oder Komplement-vermittelte Zytotoxizität als wesentliche Wirkmechanismen diskutiert. Jedoch gelten solide Tumoren als weitgehend Komplement-resistent, da sie Komplement-inhibitorische Proteine stark überexprimieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, neue Strategien zu entwickeln, die die Effektivität Antikörper-basierter Tumortherapien verbessern. Für die vorliegende Dissertation wurde eine Mutation in der Fc-Region von EGFR-gerichteten IgG1-Antikörpern eingefügt, mit dem Ziel die Interaktion zweier Fc-Teile und somit die Kapazität zur Hexamerisierung zu verstärken. Die neue Antikörper-Plattform wurde mit bereits etablierten Verfahren zur Verstärkung der Komplement-vermittelten Zytotoxizität verglichen. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verstärkung der Fc-Fc-Interaktion unterschiedlichen Antikörpern, die sonst keine Komplementaktivierung vermitteln können, eine starke Aktivierung des Komplementsystems ermöglicht. Alternative Strategien arbeiten dagegen mit der Verstärkung der Affinität zu C1q. Das selektive Verstärken der C1q-Affinität war dem Verstärken der Avidität durch Stärkung der Fc-Fc-Interaktion unterlegen, was sich besonders bei niedrigen Antigen-Expressionsniveaus zeigte. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen das Verstärken der Fc-Fc-Interaktion als vielversprechende Option zur Verbesserung Komplement-vermittelter Zytotoxizität auf und sind ein Schritt auf dem Weg zu einem tieferen Verständnis der Wirkweise von Antikörpern in der Tumortherapie.

10 Literaturverzeichnis

- Bannerji, R., Kitada, S., Flinn, I. W., Pearson, M., Young, D., Reed, J. C., Byrd, J. C. (2003):** Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21, 1466-1471
- Beurskens, F. J., Lindorfer, M. A., Farooqui, M., Beum, P. V., Engelberts, P., Mackus, W. J., Parren, P. W., Wiestner, A., Taylor, R. P. (2012):** Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *Journal of Immunology*, 188, 3532-3541
- Bokemeyer, C., Kohne, C., Rougier, P. (2012):** Addition of Cetuximab to chemotherapy (CT) as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European Journal of Cancer*, 48, 1466-1475
- Bologna, L., Gotti, E., Da Roit, F., Intermesoli, T., Rambaldi, A., Introna, M., Golay, J. (2013):** Ofatumumab is more efficient than rituximab in lysing B chronic lymphocytic leukemia cells in whole blood and in combination with chemotherapy. *Journal of Immunology*, 190, 231-239
- Borsos, T., Rapp, H. J. (1965):** Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science*, 150, 505-506
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daeron, M. (2009):** Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113, 3716-3725
- 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 Fc γ RIIIa gene. *Blood*, 99, 754-758
- Clark, M. R. (1997):** IgG effector mechanisms. *Chemical Immunology*, 65, 88-110
- Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T., Miller, J. S. (1999):** Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology*, 27, 1533-1541
- Czajkowsky, D. M., Shao, Z. (2009):** The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 14960-14965
- de Jong, R. N., Beurskens, F. J., Verploegen, S., Strumane, K., van Kampen, M. D., Voorhorst, M., Horstman, W., Engelberts, P. J., Oostindie, S. C., Wang, G., Heck, A. J., Schuurman, J., Parren, P. W. (2016):** A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface. *PLoS Biology*, 14, e1002344
- Dechant, M., Weisner, W., Berger, S., Peipp, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Bleeker, W. K., Parren, P. W., van de Winkel, J. G., Valerius, T. (2008):** Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Research*, 68, 4998-5003

- DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M., Wells, J. A. (2000):** Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science*, 287, 1279-1283
- Derer, S., Bauer, P., Lohse, S., Scheel, A. H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M., Valerius, T. (2012):** Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *Journal of Immunology*, 189, 5230-5239
- Derer, S., Cossham, M., Rosner, T., Kellner, C., Beurskens, F. J., Schwanbeck, R., Lohse, S., Sina, C., Peipp, M., Valerius, T. (2015):** A complement-optimized EGFR antibody improves cytotoxic functions of polymorphonuclear cells against tumor cells. *Journal of Immunology*, 195, 5077-5087
- Derer, S., Lohse, S., Valerius, T. (2013):** EGFR expression levels affect the mode of action of EGFR-targeting monoclonal antibodies. *Oncoimmunology*, 2, e24052
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., Golay, J. (2003):** Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of Immunology*, 171, 1581-1587
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., Bardelli, A. (2008):** Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 5705-5712
- Diebold, C. A., Beurskens, F. J., de Jong, R. N., Koning, R. I., Strumane, K., Lindorfer, M. A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A. J., van de Winkel, J. G., Wilson, I. A., Koster, A. J., Taylor, R. P., Saphire, E. O., Burton, D. R., Schuurman, J., Gros, P., Parren, P. W. (2014):** Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 343, 1260-1263
- Duncan, A. R., Winter, G. (1988):** The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332, 738-740
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., Kirschfink, M. (2003):** Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol*, 40, 109-123
- Frattini, M., Saletti, P., Romagnani, E., Martin, V., Molinari, F., Ghisletta, M., Camponovo, A., Etienne, L. L., Cavalli, F., Mazzucchelli, L. (2007):** PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, 97, 1139-1145
- Gelderman, K. A., Blok, V. T., Fleuren, G. J., Gorter, A. (2002):** The inhibitory effect of CD46, CD55, and CD59 on complement activation after immunotherapeutic treatment of cervical carcinoma cells with monoclonal antibodies or bispecific monoclonal antibodies. *Lab Invest*, 82, 483-493
- Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S., Taylor, R. P. (2007):** Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*, 44, 3823-3837
- Hakulinen, J., Meri, S. (1998):** Complement-mediated killing of microtumors in vitro. *The American Journal of Pathology*, 153, 845-855
- Harris, C. L., Kan, K. S., Stevenson, G. T., Morgan, B. P. (1997):** Tumour cell killing using chemically engineered antibody constructs specific for tumour cells and the complement inhibitor CD59. *Clin. Exp. Immunol.*, 107, 364-371
- Harris, R. C., Chung, E., Coffey, R. J. (2003):** EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*, 284, 2-13

- Hsu, Y. F., Ajona, D., Corrales, L., Lopez-Picazo, J. M., Gurrpide, A., Montuenga, L. M., Pio, R. (2010):** Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Molecular Cancer*, 9, 139
- Idusogie, E. E., Wong, P. Y., Presta, L. G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., Mulkerrin, M. G. (2001):** Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *Journal of Immunology*, 166, 2571-2575
- 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. *Journal of Immunological Methods*, 371, 122-133
- Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., Nishio, K. (2007):** Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Science*, 98, 1275-1280
- Krawczyk, P. A., Kowalski, D. M. (2014):** Genetic and immune factors underlying the efficacy of cetuximab and panitumumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *Contemporary Oncology*, 18, 7-16
- Lièvre, A., Bachet, J., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouche', O., Landi, B., Louvet, C., Andre', T., Bibeau, F., Diebold, M., Rougier, P., Ducreux, M., Tomasic, G., Emile, J., Penault-Llorca, F., Laurent-Puig, P. (2008):** KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 26,
- Löffler, G., Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L. (2014):** Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Lehrbuch. Berlin, Springer: Online-Ressource (XXIX, 1073 S.)
- Macor, P., Tripodo, C., Zorzet, S., Piovan, E., Bossi, F., Marzari, R., Amadori, A., Tedesco, F. (2007):** In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Research*, 67, 10556-10563
- Mamidi, S., Cinci, M., Hasmann, M., Fehring, V., Kirschfink, M. (2013):** Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol Oncol*, 7, 580-594
- Mendelsohn, J. (2002):** Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 1S-13S
- Mendelsohn, J., Baselga, J. (2006):** Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Seminars in Oncology*, 33, 369-385
- Meyer, S., Leusen, J. H., Boross, P. (2014):** Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *mAbs*, 6, 1133-1144
- Moore, G. L., Chen, H., Karki, S., Lazar, G. A. (2010):** Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs*, 2, 181-189
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C. A., Seidler, L., Ehrenstein, M. (2009):** *Janeway Immunologie*. 7, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg

- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., Niwa, R. (2008):** Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer research*, 68, 3863-3872
- Natsume, A., Niwa, R., Satoh, M. (2009):** Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Design, Development and Therapy*, 3, 7-16
- Nimmerjahn, F. (2013):** *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*. New York, NY, Springer New York: X, 294 p.
- Olive, M., Untawale, S., Coffey, R. J., Siciliano, M. J., Wildrick, D. M., Fritsche, H., Pathak, S., Cherry, L. M., Blick, M., Lointier, P., et al. (1993):** Characterization of the DiFi rectal carcinoma cell line derived from a familial adenomatous polyposis patient. *In vitro cellular & developmental biology : Journal of the Tissue Culture Association*, 29A, 239-248
- Overdijk, M. B., Verploegen, S., van den Brakel, J. H., Lammerts van Bueren, J. J., Vink, T., van de Winkel, J. G., Parren, P. W., Bleeker, W. K. (2011):** Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity plays a prominent role in inhibiting tumorigenesis, even of tumor cells insensitive to EGFR signaling inhibition. *Journal of Immunology*, 187, 3383-3390
- Ozanne, B., Richards, C. S., Hendler, F., Burns, D., Gusterson, B. (1986):** Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology*, 149, 9-14
- Peipp, M., Dechant, M., Valerius, T. (2008):** Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Current Opinion in Immunology*, 20, 436-443
- Rajasekaran, N., Chester, C., Yonezawa, A., Zhao, X., Kohrt, H. E. (2015):** Enhancement of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity: a new era in cancer treatment. *ImmunoTargets and Therapy*, 4, 91-100
- Rassow, J. (2008):** *Biochemie. 50 Tabellen. 2*, Thieme, Stuttgart
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J. D. (2010):** Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11, 785-797
- Rösner, T., Lohse, S., Peipp, M., Valerius, T., Derer, S. (2014):** Epidermal growth factor receptor targeting IgG3 triggers complement-mediated lysis of decay-accelerating factor expressing tumor cells through the alternative pathway amplification loop. *Journal of Immunology*, 193, 1485-1495
- Schlaeth, M., Berger, S., Derer, S., Klausz, K., Lohse, S., Dechant, M., Lazar, G. A., Schneider-Merck, T., Peipp, M., Valerius, T. (2010):** Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Science*, 101, 1080-1088
- Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S., Knochel, T., Ferguson, K. M. (2008):** Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell*, 13, 365-373
- Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Berger, S., Rossen, K., van Berkel, P. H., Derer, S., Beyer, T., Lohse, S., Bleeker, W. K., Peipp, M., Parren, P. W., van de Winkel, J. G., Valerius, T., Dechant, M. (2010):** Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *Journal of Immunology*, 184, 512-520

- Stewart, B. W., Wild, C. P. (2014):** World Cancer Report 2014. Geneva, World Health Organization: Online-Ressource (632 p).
- Tao, M. H., Canfield, S. M., Morrison, S. L. (1991):** The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the CH2 domain. *The Journal of Experimental Medicine*, 173, 1025-1028
- Taylor, R. P., Lindorfer, M. A. (2016):** Cytotoxic mechanisms of immunotherapy: Harnessing complement in the action of anti-tumor monoclonal antibodies. *Seminars in Immunology*, 28, 309-316
- Tempescul, A., Bagacean, C., Riou, C., Bendaoud, B., Hillion, S., Debant, M., Buors, C., Berthou, C., Renaudineau, Y. (2016):** Ofatumumab capacity to deplete B cells from chronic lymphocytic leukaemia is affected by C4 complement exhaustion. *European Journal of Haematology*, 96, 229-235
- Thatcher, N., Hirsch, F. R., Luft, A. V., Szczesna, A., Ciuleanu, T. E., Dediu, M., Ramlau, R., Galiulin, R. K., Balint, B., Losonczy, G., Kazarnowicz, A., Park, K., Schumann, C., Reck, M., Depenbrock, H., Nanda, S., Kruljac-Letunic, A., Kurek, R., Paz-Ares, L., Socinski, M. A. (2015):** Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 16, 763-774
- van Cutsem, E., Kohne, C., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., Rougier, P. (2009):** Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* , 360, 1408-1417
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T. (2014):** IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 520
- Wang, G., de Jong, R. N., van den Bremer, E. T., Beurskens, F. J., Labrijn, A. F., Ugurlar, D., Gros, P., Schuurman, J., Parren, P. W., Heck, A. J. (2016):** Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen. *Molecular Cell*, 63, 135-145
- Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S., Sondel, P. M. (2015):** NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6, 368
- Weiner, L. M., Murray, J. C., Shuptrine, C. W. (2012):** Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell*, 148, 1081-1084
- Xu, J., Murphy, S. L., Kochanek, K. D., Bastian, B. A. (2016):** Death: Final Data for 2013. *National Vital Statistics Reports*. 64.
- Yan, J., Allendorf, D. J., Li, B., Yan, R., Hansen, R., Donev, R. (2008):** The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol*, 632, 159-174
- Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., Misra, A. (2013):** Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*, 34, 8690-8707
- Zipfel, P. F., Skerka, C. (2009):** Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9, 729-740

11 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. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den _____ (Anna-Lina Tammen)

12 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Anna-Lina Tammen
Geburtsdatum 09. August
Geburtsort Hannover

Promotion

2014-2017 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Valerius, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel

Studium

Juni 2016 Approbation als Ärztin
2009 – 2016 Studium der Humanmedizin an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

Schulische Ausbildung

2005 – 2008 Gymnasium Lutherschule Hannover

13 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Professor Dr. med. Thomas Valerius für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. rer. nat. Stefanie Derer und PD Dr. habil. rer. nat. Ralf Schwanbeck für die Betreuung meiner Dissertation.

Darüber hinaus danke ich Dr. rer. nat. Thies Rösner für die geduldige Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der ersten Versuche und seine große Hilfsbereitschaft.

Professor Dr. rer. nat. Matthias Peipp danke ich für sein stets offenes Ohr und den wissenschaftlichen Austausch.

Meiner Mitdotorandin Anna Kretschmer danke ich für ihr Feedback und ihre Freundschaft.

Den Medizinisch-Technischen Laborassistentinnen Christyn Wildgrube und Yasmin Claußen danke ich von Herzen für das freundliche Arbeitsklima, ihr Organisationstalent und die Unterstützung im Laboralltag.

Ferner danke ich meiner Familie für ihr uneingeschränktes Vertrauen und ihre Unterstützung, ohne die das Studium und die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

14 Veröffentlichungen

Annalina Tammen, Stefanie Derer, Ralf Schwanbeck, Thies Rösner, Anna Kretschmer, Frank J. Beurskens, Janine Schuurman, Paul W.H.I. Parren, Thomas Valerius. Monoclonal antibodies against epidermal Growth factor receptor acquire ability to kill tumor cells through complement activation by mutations that selectively facilitate the hexamerization of IgG on opsonized cells. **Journal of Immunology** **2017**. (DOI: 10.4049/jimmunol.1601268)

Annalina Tammen, Frank J. Beurskens, Stefanie Derer, Ralf Schwanbeck, Paul W.H.I. Parren, Janine Schuurman, Thomas Valerius. Potent complement-dependent cytotoxicity of tumor cells by target bound hexamerization of EGFR antibodies. **AACR** **2016**, Cancer Res 2016; 76(14 Suppl): Abstract nr 578. (DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-578)

Annalina Tammen, Frank J. Beurskens, Stefanie Derer, Ralf Schwanbeck, Janine Schuurman, Paul W.H.I. Parren, Thomas Valerius. Hexamerization of anti-EGFR antibodies induces potent complement-dependent cytotoxicity on tumor cells. **DGHO** **2015**. Oncol Res Treat 2015;38 (suppl 5) :232 (DOI:10.1159/000439070)

Frank J. Beurskens, Stefanie Derer, **Annalina Tammen**, Janine Schuurman, Paul W.H.I. Parren, Thomas Valerius. Hexamerization of anti-EGFR antibodies induces potent complement-dependent cytotoxicity on tumor cells. **EMCHD** **2015**. Molecular Immunology 2015; 67 (1), 119-198. (DOI: 10.1016/j.molimm.2015.03.013)