

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Leiter: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

**Untersuchungen zu direkten und indirekten
Effektormechanismen des
Anti-ICAM-1-Antikörpers MSH-TP15 beim Multiplen
Myelom**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Michael Cieker

aus Neustadt am Rübenberge

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Daniela Wesch, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.07.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roeder

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. B-Zell Lymphome	1
1.2. MGUS und Smoldering Myeloma	1
1.3. Multiples Myelom	1
1.4. Therapie des Multiplen Myeloms	2
1.4.1. Monoklonale Antikörper in der Therapie des Myeloms	4
1.5. Aufbau und Wirkmechanismen von IgG1-Antikörpern.....	5
1.6. Direkte und indirekte Wirkmechanismen von IgG1-Antikörpern.....	7
1.6.1. Direkte Wirkmechanismen.....	7
1.6.2. Indirekte Wirkmechanismen	8
1.7. Fc-Engineering-Strategien zur Steigerung des zytotoxischen Potentials	9
1.7.1 Protein-Engineering	10
1.7.2. Glyco-Engineering.....	11
1.8. Bedeutung von ICAM-1/CD54 in der Tumorthherapie	12
1.9. Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Zelllinien	15
2.1.2. Zellkulturmedium.....	16
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.4. Puffer und Lösungen	17
2.1.5. Vektoren.....	18
2.1.6. Antikörper.....	18
2.1.7. Kits.....	19
2.1.8. Geräte und Materialien.....	19
2.1.8.1. Verwendete Geräte.....	19
2.1.8.2. Verwendete Materialien	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur.....	21
2.2.2. Expression der MSH-TP15 Antikörper durch Ca ₂ PO ₄ -Transfektion.....	21
2.2.3. Reinigung der MSH-TP15 Antikörper durch Affinitätschromatographie	21
2.2.4. SDS-PAGE und Coomassie Färbung.....	22

2.2.5. Bradford-Assay.....	22
2.2.6. Durchflusszytometrie.....	22
2.2.7. Proliferationsinhibitionsversuche.....	23
2.2.8. Zytotoxizitätsversuche.....	23
2.2.8.1. Humane Effektorzellen und Serum-Isolation aus Vollblut gesunder Spender.....	24
2.2.8.2. ⁵¹ Cr-Freisetzungsversuche.....	24
2.2.9. Statistische Analysen und Graphische Darstellungen.....	25
3. Ergebnisse.....	25
3.1. Varianten des MSH-TP15, ihre Expression und Reinigung.....	25
3.2. Bindungseigenschaften der MSH-TP15-Antikörpervarianten.....	29
3.3. Untersuchung zu antiproliferativen Effekten durch MSH-TP15 bei Myelomzellen.....	32
3.4. Untersuchungen zu Fc-vermittelten Effektormechanismen der MSH-TP15-Antikörpervarianten.....	32
4. Diskussion.....	38
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Danksagung.....	57
8. Erklärung.....	58
9. Publikationen.....	59

Abkürzungsverzeichnis

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
7AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASCT	<i>autologous stem cell transplantation</i>
BCMA	<i>B-Cell maturation antigen</i>
BR	<i>basal release</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Bsr GI:	Restriktionstelle für die <i>Bacillus stearothermophilus</i> I Restriktionsendonuklease
bsscFv	bispezifisches <i>singel-chain fragment variable</i>
bzw.	beziehungsweise
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CCR4	C-C Chemokin Rezeptor 4
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
C-Kappa	konstante kappa Kette
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
Col	Colicin
cpm	<i>counts per minute</i>
CRS	<i>cytokine-release syndrome</i>
DLBCL	Diffus Großzelliges B-Zelllymphom
DMJ	1-Deoxymannojirimicin
DPBS	<i>Dulbeccos's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	<i>half maximal effective concentration</i>
Eco RV:	Restriktionstelle für die Restriktionsendonuklease V und I aus den <i>E-coli</i> Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLC	<i>free light chains</i>
ggf.	gegebenenfalls
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
h	Stunde

HAGA	<i>human antiglobuline antibody response</i>
HAMA	Human-Anti-Maus-Antikörpern
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor</i>
Hygro	Hygromycinresistenz
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
Ig	Immunoglobulin
IL-6	Interleukin-6
IMiDs	<i>immunomodulatory imide drugs</i>
KpnI:	Restriktionstelle für die <i>Klebsiela pneumoniae</i> I Restriktionsendonuklease
LC/HC	leichte/schwere Ketten von Immunglobulinen
LFA	<i>Leukocyte Function Associated Antigen</i>
LRC	<i>Leucocyte Reduction Chambers</i>
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MAC-1	<i>Macrophage 1-Antigen</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MDE	Myelom-definierendes Ereignis
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Multiplres Myelom
MR	<i>maximal release</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
n.m.	nicht möglich
Nhe	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>
NheI:	Restriktionstelle für die <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> I Restriktionsendonuklease
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK	natürliche Killerzellen
PBA	<i>protein blocking agent</i>
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	potentia hydrogenii
PI	Protease-Inhibitoren
PmeI:	Restriktionstelle für die <i>Pseudomonas mendocina</i> I Restriktionsendonuklease
Poly A	Polyadenylierungsstelle
PpuMI:	Restriktionstelle für die <i>Pseudomonas putida</i> I Restriktionsendonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	<i>singel-chain fragment variable</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLAM	<i>signaling lymphocytic activation molecule</i>
SM	<i>Smoldering Myeloma</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
sog.	sogenannt

SV40	<i>simian vacuolating Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitoren
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VH/VL	variable Regionen der schweren/leichten Kette von Immunglobulinen
XhoI:	Restriktionstelle für die <i>Xanthomonas Holcicola I</i> Restriktionsendonuklease

1. Einleitung

1.1. B-Zell Lymphome

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Erkrankung der Antikörper-produzierenden Plasmazellen und wird zur Gruppe der lymphoiden B-Zell-Neoplasien gezählt. Unterschieden werden dabei die Gruppe der Lymphome mit Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen, die sog. Hodgkin-Lymphome sowie Lymphome ohne Hodgkin-Zellen, die sog. Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die NHL können entweder B-lymphozytären oder T-lymphozytären Ursprunges sein. Hierbei stellt die B-lymphozytäre Gruppe mit über 90% der Lymphome die häufigste Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome dar, zu denen auch das MM gehört (Ansell und Armitage 2005).

1.2. MGUS und Smoldering Myeloma

Liegen noch keine Schädigungen der Endorgane vor, finden sich aber schon Auffälligkeiten im Serum, so spricht man von Vorstufen des MM: diese sind die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das Smoldering Myeloma (SM). Beim MGUS ist bei Betroffenen die Produktion von monoklonalen Immunglobulinen im Serum bis zu 30 g/l gesteigert und der Plasmazellanteil im Knochenmark um bis zu 10% im Vergleich zu 5% bei gesunden Menschen erhöht. Von diesen Patienten entwickelt ca. 1% im Laufe eines Jahres ein MM. Übersteigt die Produktion der monoklonalen Immunglobuline im Serum 30 g/l und beträgt die Zahl der Plasmazellen im Knochenmark mehr als 10% der Gesamtzellpopulation im Knochenmark, so liegt definitionsgemäß ein SM vor (Rajkumar et al. 2014). Beim SM liegt das Risiko einer Konversion zu einem MM in den ersten 5 Jahren bei 10% pro Jahr (Kyle et al. 2010). Aufgrund fehlender Möglichkeiten, eine Progression der Erkrankung eindeutig vorherzusagen, werden bislang Patienten mit einem MGUS oder SM nur regelmäßigen Kontrollen unterzogen. Auf die Einleitung einer medikamentösen Behandlung wird zunächst wegen der potenziellen Nebenwirkungen einer Therapie verzichtet.

1.3. Multiples Myelom

Das MM ist eine klonale Plasmazell-Neoplasie, die über 10% aller hämato-onkologischen Erkrankungen bildet. Die Inzidenz liegt bei 4-6 Neuerkrankungen/100.000 Menschen pro Jahr (Howlader et al. 2018). Die mediane Gesamtüberlebensdauer ist in den letzten 2 Jahrzehnten aufgrund früherer Diagnosestellung sowie den neuen Therapieoptionen von 2 Jahren (bei Stellung der Diagnose vor 2001) über 4,6 Jahre (Stellung der Diagnose zwischen 2001-2005) bis auf 6 Jahre (Stellung der Diagnose zwischen 2006-2010) gestiegen, wobei die Prognose von diversen Einflussfaktoren abhängt, wie z.B. dem

Tumorstadium, dem Alter des Patienten, sowie bestehenden Nebenerkrankungen (Rajkumar 2016; Kumar et al. 2014). Bei den Patienten kommt es zu einer Infiltration des Knochenmarks mit klonalen Plasmazellen, welche Immunoglobuline (Ig), meist vom Typ IgA, IgG oder Leichtketten vom κ - oder λ -Typ produzieren. Durch ihre weitere Vermehrung wird die physiologische Blutbildung verdrängt und es kommt zu Endorganschädigung (CRAB-Kriterien). Eine strikt auf das Knochenmark begrenzte Manifestation von anomalen Plasmazellen wird als solitäres Plasmozytom bezeichnet.

Zytogenetische Studien zeigen, dass ungefähr 40% der MM Erkrankungen eine Trisomie und 30% eine IgH-Translokation zeigen (Rajan und Rajkumar 2015). In 15% der Fälle treten beide Ereignisse kombiniert auf (Kumar et al. 2012; Rajan und Rajkumar 2015). Anschließend wandern diese mutierten B-Zellen in das Knochenmark, wo sie ihre Entwicklung zu langlebigen Plasmazellen abschließen. Zellzykluskontrollen sowie DNA-Reparaturmechanismen nehmen ab, weitere genetische Abberationen, z.B. Deletionen oder Translokationen, erhöhen die genetische Instabilität und führen vom MGUS über SM zum MM mit einer hohen klonalen Heterogenität der Erkrankung (Bianchi und Anderson 2014). Treten die Tumorzellen auch im peripheren Blut mit einem Anteil von über 20% auf, so wird dieses Manifestationsstadium Plasmazelleukämie genannt (Mina et al. 2017). Werden andere Organe als das Knochenmark infiltriert spricht man von einem extramedullären Myelom (Bladé et al. 2011).

Um die Diagnose MM zu stellen, muss nach der *International Myeloma Working Group* die monoklonale Plasmazell-Population im Knochenmark über 10% oder ein extramedulläres Plasmozytom vorliegen zusammen mit einem oder mehreren CRAB-Kriterien und mindestens einem Myelom-definierenden Ereignis (MDE). Zu diesen MDE gehören ein über 60%iger Anteil an klonalen Plasmazellen im Knochenmark, mehr als eine nachgewiesene fokale Knochenläsion im MRT und eine FLC-Ratio von ≥ 100 (Rajkumar et al. 2014).

1.4. Therapie des Multiplen Myeloms

Im Krankheitsverlauf gibt es mehrere Stufen bei der MM-Therapie. Die Initialtherapie (Erstbehandlung), die Stammzelltransplantation für geeignete Patienten, die Erhaltungstherapie und die Rezidivtherapie (Rajkumar, S. V., and Kumar, S. 2016). Bei der Erstbehandlung muss zunächst die autologe Stammzelltransplantation (ASCT) als Option bedacht werden. Geeignete Patienten für eine ASCT sind Menschen unter 75 Jahren mit einem guten Allgemeinzustand und wenig Komorbiditäten (Rajkumar 2016). Bei der ASCT werden zunächst Stammzellen des Patienten gewonnen und anschließend erfolgt eine Hochdosis-Chemotherapie, um die Tumorzellen zu zerstören, wobei aber auch die gesunden Zellen des Knochenmarks zerstört werden. Diese Patienten erhalten heute immer öfter eine Induktionstherapie mit Bortezomib-Lenalidomid-Dexamethason (VRD) oder Bortezomib-Cyclophosphamid-Dexamethason (VCD) anstelle von Hochdosis-Melphalan. Danach werden die eingefrorenen

hämatopoetischen Stammzellen transplantiert und das Knochenmark wiederhergestellt. Diese Triplet-Therapien, wie z.B. VCD und VRD, zeigen im Gegensatz zur konventionellen zytostatischen Chemotherapie eine deutliche Verbesserung der Ansprechrate und des Überlebens (Rajkumar 2016). Patienten, die über 70-75 Jahre alt sind und an Begleiterkrankungen leiden eignen sich nicht für eine ASCT. Die zur Zeit einzige potentiell kurative Myelomtherapie stellt die allogene Stammzelltransplantation dar, welche jedoch mit hoher Mortalität und Morbidität wie der *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD) einhergehen kann (Lokhorst et al. 2010).

Trotz initial besserer Ansprechraten der Patienten mit ASCT, kommt es bei fast allen Patienten zu Rezidiven der Erkrankung, hauptsächlich wegen bestehender MM-Residuen, sodass eine Konsolidierungs- (unter 1 Jahr) oder Erhaltungstherapie (nach 1 Jahr) indiziert wird (Sengsayadeth et al. 2017). Hierbei kann nach der ersten ASCT eine zweite autologe Stammzelltransplantation (Tandem-Transplantation) die Prognose der Patienten sowie die Wahrscheinlichkeit, eine Remission zu erreichen, verbessern (Byrne et al. 2014). Oft werden für Konsolidierungs-, Erhaltungs- und Rezidivtherapie Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen kombiniert wie immunmodulatorische Substanzen (IMiDs), Proteasominhibitoren (PI), Steroide (z.B. Dexamethason), Histondeacetylasehemmer (z.B. Panobinostat) und monoklonale Antikörper (mAk) (Rajkumar 2016). Klassische Chemotherapeutika wie Alkylanzien (z.B. Melphalan), Anthrazykline (z.B. Doxorubicin), Alkaloide (z.B. Vincristin) oder Glukokortikoide/Steroide (z.B. Dexamethason) waren über Jahrzehnte die einzigen Therapieoptionen bei der Behandlung des Myeloms und werden heute noch oft mit neueren Substanzen (IMiDs, PI's und mAk) kombiniert.

Als erstes IMiD wurde bereits 1997 Thalidomid eingeführt. Das Medikament sorgt für eine Hemmung der Angiogenese und erzeugt dadurch eine Unterversorgung der Tumorherde. Zudem wirkt es als Immunmodulator und hat eine Vielzahl weiterer Funktionen (Harusseau 2006). Seine Derivate Lenalidomid und Pomalidomid, die die Klasse der IMiDs heute bilden, wurden 2005 und 2013 auf den Markt gebracht und wirken auch bei Thalidomid-refraktären Patienten (Quach et al. 2010). 2003 wurde der erste PI Bortezomib zugelassen. Dieser inhibiert reversibel das 26S Proteasom und hemmt somit den Ubiquitin-Proteasomweg, was zur Akkumulation von Proteinen in den Tumorzellen und letztlich zur Apoptose der Zellen führt (Chen et al. 2011). Ähnlich wirkt Carfilzomib, ebenfalls ein PI, welcher 2012 zugelassen wurde und deutlich weniger neurologische Nebenwirkungen als Bortezomib zeigt (Muchtar et al. 2016). Der nicht-selektive Pan-deacetylase Inhibitor Panobinostat ist seit 2015 eine weitere Therapiemöglichkeit für refraktäre und rezidierte Patienten (Laubach et al. 2015). Im selben Jahr wurden dann in schneller Reihenfolge drei weitere Medikamente für die Behandlung von Tumorrezidiven zugelassen: Ixazomib, wie Carfilzomib ein *second-generation* PI, und die mAk Daratumumab und Elotuzumab. Ixazomib, der erste orale PI, wird bei der Initialtherapie sowie bei refraktären und rezidierten

Patienten angewendet (Moreau et al. 2015). Auf die Bedeutung der mAk Daratumumab und Elotuzumab wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.4.1. Monoklonale Antikörper in der Therapie des Myeloms

Mit der Etablierung der Hybridom-Technologie durch Köhler und Milstein 1975 wurde der Grundstein für die Produktion von mAk für die therapeutische Anwendung gelegt (Köhler und Milstein 1975). Anfänglich wurden die so hergestellten Mausantikörper für die Humantherapie benutzt, was zu Immunreaktionen und der Bildung von Human-Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) führte. In den folgenden Jahrzehnten wurden Methoden entwickelt, um chimäre und humane Antikörper zu produzieren und dieses Problem zu lösen. Dies führte zur Entwicklung von effektiven Antikörpertherapien für die Behandlung von Krebs- und Autoimmunerkrankungen. 30 mAk sind zur Zeit für die Tumortherapie zugelassen, wie z.B. der CD20 Antikörper Rituximab oder der gegen HER2/neu-gerichtete Antikörper Trastuzumab (International Immunogenetics Database (IMGT) 2018). Rituximab findet seine Anwendung u.a. für die Behandlung von rezidierten oder fortgeschrittenen Stadien von NHL und Trastuzumab für die Behandlung des Mammakarzinoms (Slamon et al. 2001; Maloney et al. 1997).

Die ersten zugelassenen mAk für die MM-Therapie waren Daratumumab und Elotuzumab. Daratumumab ist ein humaner CD38 IgG1κ Antikörper, welcher über Komplement-abhängige Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, CDC), Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) seine Wirkung vermittelt sowie direkt die CD38 Enzymaktivität verändert und Apoptose der Tumorzellen induzieren kann (de Weers et al. 2011). Das Antigen CD38 ist ein multifunktionales Glykoprotein, welches in nicht entarteten Zellen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. NK-Zellen, B-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten exprimiert wird, aber auch auf der Oberfläche von Zellen in malignen hämatologischen Erkrankungen, die aus diesen Zellpopulationen entstehen (van de Donk et al. 2016). Der humanisierte IgG1κ Antikörper Elotuzumab weist einen dualen Wirkmechanismus auf. Zum einen bindet er direkt an das Oberflächenglykoprotein *signaling lymphocytic activation molecule family member 7* (SLAMF7/CS1/CD319), welches in hohem Maße u.a. auf Myelomzellen, aber auch auf Monozyten, Subgruppen von NK-Zellen und T-Lymphozyten auf hämatologischen Zellen exprimiert wird (Boles und Mathew 2001). SLAMF7 fungiert als aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen und die direkte Bindung von Elotuzumab an SLAMF7 sowie indirekt über dessen Fc-Teil an FcγRIIIa bei gleichzeitiger Bindung an SLAMF7 auf Myelomzellen führt zur NK-Zell-Aktivierung (Collins et al. 2013; Lonial et al. 2015). Außerdem wird die Möglichkeit, die Adhäsion von MM-Zellen an Stromazellen des Knochenmarkes, welche eine protektive Wirkung auf die Tumorzellen haben, durch Behandlung mit Elotuzumab zu hemmen, diskutiert (Tai et al. 2008).

Daratumumab und Elotuzumab finden ihre Anwendung aktuell bei vorbehandelten, nicht auf herkömmliche Chemotherapie ansprechende Patienten, entweder in Kombinationstherapien oder, im Fall von Daratumumab, auch als Monotherapie (Dimopoulos et al. 2016; Palumbo et al. 2016; Lonial et al. 2016; Lonial et al. 2015). In der POLLUX-Studie lag das progressionsfreie Überleben nach 12 Monaten bei 83,2% der Patienten, die Daratumumab in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason erhalten hatten, mit einer Gesamtansprechrates von 92,9%, im Vergleich zum progressionsfreien Überleben von 60,1% der Patienten und einer Gesamtansprechrates von 76,4% in der Kontrollgruppe ohne Daratumumab (Dimopoulos et al. 2016). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die CASTOR-Studie, wo Daratumumab in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason untersucht worden ist. Das progressionsfreie Überleben nach 12 Monaten lag bei der mit Daratumumab behandelten Patientengruppe bei 60,7% im Vergleich zu der Kontrollgruppe (ohne Daratumumab) mit 26,9%. Die Gesamtansprechrates war auch mit 82,9% höher als bei der Kontrollgruppe, wo sie bei 63,2% lag (Palumbo et al. 2016). Auf Grundlage der überzeugenden Daten der POLLUX-, CASTOR- und SIRIUS-Studien erhielt Daratumumab Ende 2016/Anfang 2017 die Zulassung der amerikanischen (FDA) und europäischen Behörden (EMA) für die Therapie von refraktären und rezidierten Patienten. Im Mai 2018 wurde Daratumumab von der FDA auch für die Erstlinienbehandlung von Myelompatienten zugelassen (Mateos et al. 2017). In der ELOQUENT-2 Studie zeigte Elotuzumab in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason eine Gesamtansprechrates von 79% im Vergleich zu 66% bei der Kombination ohne Antikörper sowie ein progressionsfreies Überleben von 19,4 im Gegensatz zu 14,9 Monaten, anhand welcher der mAk seine Zulassung als Kombinationspräparat für refraktäre und rezidierte Patienten im selben Zeitraum wie Daratumumab erhielt (Lonial et al. 2015).

Dank dieser neuen Therapieoptionen steigt das mediane Überleben, jedoch ist das MM nach wie vor in den meisten Fällen nicht heilbar und insbesondere rezidivierende oder therapierefraktäre Patienten haben eine schlechte Prognose (Rajkumar 2016). Zur Zeit befinden sich viele mAk, die gegen verschiedene Zielstrukturen gerichtet sind, sowie Antikörper-basierte Moleküle wie z.B. *Antibody Drug Conjugates*, bispezifische Antikörper oder *chimeric antigen receptor (CAR) T cells* in der Entwicklung, um die Therapieoptionen zu erweitern und das Überleben von Myelompatienten weiter zu verbessern (Köhler et al. 2018; Kumar 2017; Rajkumar 2016).

1.5. Aufbau und Wirkmechanismen von IgG1-Antikörpern

Insgesamt sind fünf unterschiedliche Isotypen von Antikörpern beim Menschen beschrieben, wobei IgG-Antikörper mit 75% die häufigste Antikörperklasse bilden (Kaufmann 2014). Sie zählen zu den Glykoproteinen und bestehen aus zwei leichten Ketten (*light chains*, LC) und zwei schweren Ketten (*heavy chains*, HC, Abb. 1A). Der Aufbau der schweren Ketten legt den Isotyp sowie den Subtyp eines Antikörpers fest. Es gibt zwei Gruppen von leichten Ketten, κ und λ , welche in allen Subtypen und Isotypen in

einen Verhältnis von 60:40 beim Menschen vorkommen (Kaufmann 2014). IgG-Antikörper gehören zu der Sekundärantwort des Immunsystems und können über ihre Bindung an Fcγ-Rezeptoren (FcγR) Zellen des Immunsystems, wie NK-Zellen oder Phagozyten, rekrutieren und so Effektormechanismen wie ADCC und ADCP vermitteln. Zudem können die Subtypen IgG1 und IgG3 durch die Bindung von C1q an die CH2-Domäne wirksam das Komplementsystem aktivieren. Über das *fragment antigen binding* (Fab) mit den *complementarity-determining regions* (CDRs) als Bestandteil der V-Regionen kommt es zur Bindung des Antigens. Das *fragment crystallisable* (Fc) wird durch die CH2- und CH3-Domänen gebildet, welche mit den CH1-Domänen der Fab-Fragmente durch die Hinge-Regionen verbunden sind (Vidarsson et al. 2014; Kaufmann 2014).

Bei den FcγR unterscheidet man verschiedene Untergruppen, nämlich den hochaffinen FcγRI (CD64), die niedrig-affinen FcγRIIa und FcγRIIb (CD32a und b) sowie FcγRIIIa und b (CD16a und b). Hierbei sind beim Menschen die Fc-Rezeptoren FcγRI, FcγRIIa sowie FcγRIIIa aktivierende Rezeptoren und der FcγRIIb der einzige inhibierende Rezeptor (Nimmerjahn und Ravetch 2008). Nicht jede Immunzelle besitzt alle FcγR. So exprimieren z.B. NK-Zellen in der Regel nur den FcγRIIIa, wohingegen der FcγRIIb exklusiv auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist. Durch die Bindung von IgG-Antikörpern an FcγRIa oder FcγRIIIa können u.a. Makrophagen, neutrophile und basophile Granulozyten sowie NK-Zellen aktiviert werden (Weiner et al. 2010). In prä-klinischen Studien und an Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Fc-Rezeptoren wichtig für die therapeutische Aktivität von IgG-Antikörpern sind und dass eine höhere Affinität der Antikörper zu den aktivierenden (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, b) und eine niedrigere Affinität zu den inhibierenden (FcγRIIb) Fc-Rezeptoren mit einer gesteigerten Tumorzelllyse einher geht (Lazar et al. 2006; Nimmerjahn und Ravetch 2005; Clynes et al. 2000). Die Struktur der Fc-Rezeptoren bestimmt dabei maßgeblich das Bindungsverhalten der IgG1-Antikörper. *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des FcγRIIIa führen zu stärkerer oder schwächerer Bindung von humanen IgG1-Antikörpern. So wurde beispielsweise die Aminosäure Valin an Position 158 (FcγRIIIa-158V) mit einer höheren Affinität für humane IgG1 als Phenylalanin (FcγRIIIa-158F) und somit mit einer stärkeren ADCC-Aktivität und einem besseren klinischen Ansprechen von therapeutisch applizierten IgG-Antikörpern wie Rituximab assoziiert (Cartron 2002; Koene et al. 1997). Auch bei anderen FcγR sind Polymorphismen bekannt (FcγRIIIB-NA1/NA2, FcγRIIB-231I/T, FcγRIIA-131H/R), welche die Affinität von IgG-Antikörpern beeinflussen (Nimmerjahn und Ravetch 2008; Xiaoli et al. 2003; Haas et al. 1995; Warmerdam et al. 1991).

Durch rekombinante DNA-Techniken können zusätzlich zu ganzen Antikörpern auch Antikörperderivate mit definierten Eigenschaften hergestellt werden. Ein Derivat, welches nur aus den VH- und VL-Domänen eines Antikörpers besteht, wobei diese mit einem Linker verbunden sind, wird *single-chain fragment variable* (scFv) genannt (Abb. 1B). Aus monovalenten Molekülen wie einem Fab oder einem

scFv können bi-, tri-, oder multispezifische Derivate oder Fusionsproteine, z.B. scFv-Fc Proteine, in denen scFv-Fragmente mit einer Fc-Region (Hinge-CH2-CH3) fusioniert sind, hergestellt werden (Abb. 1B). Dadurch können solche Moleküle analog zu IgG1-Antikörpern Mechanismen wie CDC und ADCC vermitteln, wobei gleichzeitig ein geringes Molekulargewicht und somit eine höhere Tumorpeneetration erzielt werden kann (Kontermann und Brinkmann 2015; Nelson 2009). Da Antikörperderivate ohne Fc-Teil nicht mehr an den neonatalen Fc Rezeptor (FcRn) binden können haben sie auch eine deutlich kürzere Halbwertszeit von nur einigen Stunden im Blut. Ein klinisches Beispiel stellt der CD19xCD3 bispezifische Antikörper Blinatumumab dar, der kontinuierlich über eine Pumpe bei Philadelphia Chromosom-negativen Patienten mit refraktärer oder rezidivierender akuter lymphatischer Vorläufer Leukämie eingesetzt wird (Lee et al. 2016).

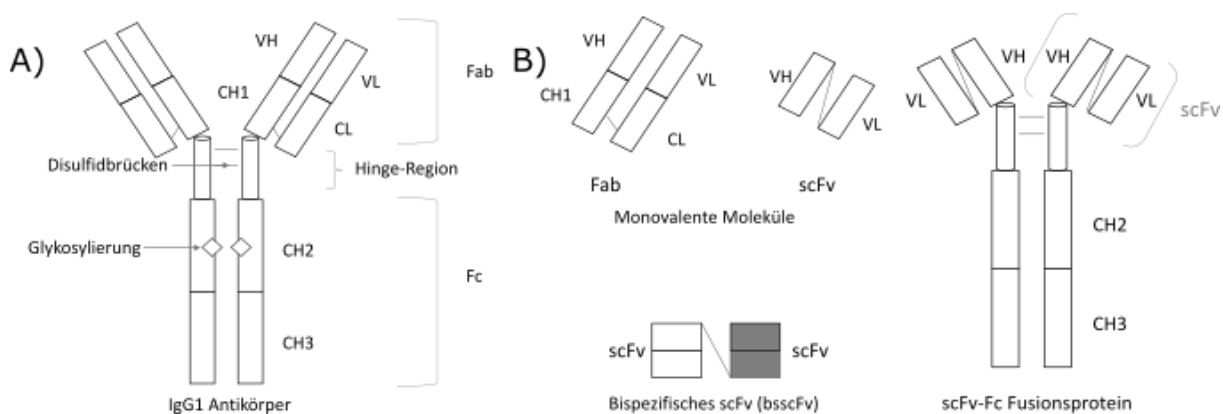


Abbildung 1: A) Aufbau eines IgG1 Moleküls. Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers mit Fab (*fragment antigen binding*) und Fc (*fragment crystallisable*). Die CH1 des Fab-Moleküls ist durch die Hinge-Region mit dem Fc-Teil verbunden. Das Fab weist CDRs auf und bindet über diese ans Antigen. Im Fc-Teil von IgG1-Antikörpern liegen Bindestellen für FcγR sowie C1q. **B) Verschiedene Antikörperderivate.** Schematische Darstellung von monovalenten Molekülen, bispezifischen scFv (bsscFv) und eines scFv-Fc Fusionsproteins. Das Fab-Molekül beinhaltet zwei konstante und zwei variable Domänen. Beim scFv sind nur noch die variablen VH- und VL-Domänen mit einem Linker verbunden, womit scFv, die kleinsten antigenbindenden Einheiten ausgehend von IgG-Antikörpern darstellen. Monovalente Moleküle können zur Produktion von bispezifischen Molekülen oder Fusionsproteinen verwendet werden.

1.6. Direkte und indirekte Wirkmechanismen von IgG1-Antikörpern

1.6.1. Direkte Wirkmechanismen

Antikörpervermittelte Zytolyse kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Allgemein werden direkte und indirekte Wirkmechanismen von Antikörpern unterschieden. Vermittelt werden diese Mechanismen durch die spezifische Bindung der Antikörper an ihre Zielstrukturen auf der Zelloberfläche (direkte Effekte) und durch Komponenten des Immunsystems (indirekte Effekte). Antigene können unterschiedliche Strukturen, wie z.B. Membranproteine, Zuckerstrukturen oder Enzyme auf

Zelloberflächen sein. Zu den direkten Wirkmechanismen von therapeutischen Antikörpern kann die Blockierung pathophysiologischer Signalwege von Tumorzellen, was z.B. zu Proliferationsinhibition führt, oder die Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege gezählt werden, was im programmierten Zelltod endet (Abb. 2A) (Weiner et al. 2012). In der Therapie des MM weisen die zwei Antikörper Daratumumab und Elotuzumab *in vitro* direkte Wirkmechanismen auf. Zum einen kann Daratumumab durch Fc-vermitteltes *Cross-Linking* auf der Oberfläche von Tumorzellen zum programmierten Zelltod führen. Zum anderen kann es die enzymatische Aktivität von CD38 modulieren (de Weers et al. 2011). Elotuzumab bindet an SLAMF7 auf der Oberfläche von NK-Zellen und kann diese so direkt aktivieren (Collins et al. 2013).

1.6.2. Indirekte Wirkmechanismen

Zu den indirekten Wirkmechanismen zählt z.B. die Aktivierung von Effektorzellen nach Bindung von IgG1-Antikörpern an deren aktivierende FcγR. Zu den Effektorzellen gehören Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen und NK-Zellen. Zu den stärksten Vermittlern von ADCC gehören die NK-Zellen, welche in der Regel nur den aktivierenden FcγRIIIa auf ihrer Oberfläche exprimieren. Sie haben insgesamt einen Anteil von bis zu 15% an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Menschen (Robertson und Ritz 1990). Es wurde beobachtet, dass niedrige NK-Zell-Aktivität im peripheren Blut mit einem höheren Risiko an Krebs zu erkranken vergesellschaftet ist (Imai et al. 2000). CD56-dim/CD16-positive NK-Zellen bilden 90% der NK-Zellen im peripheren Blut und können nach Aktivierung über den FcγRIIIa durch die Bindung eines IgG-Antikörpers u.a. Perforine, Granzyme und INF-γ freisetzen, so Tumorzellen lysieren und weitere Zellen des Immunsystems durch Freisetzung von Zytokinen rekrutieren (Abb. 2B) (Seidel et al. 2013; De Maria et al. 2010; Topham und Hewitt 2009). Im Gegensatz zu NK-Zellen exprimieren Makrophagen auf ihrer Oberfläche alle bekannten Fcγ-Rezeptortypen außer FcγRIIIb. Wenn IgG1-Antikörper, nach Bindung ihres Antigens auf der Tumorzelloberfläche, an die aktivierenden Rezeptoren FcγRI, FcγRIIa oder FcγRIIIa binden, können Makrophagen rekrutiert und ADCP von Tumorzellen eingeleitet werden (Abb. 2B) (Weiskopf und Weissman 2015; Nimmerjahn und Ravetch 2008). Bekannterweise können Polymorphismen der FcγR die Bindungsaffinität von Antikörpern beeinflussen. So zeigen Patienten mit homozygoter Expression von FcγRIIIa mit Valin an Position 158 (FcγRIIIa-158V) ein höheres Ansprechen auf eine Therapie mit IgG1-Antikörpern wie z.B. Rituximab und Elotuzumab im Gegensatz zu Patienten mit homozygoter Expression des FcγRIIIa-158F-Polymorphismus (Jakubowiak et al. 2016; Cartron 2002).

Eine weitere wichtige Möglichkeit der Zellyse wird durch das Komplementsystem vermittelt. Dieses kann über 3 Mechanismen aktiviert werden: den Lectinweg, den klassischen Weg und den alternativen Weg (Sarma und Ward 2010). Die Aktivierung durch IgG-Antikörper, also auch für die therapeutisch am häufigsten eingesetzten IgG1-Antikörper, verläuft hauptsächlich über den klassischen Weg. Dieser

kann durch Bindung von C1q an den Fc-Teil der Antikörper auf der Zelloberfläche initiiert werden. Am Ende der Komplementkaskade wird der sog. *membrane attack complex* (MAC) gebildet, der zur Lyse der Zielzelle führt (Abb. 2B). Zusätzlich werden durch die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a Effektorzellen in der Umgebung rekrutiert (Sarma und Ward 2010; Gelderman et al. 2004). Auch Daratumumab kann *in vitro* effizient CDC vermitteln (de Weers et al. 2011). Die Aktivierung des Komplementsystems durch therapeutische IgG1-Antikörper und der Einfluss von CDC auf die Wirksamkeit im Patienten sind bislang aber nicht eindeutig geklärt. Auch die Beteiligung bzw. der Anteil der anderen indirekten und direkten Effektorfunktionen für den Erfolg einer Antikörpertherapie sind noch immer Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Aufgrund dieser Befunde wird der Rekrutierung von Effektorzellen bzw. der Vermittlung von ADCC und ADCP eine wichtige Rolle in der Antikörpertherapie zugeschrieben.

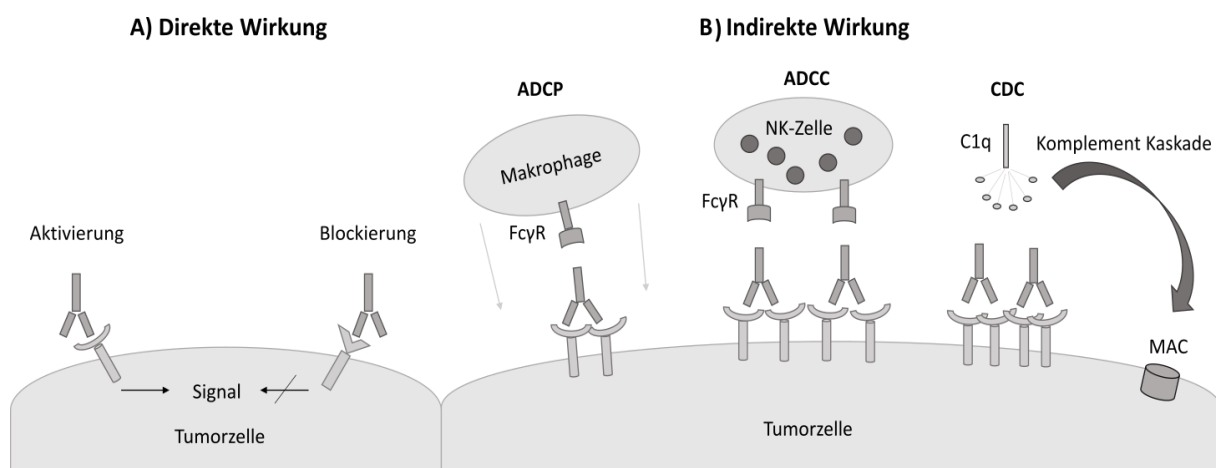


Abbildung 2: Wirkmechanismen therapeutischer IgG-Antikörper

A) Schematische Darstellung direkter Wirkmechanismen. Therapeutische IgG-Antikörper können u.a. pathophysiologische Signalwege von Tumorzellen blockieren oder pro-apoptotische Signalwege aktivieren. **B) Schematische Darstellung indirekter Wirkmechanismen.** Antikörper können über FcγR Effektorzellen rekrutieren und ADCP oder ADCC vermitteln. Durch die Bindung von C1q an den Fc-Teil kann das Komplementsystem aktiviert und CDC vermittelt werden. MAC: *membrane attack complex*. ADCP: *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, CDC: *complement-dependent cytotoxicity*.

1.7. Fc-Engineering-Strategien zur Steigerung des zytotoxischen Potentials von therapeutischen IgG1-Antikörpern

Monoklonale Antikörper haben in den letzten Jahren einen festen Platz in der Krebstherapie erlangt, wo sie die therapeutischen Auswahlmöglichkeiten vergrößern. Jedoch können bislang nicht alle Patienten von einer Antikörper-Therapie profitieren. Daher werden Strategien entwickelt, um Antikörper und deren therapeutische Effekte weiter zu optimieren. Aufgrund der wichtigen Rolle von Fcγ-positiven Zellen in der Antikörpertherapie und der Komplementaktivierung wurden unterschiedliche

Strategien wie das Protein-Engineering oder Glyco-Engineering entwickelt, um die Affinität von Antikörpern für aktivierende FcγR auf Immunzellen oder für C1q, das Initiator-molekül der klassischen Komplementkaskade, zu erhöhen (Kellner et al. 2014).

1.7.1 Protein-Engineering

Lazar und Kollegen identifizierten kritische Aminosäuren in der Fc-Domäne von IgG1-Antikörpern, die die Bindung an FcγR beeinflussen. Eine S239D und I332E Modifikation, erhöhte die Affinität für FcγRIIIa, FcγRIIa und FcγRIIb. Antikörpervarianten der klinisch zugelassenen IgG1-Antikörper Alemtuzumab (CD52), Rituximab (CD20) und Trastuzumab (anti-HER2) mit diesen Mutationen wiesen bei vergleichbarer CDC-Aktivität eine verstärkte ADCC-Aktivität durch die höhere Affinität für den aktivierenden FcγRIIIa auf NK-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-IgG1-Antikörpern auf (Lazar et al. 2006). Dieser Effekt der S239D-I332E Proteinmodifikation wurde auch bei weiteren IgG1-Antikörpern gegen CD19, CD33 und CD133 gezeigt (Kellner et al. 2013; Koerner et al. 2016). Außerdem wurde auch eine Erhöhung der ADCP-Aktivität in Versuchen mit Varianten von Rituximab sowie eines modifizierten CD19 Antikörpers nachgewiesen (Schewe et al. 2017; Lazar et al. 2006).

Als weiteres Beispiel einer Erhöhung der ADCP-Aktivität, kann die S239D/I332E/A330L Mutation genannt werden. Die S239D/I332E/A330L modifizierte Variante vermittelte verstärkt ADCP im Vergleich zum Wildtyp-IgG1 (Lazar et al. 2006). Zu den Mutationen, die die CDC-Aktivität beeinflussen gehören u.a. die Aminosäureaustausche K326A, E333A sowie S267E, H268F und S324T. Die Mutationen zu Alanin an den Positionen 326 und 333 im Fc-Teil von IgG1-Antikörpern führten zu höherer Bindungsaffinität von C1q und brachten eine erhöhte CDC-Aktivität mit gleichzeitig nicht eingeschränkter ADCC-Aktivität (Idusogie et al. 2001). Die Mutationen S267E-H268F-S324T erhöhten deutlich die CDC-Aktivität mit jedoch erniedrigter ADCC-Aktivität in Versuchen mit CD20 IgG1-Antikörpern (Moore et al. 2010).

Zurzeit befinden sich 8 Protein-engineerte mAk wie z.B. Talacotuzumab, Margetuximab, oder MOR208 in klinischer Testung. Der humanisierte CD19 Antikörper XmAb5574 (MOR208) mit den S239D/I332E-Mutationen zeigte erhöhte ADCC- und ADCP- sowie proliferationsinhibierende Aktivität gegen verschiedene NHL- und Leukämie-Zelllinien (Horton et al. 2008). Derzeit werden Phase II Studien mit MOR208 für die Behandlung von Diffus Großzelligen B-Zelllymphomen (DLBCL) als Kombinations- und Monotherapie durchgeführt (Jurczak et al. 2018; Woyach et al. 2015). Der Protein-engineerte, humanisierte anti-CD123/IL-3R IgG1 Antikörper Talacotuzumab, wurde mit den S239D/I332E-Mutationen produziert und in Phase II/III Studien getestet. Er vermittelte *in vitro* ADCC gegen IL-3Rα-exprimierende Akute Myeloische Leukämien (AML), inhibierte Zellproliferation in murinen Xenograft-Modellen sowie IL-3-abhängige Prozesse, welche Leukämiezellen vor Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) schützten, wobei die Kombination mit TKI's die Elimination der Leukämiezellen verstärkte (Busfield et al. 2014). Die

Phase II/III-Studien wurden jedoch im Oktober 2017 ohne Angabe von Gründen gestoppt und bislang keine weiteren Daten veröffentlicht (Johnson & Johnson 17.10.2017). In einer Phase III-Studie wird zurzeit der Her2-gerichtete, Fc-engineerte Antikörper Margetuximab im Vergleich zu Trastuzumab für die Therapie des Mammakarzinoms untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02492711). Seine fünf Mutationen L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L führten *in vitro* zu erhöhter Bindung an FcγRIIIa und erniedrigter Bindung an FcγRIIb, sodass Margetuximab eine erhöhte ADCC-Aktivität gegen HER2-positive Tumorzellen im Vergleich zu Trastuzumab aufwies (Nordstrom et al. 2011). Margetuximab wurde von den Patienten im Rahmen der Phase I-Studie gut toleriert und könnte neue Therapiemöglichkeiten für Her2-positive Mammakarzinompatientinnen bieten (Bang et al. 2017). CDC-optimierte Antikörper sind derzeit nicht in klinischer Testung.

Zu weiteren Methoden, welche die Effektorfunktionen von Antikörpern verändern, gehört der Austausch von größeren Aminosäure-Sequenzen zwischen zwei Isotypen von Antikörpern. Diese Proteine werden *Cross-Isotype* genannt. Bislang sind alle zugelassenen Antikörper vom IgG-Isotyp und vermitteln ihre Wirkung über FcγR. Kelton und Kollegen entwickelten eine IgGA-*Cross-Isotype* Fc-Domäne, welche die Effektorfunktionen von IgG und IgA kombiniert. IgGA bindet an den FcαRI-Rezeptor mit ähnlicher Affinität wie ein IgA-Isotyp und auch an die FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb sowie C1q mit ähnlicher Affinität wie ein IgG-Isotyp. *In vitro* zeigte ein IgGA-Trastuzumab Effekte beider Immunoglobulinsubtypen. Er rekrutierte neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen und besaß zudem eine höhere CDC-Aktivität im Vergleich zu den IgG1- und IgA-Antikörper-Varianten (Kelton et al. 2014). Das Potential solcher Moleküle oder auch anderer Isotypen wie IgA wurde bislang aber noch nicht klinisch getestet.

1.7.2. Glyco-Engineering

Einen Einfluss auf die Bindung von IgG1-Antikörpern an FcγR hat auch die Glykosylierung des Antikörpers. Das Oligosaccharid am Asparagin an Position 297 (N297) sowie der Grad der Fucosylierung beeinflusst die effektorzellvermittelte Tumorzelllyse durch IgG1-Antikörper. Eine reduzierte Fucosylierung führt zu erhöhter FcγRIIIa-Bindung von IgG1-Antikörpern (Shields et al. 2002) und dadurch zur Steigerung der ADCC-Aktivität (Shields et al. 2002; Shinkawa et al. 2003). Es wurden unterschiedliche Technologien zur Reduktion der Fucose bei der Produktion von IgG1-Antikörpern entwickelt, wie z.B. die Verwendung von Lec13 CHO-Zellen, die aufgrund von Enzymdefekten u.a. keine Fucose einbauen können, oder der Knockout des FUT8-Gens in antikörperproduzierenden Zellen, welches für die α-1,6-Fucosyltransferase kodiert (Patnaik und Stanley 2006; Yamane-Ohnuki et al. 2004). Neben der Fucose beeinflussen auch andere Zuckerreste am Fc-Teil von IgG-Antikörpern, die Bindung an FcγR und können damit die ADCC-Aktivität erhöhen. Durch Hypergalaktosylierung konnte eine signifikante Erhöhung von ADCC erreicht werden, obwohl diese nicht in dem hohen Maße mit der Defucosylierung vergleichbar ist (Thomann et al. 2016). Neben diesen Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass

der Grad der Sialylierung von N-Glycan-Strukturen von IgG-Antikörpern sich negativ auf die Bindung an den FcγRIIIa auswirkt. Antikörper mit hoher Sialylierung hatten eine 4-fach geringere Affinität für aktivierende FcγR, was zu einer niedrigeren ADCC-Aktivität führte (Scallon et al. 2007).

In Japan wurde 2017 für die Therapie von T-Zell-Lymphomen Mogamulizumab zugelassen. Dieser monoklonale IgG1-Antikörper bindet an den C-C Chemokin-Rezeptor 4 (CCR4), welcher unter anderem auf T-Zell-Lymphomen exprimiert wird. Es handelt sich um einen glyco-engineerten, defucosilierten Antikörper, der *in vitro* erhöhte ADCC-Aktivität besitzt und bei Patienten mit CCR4⁺, aggressiven T-Zelllymphomen ein Ansprechen von 30-50% mit handhabbaren Nebenwirkungen zeigte (Winsett et al. 2017). Ein weiterer glyco-engineerter Antikörper, der für die Behandlung von Chronisch Lymphatischen Leukämien (CLLs) und follikulären Lymphomen im Jahr 2013 zugelassen wurde, ist Obinutuzumab (Sehn et al. 2016; Lee et al. 2014). Es handelt sich um einen defucosylierten CD20 mAk, welcher eine höhere Bindungsaffinität für FcγRIIIa und höhere ADCC- und ADCP-Aktivität als Rituximab aufwies (Mössner et al. 2010). Weitere glyco-engineerte Antikörper, wie Ublituximab (CD20), Inebilizumab (CD19) oder Lumretuzumab (HER3) sind im fortgeschrittenen Stadium klinischer Untersuchungen für CD20⁺ B-Zellerkrankungen, die B-Zelldepletion bei Multipler Sklerose bzw. HER3⁺ solide Tumoren (Agius et al. 2017; Meulendijks et al. 2017; Sharman et al. 2017).

1.8. Bedeutung von ICAM-1/CD54 in der Tumorthherapie

In der Auswahl von geeigneten Zielstrukturen für die Antikörpertherapie wird ein gutes Verständnis ihrer Funktion und Eigenschaften benötigt. Ein ideales Antigen sollte in hoher Dichte, homogen, konstant sowie gut erreichbar auf Tumorzellen und möglichst wenig auf gesunden Zellen exprimiert sein (Carter et al. 1992). Außerdem sind die gewünschten Charakteristika eines Tumorantigens, je nach Wirkmechanismus des konstruierten Antikörpers und der Beschaffenheit des Tumors (solide oder hämatologisch) unterschiedlich. Wenn z.B. der Wirkmechanismus des Antikörpers eine direkte Interaktion mit Oberflächenrezeptoren voraussetzt, um entweder direkt oder über Effektorzellen Zytotoxizität zu induzieren, dann ist es von Vorteil wenn der Antigen-Antikörper Komplex nicht schnell in die Zelle aufgenommen wird, sodass die Zeit in der der Antikörper über seinen Fab-Teil und Fc-Teil an seine Zielantigene binden kann, verlängert wird. Im Gegensatz ist bei Antikörper-Konjugaten, welche ein Toxin in die Tumorzelle transportieren, eine schnelle Internalisierung des Antigen-Antikörper Komplexes vorteilhaft.

Beim MM stehen nur sehr wenige Zielstrukturen mit enger B-Zell Restriktion Zu Verfügung. Ein Beispiel wäre hier BCMA. Aufgrund der niedrigen Antigendichte eignet sich dieses Antigen jedoch eher für den Einsatz von bispezifischen Antikörpern oder CAR-T Zellen. Antigene wie CD19 oder CD20, welche bei vielen B-Zell-Neoplasien hoch exprimiert werden, sind auf Myelomzellen niedrig exprimiert, sodass auch Oberflächenrezeptoren mit weniger engen Expressionsprofil wie CD38, SLAMF7 (CD319) sowie

das *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1, CD54) an Bedeutung zugenommen haben (Wichert et al. 2017; Dimopoulos et al. 2016; Lonial et al. 2015).

Das ICAM-1 ist ein 90 kDa Glykoprotein, welches zur Immunoglobulin-Superfamilie gehört. Die längste Isoform beinhaltet fünf extrazelluläre Domänen, eine Transmembrandomäne und einen Threoninreichen zytoplasmatischen Teil (Ramos et al. 2015). Sie kann Homodimere bilden, in welchen Untereinheiten über die vierte Ig-Domäne miteinander verbunden sind. Durch die Dimerisierung der ICAM-1 Untereinheiten erhöht sich z.B. die Affinität für den Liganden *Leukocyte Function Associated Antigen-1* (LFA-1) (Miller et al. 1995). Das humane ICAM-1 ist ein stark glykosyliertes Protein und beinhaltet 8 N-Glykosylierungsstellen (Bloom et al. 1996). Die N-Glykosylierung zeigte in Studien Einfluss auf die Bindung von Liganden, wie z.B. bei der Anwesenheit des α -Mannosidase Inhibitors 1-Deoxymannojirimicin (DMJ), welche zur stärkeren Bindung zwischen *Macrophage 1-Antidgen* (Mac-1) und ICAM-1 führte (Diamond et al. 1991). Außer LFA-1 und Mac-1 bindet ICAM-1 auch weitere Liganden aus der β_2 -Integrin Subfamilie wie das p150,95 (Marlin und Springer 1987). Die β_2 -Integrine sind die am häufigsten auf Leukozyten vorkommenden Integrine und sind für Leukozyten spezifisch (Arnaout 2016). Die meisten ICAM-1 Liganden binden an die Ig-Domänen 1 und 2. Neben den β_2 -Integrinen gehören zu den ICAM-1 Liganden auch Hyaluronan, Fibrinogen, sowie die meisten humanen Rhinovirus-Gruppen (Xing et al. 2003; Languino et al. 1995; McCourt et al. 1994).

ICAM-1 vermittelt Zell-Zell-Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und endothelialen Zellen und ermöglicht so die transepitheliale Rekrutierung von Immunzellen an Infektions- oder Verletzungsstellen außerhalb der Blutgefäße (Smith et al. 1989). ICAM-1 wird unter physiologischen Bedingungen im Körper in niedrigem Maße auf Fibroblasten, Epithel-, Endothelzellen und Leukozyten exprimiert. Die Stimulation dieser Zellpopulationen durch Zytokine, die z.B. bei Infektionen oder Verletzungen freigesetzt werden, induzieren die Expression von ICAM-1 auf den Leukozyten und den Epithel-/Endothelzellen und bewirken damit die Einwanderung von Immunzellen in das Gewebe (Bella et al. 1998). Bei Myelomzellen erfüllen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 oder *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1/CD106) eine wichtige Rolle in der MM-Zellaggregation sowie in der Tumorinvasion und der Lokalisation im Knochen (Schlesinger und Bendas 2015; Kawano et al. 1991). Patienten mit neu diagnostiziertem MM zeigten erhöhte ICAM-1- und VCAM-1-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu MGUS- und SM-Patienten (Terpos et al. 2016). Erhöhte Konzentrationen im Serum sowie die Überexpression von ICAM-1 auf Tumorzellen ist negativ mit dem Fortschreiten der Erkrankung und der Überlebenszeit von Patienten assoziiert, was ICAM-1 zu einer potentiell geeigneten Zielstruktur für die Antikörpertherapie macht (Terpos et al. 2016; Sampaio et al. 2009; Schmidmaier und Baumann 2008). Außerdem spielt die Interaktion zwischen ICAM-1 und seinen Liganden (z.B. LFA-1) eine wichtige

Rolle in der Makrophagen-vermittelten Medikamentenresistenz bei der MM-Therapie (Zheng et al. 2012).

Das ICAM-1 könnte mit seinen Eigenschaften ein interessantes Ziel für die MM Therapie sein. Informationen zu biologischer Aktivität sowie Verträglichkeit und Sicherheit von Anti-ICAM-1 Antikörpern zeigten klinische Studien von BI-505. Dieser humane Anti-ICAM-1 Antikörper wurde klinisch für das MM evaluiert und zeigte zwar gute Verträglichkeit, aber wenig Antitumoraktivität (Wichert et al. 2017; Hansson et al. 2015). Einen Ansatz um diese Aktivität von ICAM-1 Antikörpern zu erhöhen zeigt das Fc-Engineering, sodass wir eigene Fc-optimierte Varianten eines ICAM-1 Antikörper entwickelt haben. Das scFv-Fusionsprotein TP15-Fc, welches als Grundlage für die Herstellung dieser Antikörpervarianten diente, wurde in Xenograftmodellen untersucht. Mäuse, die mit dem Kontrollantikörper 4D5-Fc behandelt worden waren, mussten binnen 55 Tagen getötet werden, wohingegen die mit dem TP15-Fc (war mit den S239D/I332E/A330L Mutationen konstruiert) behandelten Tiere bis zum Ende des Experiments nach 120 Tagen ohne Anzeichen von Tumorwachstum überlebt hatten (Klausz et al. 2017). Die Behandlung mit dem ADCC-optimierten TP15-Fc scFv-Fusionsprotein hatte in diesem Modell komplett das INA-6.Tu1-Tumorzellwachstum gehemmt, weshalb die antigenbindenden Sequenzen von TP15-Fc für die Herstellung von humanen IgG1-Antikörpervarianten ausgewählt worden waren.

1.9. Ziele der Arbeit

Trotz großer Fortschritte und Einführung neuer Behandlungsoptionen bleibt das Multiple Myelom eine Erkrankung, die in vielen Fällen bislang nicht heilbar ist. Die klinische Erfahrung mit den monoklonalen Antikörpern Daratumumab und Elotuzumab zeigt, dass insbesondere diese Substanzklasse in Kombination mit etablierten Standardtherapien sehr erfolgreich eingesetzt werden kann. Jedoch sprechen nicht alle Patienten auf eine Therapie an bzw. rezidiert ein signifikanter Anteil an Patienten. Alternative Zielstrukturen wie ICAM-1 könnten daher Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Antikörper in der Therapie des Multiplen Myeloms sein. In ersten klinischen Studien zeigten ICAM-1 Antikörper gute Verträglichkeit, jedoch ungenügende Antitumoraktivität. Durch Modifikationen im Fc-Teil eines Antikörpers, sogenanntes Fc-Engineering, lassen sich einzelne Effektorfunktionen eines Antikörpers (z.B. ADCC) gezielt verstärken und damit möglicherweise die therapeutische Aktivität verbessern.

Ziel dieser Arbeit ist die Frage zu klären inwieweit sich durch Modifikation des Fc-Teils eines ICAM-1 Antikörpers dessen ADCC Aktivität, einem wichtigen Effektormechanismus in der Antikörpertherapie, signifikant verbessern lässt, um möglicherweise das therapeutische Potential zu erhöhen. Um diese Frage zu adressieren, wurden drei humane IgG1-Antikörpervarianten entwickelt und hinsichtlich ihrer direkten und v.a. indirekten Wirkmechanismen verglichen. Dafür sollten neben einem Wildtyp-IgG1-Antikörper, ein durch sog. Protein-Engineering ADCC-optimierter IgG1-Antikörper und eine Knockout-

Variante, die nicht mehr an FcγR von Immunzellen binden kann, hergestellt und funktionell dargestellt werden. Als Grundlage der Arbeit dienten dabei die variablen Regionen eines im eigenen Labor entwickelten humanen ICAM-1 Antikörpers.

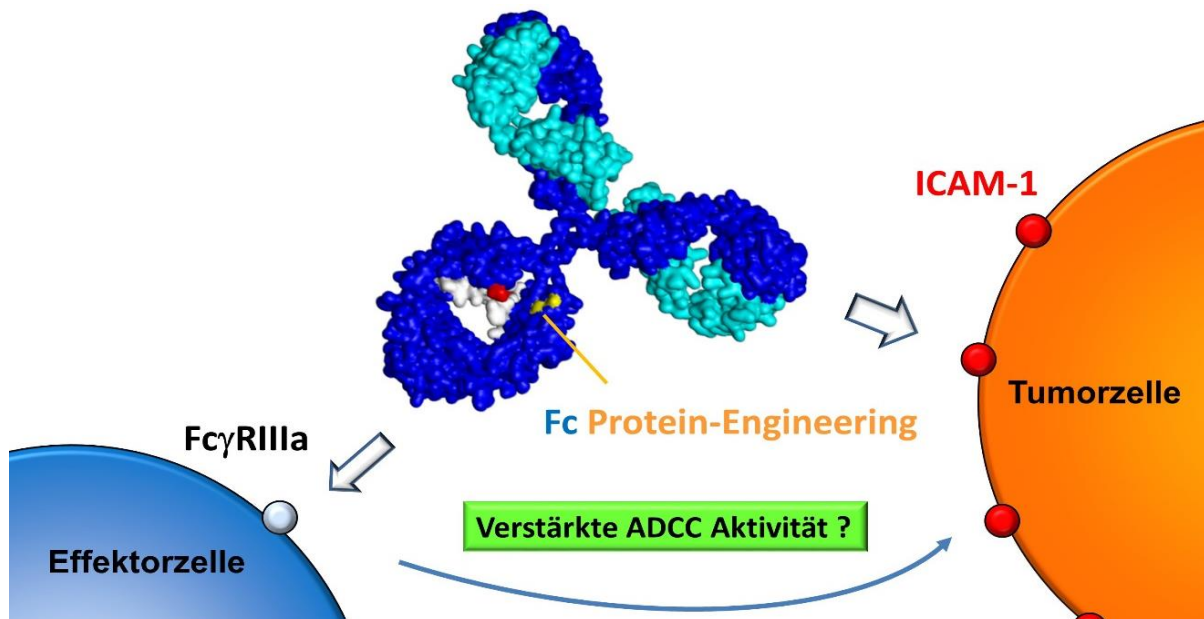


Abbildung 3: Konzept und Fragestellung: Dargestellt ist ein IgG1 Antikörper welcher über den Fc-Teil (*fragment crystallisable*) FcγRIIIa/CD16a-positive Effektorzellen und über den Fab-Teil (*fragment antigen binding*) ICAM-1-positive Tumorzellen binden kann. Ziel der Arbeit ist es durch Modifikation des Fc-Teils eines ICAM-1 Antikörpers dessen ADCC Aktivität, einem wichtigen Effektormechanismus in der Antikörpertherapie, signifikant zu verbessern, um möglicherweise das therapeutische Potential zu erhöhen. ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
BHK CD16a-F und CD16a-V	Baby Hamster Kidney Zellen, stabil transfiziert mit CD16a-158F bzw. CD16a-V	(Capstik 1963; Glorius et al. 2013) im Labor vorhanden
Daudi	Humane Burkitt Lymphom Zellen	(Klein et al. 1968) bezogen über DSMZ
INA-6	Humane Plasmazelleukämie-Zelllinie	(Burger et al. 2001) im Labor vorhanden
L363	Humane Plasmazelleukämie-Zelllinie	(Diehl et al. 1978) im Labor vorhanden
LentiX™ 293T	Humane Nierenfibroblasten, stabil transfiziert mit SV 40 Large T-Antigen	(Pear et al. 1993) bezogen über Clontech Takara Bio, USA
MM1.S	Humane Myelomzelllinie	(Greenstein et al. 2003) im Labor vorhanden

U266	Humane Myelomzelllinie	(Nilsson et al. 1970) bezogen über DSMZ
------	------------------------	--

2.1.2. Zellkulturmedium

Die Komponenten wurden steril zusammengemischt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzung

Medium	Zelllinien	Zusammensetzung
R10+	L363, U266, MM1.S, Daudi	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640(1x) mit GlutaMax (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 10% fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum (FBS), Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 1% (100 µg/ml) Penicillin / Streptomycin (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe)
R10+ mit Interleukin-6 (IL-6)	INA-6	R10+ mit 2,5 ng/ml IL-6 (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe)
D10+	LentiX™ 293T	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Glutamax (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 10% FBS, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 1% (100 µg/ml) Penicillin / Streptomycin (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe)
R10+Methotrexat (MTX) +G418	BHK CD16-V BHK CD16-F	R10+ 350 µl G418 Geneticin™ (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 28 µl MTX, Sigma-Aldrich, München)

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Deionisiertes Wasser kam ausschließlich aus der Deionisationsanlage MiliQ A10 der Firma Merck (Darmstadt). Für die Herstellung von Verdünnungen und Lösungen wurde destilliertes Wasser von Thermo Fischer Scientific (Karlsruhe) benutzt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
⁵¹ Cr als Natriumchromat	Hartman Analytic, Braunschweig
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Acutase™	GE Healthcare, München
Acylamid Rotiphorese Gel 30	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
CaptureSelect™ IgG-CH1 Affinitätsmatrix	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe

Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich, München
Di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Genetecin (G418 Sulfat)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Human Albumin</i>	CSL Behring Pennsylvania, USA
IL-6	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth, Karlsruhe
Lymphoflot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MTX	Sigma-Aldrich, München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat (NaNO_3)	Carl Roth, Karlsruhe
OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Groningen, Niederlande
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
<i>Precision Plus Protein™ Standard Dual Color</i>	BioRad, München
Roti®-Blue	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Übersicht der Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2xHBS (HEPES buffered saline)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4 pH 7,05
Coomassie-Farbelösung	60 ml H_2O 20 ml Methanol 20 ml 5 x Roti Blue
Dublecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 3,0; 5 ml
MACS-Puffer	20% <i>Human Albumin</i> , 75 ml (CSL Behring Pennsylvania, USA) autoMACS™ Rinsing Solution 1500 ml, pH 7,2 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH 8,0; 1250 μl
PBA	DPBS 500 ml 1% BSA 5 g 0.05% NaN_3 0.25 g
Percoll 63%	Easycoll Separating Solution (Biochrom, Berlin) 18,9 ml DPBS (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) 11,1 ml
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM TRIS

	192 mM Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	0,313 M TRIS HCl (pH 6,8) (10% SDS; nur bei reduzierenden Bedingungen) 0,05% Bromphenolblau 50% Glycerin 0,5 M DTT
SDS-PAGE Sammelgel	667 µl Acrylamid/Bis 1,000 ml TRIS (pH 6,8; 0,5 M) 40 µl SDS (10%) 20 µl APS (10%) 4 µl TEMED Ad 4,024 ml <i>Aqua. Dest.</i>
SDS-PAGE Trenngel	2,668 ml Acrylamid/Bis 2,001 ml TRIS (pH 8,8; 0,5 M) 80 µl SDS (10%) 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED ad 8,067 ml <i>Aqua. Dest.</i>
Trypan Blue Solution (100 ml)	Sigma-Aldrich, München

2.1.5. Vektoren

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Vektoren

Vektor	Hersteller
pSec-MSH-TP15 VH-IgG1-Fc-prot-eng	Vom Labor zu Verfügung gestellt
pSecMSH-TP15 VH-IgG1-Fc-k.o.	Vom Labor zu Verfügung gestellt
pSec-MSH-TP15 VH-Full-IgG1	Vom Labor zu Verfügung gestellt
pSec-MSH-TP15 VL-kappa LC	Vom Labor zu Verfügung gestellt

2.1.6. Antikörper

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper

MSH-TP15 Antikörper	Spezifität	Referenz/Bezugsquelle
MSH-TP15	ICAM-1 spezifischer IgG1 Antikörper	eigene Herstellung, nicht publiziert
MSH-TP15 Fc-eng.	ICAM-1 spezifischer IgG1 Antikörper mit S239D und I332E Mutationen (Lazar et al. 2006) am Fc-Teil	eigene Herstellung, nicht publiziert
MSH-TP15 Fc k.o.	ICAM-1 spezifischer IgG1 Antikörper mit L234F, L235E und P331S (Oganesyan et al. 2008) Mutationen im Fc-Teil	eigene Herstellung, nicht publiziert
Andere Antikörper:		
CD138-PE	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, PE gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD38-FITC	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, FITC gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD3-PC7	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper PC7 gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD54-FITC	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, FITC gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

CD56-PE	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, PE gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Cetuximab (Erbix®)	Chimärer, monoklonaler Anti-EGFR-IgG1 Antikörper	Apotheke des UKSH
FITC-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment Goat Anti-Human IgG	Polyklonales Antikörperserum gegen humane IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
IgG-FITC	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, FITC gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IgG-PC7	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper PC7 gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IgG-PE	Monoklonal, Muriner IgG1 Antikörper, PE gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Rituximab (MabThera®)	Chimärer, monoklonaler CD20 IgG1 Antikörper	Apotheke des UKSH
Trastuzumab (Herceptin®)	Humanisierter, monoklonaler Her2/neu IgG1 Antikörper	Apotheke des UKSH

2.1.7. Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
NK Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe

2.1.8. Geräte und Materialien

2.1.8.1. Verwendete Geräte

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
12er Pipette	Research	Eppendorf, Hamburg
Autoklav	Systec 5075EL	Systec, Linden
Brutschrank	Hera Cell 240 Heraeus	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	Navios 10/3	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Elektrophoresekammer	Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ELISA Reader	Absorbance mikroplate reader	Tecan Group Ltd., Schweiz
Gefrierschrank	Kendro Typ HFU 686 Top	Heraeus, Hanau
Gel-Dokumentationskammer	Gel Doc XR+ Gel Documentation System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizblock	SBH130D	Cole-Parmer LTD., UK
Horizontalschüttler	3006	GFL, Burgwedel
Inkubator für chromierte Zellen	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Kühl-Gefrierkombination NoFrost	Liebherr, Bulle
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Axiovert 40 C	Carl Zeiss, Oberkochen
LSC & Luminescence Counter	MicorBeta TriLux 1450	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Magnet	MACS Multi Stand mit MidiMACS separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	MR Hei-Mix S	Heidolph, Schwabach
MilliQ Anlage	MilliQ A10	Merck, Darmstadt
Netzteil für Elektrophorese	Power Pac HC	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
pH-Meter	HI2215 pH/ORP	HANNA instruments, Vöhringen
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
Plattenschüttler	Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Photometer	Sunrise remote	Tecan Group Ltd., Schweiz
Pumpe	Vacusafer Comfort	Integra Bioscience, Schweiz
Sterilbank	Hera Safe Typ HS18	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	5417 R	Eppendorf, Hamburg
Universalzentrifuge	Multifuge 3D Plus	Heraeus, Hanau
Vortexer	Bio Vortex V1	Schmidt, Wien, AU
Waage	XB 22000 C Precisa	PESA, Wetzikon, Schweiz
Zellzähler und Zellvitalitätsanalysesystem	Vi-CELL XR	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

2.1.8.2. Verwendete Materialien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial

1450 MicroBeta 96-well Platte (Reader-Platten)	Perkin-Elmer, Waltham USA
70 µl-Zellsieb	Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
96-well-Mikrotestplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Dialyserschlauch ZelluTrans/Roth® 3,5	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegskalpell	Feather, Osaka, JPN
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Gieß-Vorrichtung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Glasplatten und Kämmen	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauerzählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Poly-prep Säule	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht sowie Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (groß) 0,22 µm	Merck, Darmstadt
Vivaspin®6 Röhrchen	Sartorius, Göttingen

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien (Tab. 2) wurden im Brutschrank bei 37 °C kultiviert und zwei- bis dreimal pro Woche mit frischem Medium versorgt. Die adhärennten LentiX-293T- und MM1.S-Zellen wurden vor der Behandlung mit Accutase oder 0,05% Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Überschusses an Medium nach 5 min bei 37 °C abgestoppt. Für alle Experimente wurden nur Zellen mit einer Vitalität von über 90% verwendet, die mittels Trypanblaufärbung (Neubauerzählkammer oder Vi-Cell Counter) bestimmt worden ist.

2.2.2. Expression der MSH-TP15 Antikörper durch Ca_2PO_4 -Transfektion

Die Expression der MSH-TP15 Antikörper wurde in LentiX 293T Zellen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion durchgeführt (Graham und van der Eb 1973). 3×10^6 Zellen wurden in sterilen 12 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Der Transfektionsansatz enthielt pro Platte 20 µg Gesamt-DNA (10 µg pSec-MSH-TP15 VH-IgG1-Fc-prot-eng, pSec-MSH-TP15 VH-IgG1-Fc-k.o. oder pSec-MSH-TP15 VH-Full-IgG1 plus 10 µg pSec-MSH-TP15 VL-kappa LC), 100 µl 2,5 M CaCl_2 und 5 µl Chloroquin (100 mM) in 1 ml sterilem Wasser. Der Ansatz wurde langsam im Verhältnis 1:1 zu 2xHBS-Puffer getropft, wobei mit einer anderen Pipette Luft ins Röhrchen geblasen wurde, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Pro Platte wurde 8 ml frisches Medium vorher vorgelegt. Von diesem Gemisch wurden jeweils 2 ml pro Platte auf die LentiX 293T verteilt und 8 h inkubiert bevor ein Mediumwechsel erfolgte. Weitere Medienwechsel erfolgten am dritten und sechsten Tag sodass 2-3 Liter der Zellkulturüberstände in sterilen 2 Liter-Flaschen gesammelt wurden.

2.2.3. Reinigung der MSH-TP15 Antikörper durch

Affinitätschromatographie

Die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Antikörper wurden gesammelt und auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Danach wurden diese steril filtriert und anschließend mit *Capture Select™ IgG1-CH1 Affinity Matrix* im Verhältnis 1:1000 für 16 h bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wurden durch 10 min lange Zentrifugation bei 2000 rpm in einer 4 °C gekühlten Zentrifuge die IgG-Beads aus den Überständen getrennt, in einer Poly-Prep-Säule gesammelt und mit 10 ml PBS drei Mal gewaschen. Dann wurde in je einem 15 ml-Röhrchen 1,2 ml 0,1 M TRIS (pH 8,0) vorgelegt und mit je 6 ml 0,1 M Glycin (pH 3,0) die Antikörper von den Beads in der Säule eluiert. In einen zuvor in PBS eingeweichten Dialysierschlauch wurde anschließend das Eluat eingefüllt und für drei Tage unter täglichen Wechsel des Puffers bei 4 °C gegen steriles PBS dialysiert. Die Antikörperlösung wurden dann

jeweils in einen 6 ml *Vivaspin*[®]6 Röhrchen bei 4000 rpm aufkonzentriert bis das Volumen auf 1 ml eingengt war. Nach einer erneuten sterilen Filtrierung wurden die Antikörper bei 4  C anschließend gelagert.

2.2.4. SDS-PAGE und Coomassie Färbung

Um die Reinheit der MSH-TP15-Antikörperlösungen zu bestimmen sind SDS-PAGE und Coomassie-Färbungen durchgeführt worden. Es wurde 10%iges Sammelgel mit einem 10% Trenngel nach den Standardmethoden gegossen. Je 2 Öl von einem reduzierenden oder nicht-reduzierendem Ladepuffer wurden zu je 8 Öl Antikörperlösung pipettiert und bei 94  C für 5 min erhitzt. Danach wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. 5 Öl des *Precision Plus Protein Dual Color Standards* diente als Größenstandard. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese für 10 min bei 120 V und danach für 50 min bei 150 V in SDS-PAGE-Ladepuffer. Gefärbt wurden die Proteinbanden bei Raumtemperatur für 16 h in Coomassie-Färbelösung. Danach wurde über mehrere h mit Leitungswasser das Gel wieder entfärbt.

2.2.5. Bradford-Assay

Um die Proteinkonzentration der MSH-TP15 Antikörperlösungen zu bestimmen wurde die Bradford-Methode verwendet (Bradford 1976). BSA-Reihen mit 25-2000  g/ml wurden hergestellt um Eichgeraden zu bestimmen. Gleichzeitig wurden die MSH-TP15 Proben mit unbekannter Konzentration mit dem *Coomassie Plus Assay Kit* nach Herstellerangaben vorbereitet. Mit den *Sunrise Remote Photometer* und der *Magellan – Data Analysis Software* wurde die Absorption der Proben bei 595 nm in 96-well-Platten gemessen. Anhand der Absorption bei 595 nm des an das BSA gebundenen Coomassie-Farbstoffes, welche linear zum Konzentrationsbereich aufsteigt, konnte die Antikörperkonzentration bestimmt werden. Es wurde eine Standardgerade bei der entsprechenden Wellenlänge mit den BSA-Messwerten und deren gemessener Absorptionen erstellt. Mittels *Microsoft Excel 2007* erfolgte anschließend die Berechnung der Konzentration mit Hilfe der linearen Regressionsgeraden nach folgender Formel: $x = (y-b) / m$. Hier ist b der Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y-Achse, m die Steigung der Eichgeraden und y die gemessene Absorption.

2.2.6. Durchflusssyzyometrie

Um FACS-Analysen durchzuführen wurden die Zellen mit PBA-Puffer gewaschen und 5 min mit 1600 rpm bei 4  C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mittels Trypanblaufärbung gezählt und auf 5×10^6 Zellen/ml in kalten PBA-Puffer eingestellt. Es wurden je 100 Öl Zellen pro Probe in FACS-Röhrchen vorgelegt und 10 Öl der angegebenen Konzentration der jeweiligen MSH-TP15- bzw. Kontroll-Antikörper für die Bindungskurven auf Eis hinzu pipettiert und mit den Zellen gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert und danach drei Mal mit 1 ml kalten PBA gewaschen. Je 50 Öl FITC-

conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20 mit PBA wurden dann zu den Zellpellets hinzu pipettiert und erneut 30 min auf Eis, lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit 1 ml PBA gewaschen und dann in kalten, 500 µl PBA aufgenommen. Für die FACS-Analysen der NK und der PBMC wurden je 10 µl Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmarker auf T-Zellen (CD3-PC7) und NK-Zellen (CD56-PE) bzw. mit den Isotypkontrollen (IgG-PE, IgG-PC7) und je 10 µl 7-AAD (Vitalitätsfarbstoff) verwendet. Die Zellen wurden dann 30 min auf Eis inkubiert und danach mit 1 ml PBA gewaschen. Anschließend wurden diese in 500 µl PBA aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte *am Navios Flow Cytometer* und die Ergebnisse wurden mit der *Kaluza-Software* von Beckman Coulter ausgewertet.

2.2.7. Proliferationsinhibitionsversuche

Die metabolische Aktivität von Myelomzellen wurden anhand der MTS-Assay (*The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* nach Promega) bestimmt. Es wurden 96-well-Zellkulturplatten mit einem finalen Volumen von 100 µl pro Well verwendet. Die Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert. Pro Probe wurden 20.000 Zielzellen mit ggf. Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Danach wurden die Platten 3 Tage lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 25 µl MTS-Lösung pro Well dazugegeben und dann 2-3 h im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 490 nm mit den *Sunrise Remote Photometer* gemessen. Das Prinzip des Versuches beruht auf einer Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes anhand mitochondrialer Enzyme von stoffwechselaktiven, lebenden Zellen, zum braun gefärbten Formazan (Barltrop et al. 1991). Die Absorption bei 490 nm verhält sich proportional zu den lebenden Zellen. Im *Microsoft Excel 2007* wurde nach folgender Formel das Wachstum Anhand der Zahl behandelter und unbehandelter Zellen berechnet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Mittelwert der Absorption der behandelten Zellen}}{\text{Mittelwert der Absorption der unbehandelten Zellen}} \times 100$$

2.2.8. Zytotoxizitätsversuche

Für die Versuche wurden die Myelomzelllinien INA-6, L363, U266, Daudi und MM1.S bzw. Tumorzellen aus dem Blut oder Knochenmark von MM-Patienten nach schriftlicher Einverständnis verwendet (Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, AZ.: D467/15).

2.2.8.1. Humane Effektorzellen und Serum-Isolation aus Vollblut gesunder Spender

Das humane Serum wurde am Tag des Versuches aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern isoliert, indem das Blut in Serum-Monovetten abgenommen und auf Eis für 30 min gelagert wurde. Für 20 min wurde anschließend das Röhrchen mit der Probe bei 2000 rpm zentrifugiert und danach das Serum vorsichtig in ein steriles 15-ml-Sarstedt-Röhrchen überführt.

Die Isolierung von PBMC erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation aus *Leucocyte Reduction Chambers* (LRC), die als Abfallprodukte vom UKSH Blutspendezentrum Kiel zur Verfügung gestellt worden sind. In ein 50 ml-Röhrchen wurde das Blut aus einer LRC gesammelt und mit 1 x PBS auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Anschließend wurden mit je 20 ml *Lymphoflot* vier 50 ml-Röhrchen vorbereitet und danach mit je 10 ml Blut vorsichtig überschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 20 min ohne Bremse. Die deutlich als Schicht erkennbaren PBMC wurden nach dem Zentrifugieren entnommen und erneut in frische 50-ml-Röhrchen überführt. Bevor die verbliebenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mit 45 ml kalten, destillierten Wasser für 30 s und anschließendem Abstoppen des Prozesses durch 5 ml 10 x PBS lysiert worden sind, wurden die Zellen drei Mal mit 1 x PBS bei 1500 rpm für 5 min gewaschen. Durch ein 70 µm-Zellsieb wurden anschließend die Zellaggregate entfernt und die Zellen gezählt. Die PBMC wurden für maximal 24 h in R10+-Medium in einer Dichte von 10×10^6 Zellen/ml in Zellkulturflaschen inkubiert, bevor sie als Effektorzellen in Zytotoxizitätsversuchen eingesetzt wurden. Für die Anreicherung von NK-Zellen aus den PBMC wurde das *NK Cell Isolation Kit* nach Herstellerprotokoll verwendet. Es handelt sich hierbei um eine negative Selektion, wodurch alle anderen Zellpopulationen mit Hilfe von Antikörper-beladenen Beads magnetisch entfernt werden können. Auch die NK-Zellen wurden in R10+-Medium für maximal 24 h in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in Zellkulturflaschen inkubiert bevor sie für funktionelle Versuche verwendet wurden. Die isolierten Effektorzellen wurden immer in Immunofluoreszenzanalysen auf ihre Reinheit (CD56+, CD3+) und ihre Vitalität (7AAD+) geprüft.

Die Isolation der Tumorzellen aus dem Blut oder Knochenmark von Patienten erfolgte wie für die PBMC beschrieben. Der Anteil von Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch über CD38 und CD138 bestimmt und lag zwischen 30 und 92 %.

2.2.8.2. ^{51}Cr -Freisetzungsversuche

Die ADCC und CDC-Aktivität der MSH-TP15 Antikörper wurde anhand von ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen untersucht. Pro Ansatz wurden Zielzellen in 50-150 µl ($100 \mu\text{Ci}$) ^{51}Cr (GE Healthcare, München) radioaktiv markiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit R10+ gewaschen, um extrazelluläres ^{51}Cr zu entfernen. Pro Ansatz wurden 5.000 Zielzellen in 96-well-Mikrotestplatten (Sarstedt) mit 50 µl Effektorzellen (Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnis von 80:1 für PBMC und 10:1 für

NK-Zellen) auf ein Volumen von 200 µl/Well mit ggf. 10 µl Antikörper/Well eingestellt. Pipettiert wurden Triplets, aus denen ein Mittelwert erstellt wurde. Die Mikrottestplatten wurden anschließend für 3 h bei 37 °C inkubiert. Für die CDC-Versuche wurde für jeden Ansatz anstelle von Effektorzellen 50 µl humanes Serum benutzt. Ansonsten wurden die CDC-Versuche übereinstimmend mit den ADCC-Versuchen durchgeführt. Der *Maximal Release* (MR) Wert wurde als Referenz für die maximale ⁵¹Cr-Freisetzung benutzt. Dieser wurde durch Zugabe von 100 µl 1%igem TritonX-100 zu den Myelomzellen ermittelt. Die Abwesenheit von Effektorzellen/Serum und Antikörpern wurde als *Basal-Release* (BR), also die basale ⁵¹Cr-Freisetzung der Zielzellen, definiert. Um die durch Zellyse freigesetzte Radioaktivität in den Überständen zu messen, wurden die Mikrottestplatten zunächst für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend 25 µl/well radioaktiver Überstand zu 125 µl Szintillations-Mix (*OptiPhase SuperMix*) in *1450 MicroBeta 96-well*-Platten überführt. Als letztes wurden die Proben für 15 min geschüttelt bevor im *MicroBeta TriLux 1450 LSC & Luminescence Counter* die ⁵¹Cr-Freisetzung der Triplikate indirekt in *counts per minute* (cpm) gemessen wurde. Die spezifische Lyse wurde nach der folgenden Formel definiert:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = (\text{experimental cpm} - \text{basal cpm}) / (\text{maximal cpm} - \text{basal cpm}) \times 100$$

2.2.9. Statistische Analysen und Graphische Darstellungen

Die Statistischen Analysen und die graphischen Darstellungen erfolgten mit der Software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego California USA) und *Microsoft Excel*. Ab $p \leq 0,05$ wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen akzeptiert und durch einen Stern (*) oder Doppelkreuz (#) markiert. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Varianten des MSH-TP15, ihre Expression und Reinigung

Um neue Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften für maligne Plasmazellen zu finden, wurden in vorarbeiten zwei humane Antikörper-Phagen-Bibliotheken mit den Myelomzelllinien JK-6L und INA-6 mittels Phagen-Display-Technologie gescreent (Klausz et al. 2017). Aufgrund der Bindungseigenschaften (Reaktivität mit unterschiedlichen Plasmazellleukämie-, Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien und keine Bindung von Granulozyten, CD3+ T-Lymphozyten und CD56+ NK-Zellen gesunder Spender) wurde die Antigen-bindende scFv-Sequenz des PIII-15 Phagen verwendet, um den monoklonalen humanen IgG1κ Antikörper MSH-TP15 herzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten 2 weitere

Varianten des MSH-TP15-Antikörpers hergestellt und untersucht werden. Diese Varianten waren MSH-TP15 Fc-eng., der durch die Doppelmutation S239D und I332E im Fc-Teil eine bessere FcγRIIIa-Bindung und erhöhte ADCC-Aktivität bei unveränderter CDC-Aktivität aufweisen sollte (ADCC-optimierter IgG1) und MSH-TP15 Fc k.o., eine Knockout-Variante, bei der durch die L234F, L235E und P331S-Mutationen keine Vermittlung von ADCC oder CDC mehr möglich sein sollte, sodass diese Variante einzig über die direkten, Fab-vermittelten Effektormechanismen wirken sollte (Oganesyan et al. 2008; Lazar et al. 2006). Die Eigenschaften der drei Varianten sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Der für die Herstellung benutzte Vektor sowie die Sequenzen der MSH-TP15 Antikörpervarianten sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

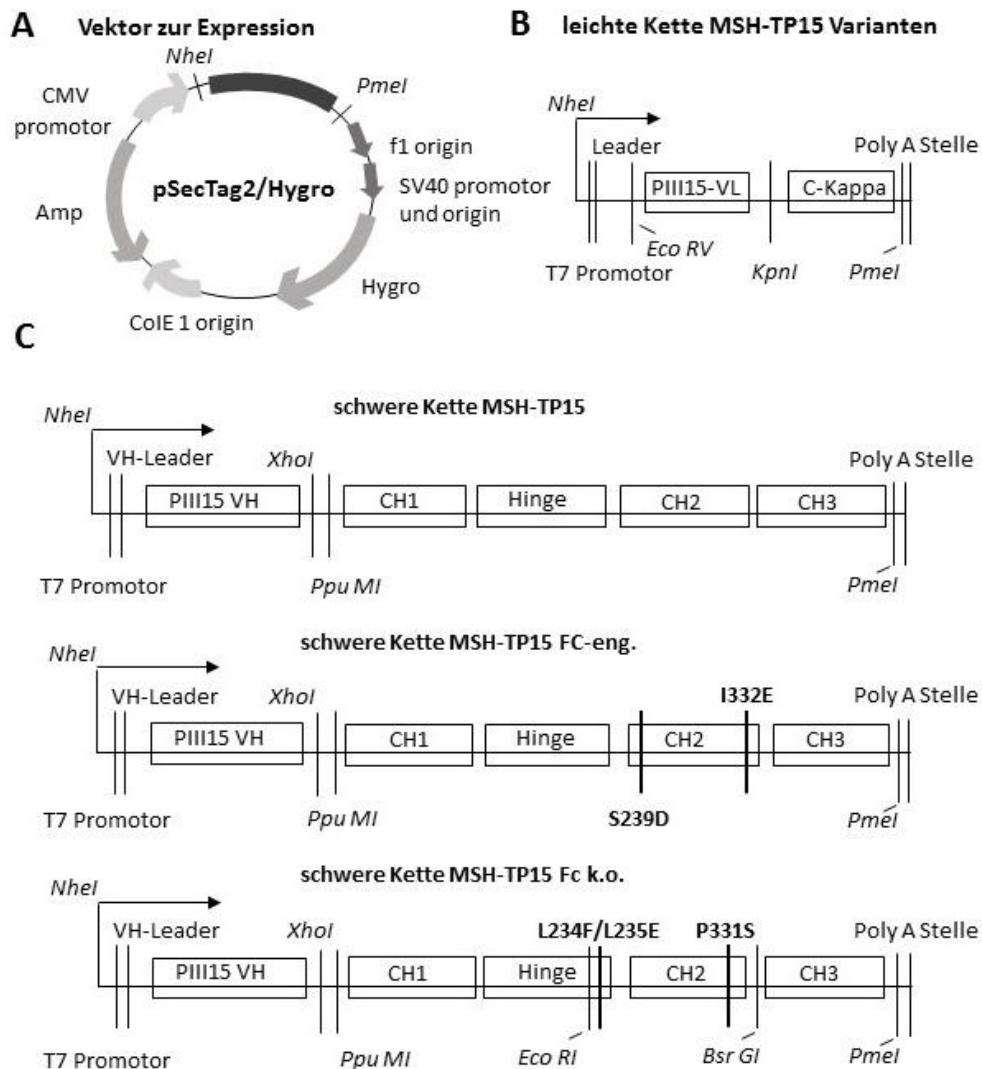


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vektors und der Sequenzen der MSH-TP15 Antikörpervarianten.

Für die Herstellung der MSH-TP15 Antikörper wurden pSec-basierte Vektoren verwendet, die bereits die konstante Region der humanen Kappa-Leichtkette bzw. die konstanten Regionen eines Wildtyp oder optimierter IgG1-Antikörper trugen (vom Labor zu Verfügung gestellt) und auf dem pSecTag2/Hygro-Vektor der Firma Thermo Fischer Scientific basierten (A). Schematische Darstellung der leichten (B) und der schweren Ketten (C) für alle drei Antikörpervarianten. Mutationen sind fett und die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind kursiv markiert. Hygro: Hygromycinresistenz, Amp: Ampicillinresistenz, CMV promotor: Zytomegalovirus Promotor, f1 Origin: Replikationsursprung der filamentösen Bakteriophagen f1, SV40: simian Virus 40, CoIE1: Colicin E1, NheI: Restriktionstelle für die *Neisseria mucosa heidelbergensis* / Restriktionsendonuklease, Eco RV: Restriktionstelle für die Restriktionsendonuklease V und I aus den *E-coli* Bakterium, KpnI: Restriktionstelle für die *Klebsiela pneumonia* / Restriktionsendonuklease, PpuMI: Restriktionstelle für die *Pseudomonas putida* / Restriktionsendonuklease, Bsr GI: Restriktionstelle für die *Bacillus stearothermophilus* / Restriktionsendonuklease, XhoI: Restriktionstelle für die *Xanthomonas Holcicola* / Restriktionsendonuklease, PmeI: Restriktionstelle für die *Pseudomonas mendocina* / Restriktionsendonuklease, Poly A Stelle: Polyadenylierungsstelle, VH/VL: variable Regionen der schweren/leichten Kette, C-Kappa: konstante Kappa Kette.

Tabelle 11: Charakteristika der MSH-TP15 Antikörper

Name	Mutationen	Isotyp	ADCC	CDC
MSH-TP15	Wildtyp	humaner IgG1 κ	Wildtyp	Wildtyp
MSH-TP15 Fc-eng.	S239D und I332E	humaner IgG1 κ , Fc-eng.	↑↑↑	Wildtyp
MSH-TP15 Fc k.o.	L234F, L235E und P331S	humaner IgG1 κ , Fc k.o.	⊘	⊘

eng.: engineered; k.o. knockout; κ : kappa; ⊘: keine Vermittlung; ↑: erhöht;

Die Expressionsplasmide für die leichten und die schweren Ketten der drei Antikörpervarianten wurden zur Verfügung gestellt. Alle drei MSH-TP15-Antikörpervarianten wurden mittels Ca_2PO_4 -Transfektion von 293T-Zellen produziert und durch Affinitätschromatographie aus den Zellkulturüberständen gereinigt. Um die Molekülmasse und Reinheit der finalen Proteine zu beurteilen, wurden denaturierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. Unter nicht-reduzierten Bedingungen zeigten die exprimierten Proteine eine deutliche Bande mit einer Molekülmasse von etwas über 150 kDa (Abb. 5A). Das zu erwartende Molekulargewicht von humanen IgG1-Antikörpern liegt bei etwa 150 kDa. Unter reduzierten Bedingungen trennen sich die leichten von den schweren Ketten sowie die schweren Ketten der Antikörper und bei allen drei Antikörpervarianten waren zwei Banden zu beobachten. Die leichten Ketten hatten das zu erwartende Molekulargewicht von 25 kDa (LC). Das Molekulargewicht der schweren Ketten von IgG1-Antikörpern liegt bei 50 kDa und war bei allen drei Antikörpervarianten mit ca. 55 kDa (HC) etwas höher (Abb. 5B). Aufgrund der Glykosylierung der schweren Kette kommt es zu dem leicht abweichenden Laufverhalten der Proteine. Die Ergebnisse zeigen, dass die produzierten MSH-TP15-Antikörpervarianten keine Verunreinigungen durch andere Proteine und die erwartete Molekülmasse besitzen. Die Konzentration der Antikörper wurde anschließend mittels *Bradford-Assay* bestimmt. Routinemäßig konnten pro Transfektion 2-3 mg Antikörper hergestellt werden, wobei sich alle drei Antikörpervarianten gleich gut exprimieren und reinigen ließen.

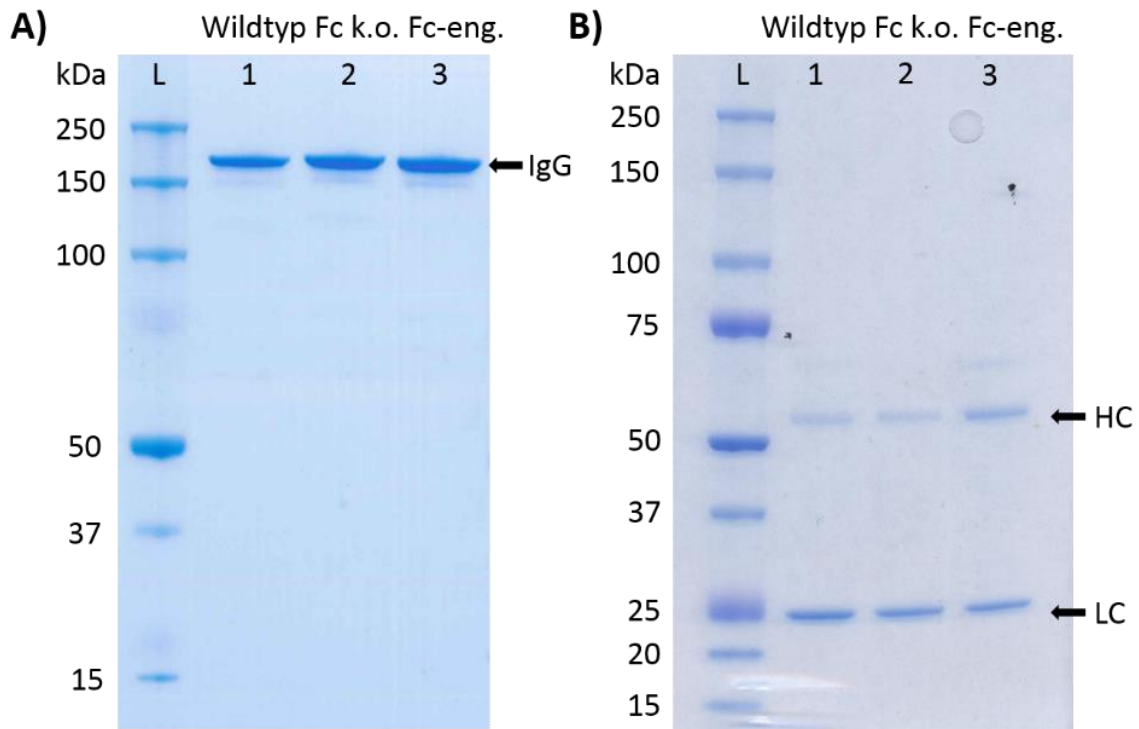


Abbildung 5: Analyse der Molekülmasse und Reinheit der MSH-TP15-Antikörpervarianten. Die produzierten Antikörper wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unter nicht-reduzierenden (A) und reduzierenden Bedingungen (B) untersucht. Es wurden je 8 μ l MSH-TP15 (1), MSH-TP15 Fc k.o. (2) und MSH-TP15 Fc-eng. (3) Antikörper zusammen mit einem Proteinstandard (L) aufgetragen. Die MSH-TP15 Antikörper unter nicht-reduzierenden Bedingungen (A; ca. 150 kDa) und die leichten Ketten (LC; ca. 25 kDa) sowie die schweren Ketten (HC; ca. 55 kDa) unter reduzierenden Bedingungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.2. Bindungseigenschaften der MSH-TP15-Antikörpervarianten

Um die Bindungseigenschaften der MSH-TP15 Antikörpervarianten zu untersuchen, wurden diese mit der Myelomzelllinie L363, sowie mit BHK-Zellen, die die niedrig- bzw. hochaffine Variante des humanen Fc γ R1IIa exprimieren (CD16a-F bzw. CD16a-V BHK-Zellen) in durchflusszytometrischen Experimenten getestet. Zum einen sollte die Fähigkeit der Antikörper, an ICAM-1 positive Myelomzellen (exemplarisch wurden L363-Zellen verwendet) zu binden, nachgewiesen werden, zum anderen sollten die MSH-TP15-Varianten hinsichtlich ihrer Bindung an den aktivierenden Fc γ R1IIa miteinander verglichen werden, um die funktionellen Auswirkungen der Mutationen im Fc-Teil zu überprüfen.

Alle drei MSH-TP15-Antikörpervarianten zeigten eine vergleichbare konzentrationsabhängige Bindung an die antigenexprimierenden L363-Zellen mit mittleren effektiven Konzentrationen (*half maximal effective concentration*, EC₅₀) im niedrigen nanomolaren (nM) Bereich zwischen 0,62 und 0,95 nM (Abb. 6 und Tab. 12).

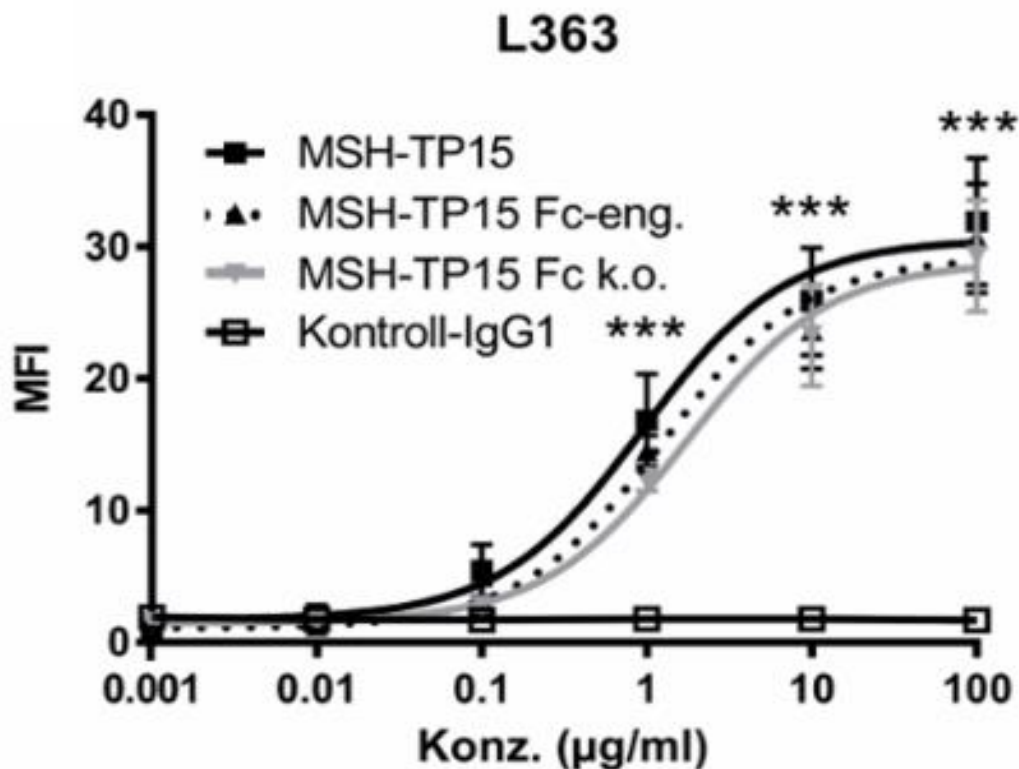


Abbildung 6: Darstellung der Bindungseigenschaften der MSH-TP15-Antikörper. Die spezifische Antigen-Bindung der MSH-TP15-Antikörper wurde mit L363-Myelomzellen gemessen. Als Negativkontrolle diente der CD20 Antikörper Rituximab (Kontroll-IgG1). Alle durchflusszytometrischen Versuche wurden mit je 500.000 Zellen/Probe durchgeführt. Die MSH-TP15-Antikörper wurden in aufsteigender Konzentration von 0.001 bis 100 µg/ml eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde der *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG* (1:20 in PBA) benutzt. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. Die Versuche wurden für jede Zelllinie mindestens 5-Mal wiederholt. *** $p < 0.001$ MSH-TP15 Antikörpervarianten im Vergleich zu Kontrollantikörper. Alle drei MSH-TP15-Antikörpervarianten zeigten eine vergleichbare konzentrationsabhängige Bindung. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden zwei stabil transfizierte BHK-Linien verwendet, die nur den FcγRIIIa mit Valin an Position 158 (CD16a-158V) und damit den hoch-affinen Rezeptor oder den niedrig-affinen Rezeptor mit Phenylalanin (CD16a-158F) exprimieren (Glorius et al. 2013). Dieser genetische Polymorphismus führt zu unterschiedlicher Affinität von IgG-Antikörpern für CD16a im Menschen und kann Einfluss auf die Therapie mit IgG-Antikörpern haben (Mellor et al. 2013; Koene et al. 1997). Die S239D und I332E Mutation in der MSH-TP15 Fc-eng. Variante sollte im Vergleich zum MSH-TP15 Wildtyp IgG1-Antikörper zu einer höher-affinen Bindung an beide Allelvarianten führen, wohingegen der MSH-TP15 Fc k.o. mit den L234F/L235/P331S Mutationen, keine Bindung an den FcγRIIIa mehr zeigen sollte (Oganesyanyan et al. 2008; Lazar et al. 2006).

Wie in Abb. 7A und B aufgeführt, ist die Bindung von MSH-TP15 an den niedrigaffinen CD16a-158F deutlich geringer als an die hochaffine CD16a-158V Rezeptorvariante. Wie beabsichtigt durch die

Mutationen im MSH-TP15 Fc-eng., bindet diese Antikörpervariante signifikant stärker an beide Allelvarianten als der Wildtyp MSH-TP15 IgG1-Antikörper. Für die Bindung des MSH-TP15 Fc-eng. wurden EC_{50} -Werte von unter 30 nM ermittelt (Tab. 12). Die EC_{50} -Werte für die Wildtypvariante lagen bei 340 nM und ca. 1 μ M womit im Vergleich eine 23- bzw. 37-fach stärkere Bindung an CD16-158F als an CD16a-158V durch die S239D/I332E Mutationen des MSH-TP15 Fc-eng. im Vergleich zum Wildtyp MSH-TP15 erreicht wurden. Der MSH-TP15 Fc k.o. bindet wie erwartet an keine der zwei Allelvarianten des Fc γ RIIIa, was darauf schließen lässt das durch die L234F/L235/P331S Mutation, er die Fähigkeit an den Fc γ RIIIa zu binden verliert (Abb. 7; Tab. 12).

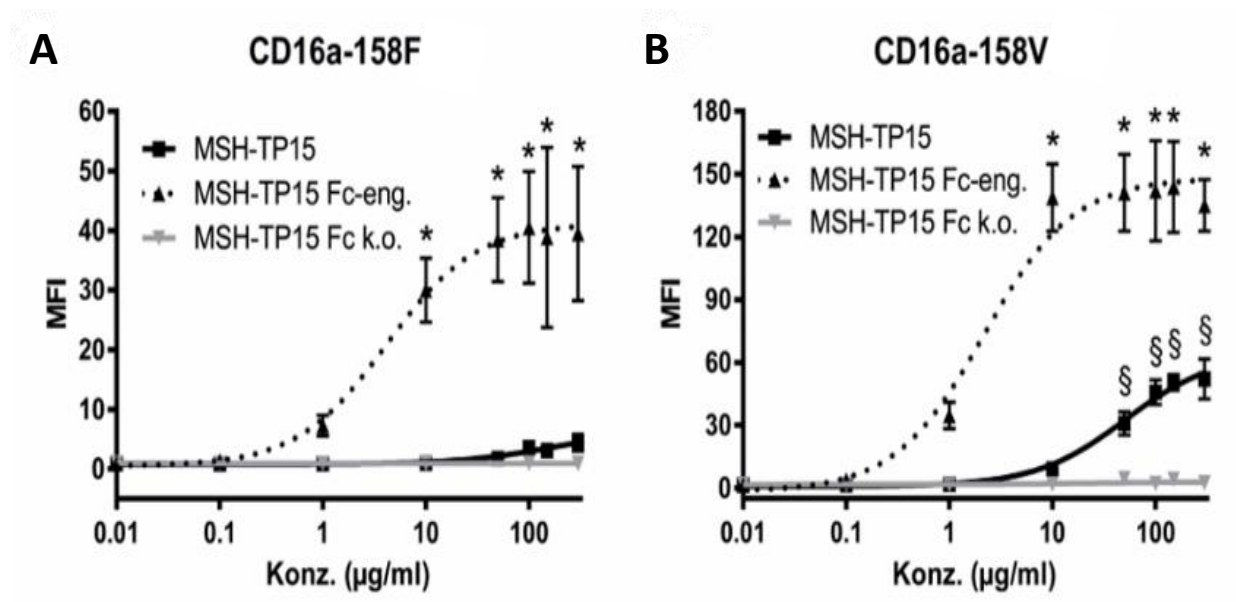


Abbildung 7: Darstellung der Bindungseigenschaften der MSH-TP15-Antikörper. Die spezifische Bindung an den humanen Fc γ RIIIa wurde mit BHK-Zellen, die entweder CD16-158F (A) oder CD16a-158V (B) stabil exprimierten, gemessen. Die MSH-TP15-Antikörper wurden in aufsteigender Konzentration von 0,001 bis 100 μ g/ml eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde der FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG (1:20 in PBA) benutzt. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. Die Versuche wurden für jede Zelllinie mindestens 5-Mal wiederholt. * $p < 0,05$ MSH-TP15 Fc-eng. im Vergleich zu MSH-TP15 Fc k.o.; § $p < 0,05$ MSH-TP15 im Vergleich zu MSH-TP15 Fc k.o.. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

Tabelle 12: Mittlere effektive Konzentrationen der MSH-TP15 Antikörper für die Bindung auf L363- und CD16a-exprimierenden BHK-Zellen

Antikörper	MSH-TP15	CI 95%	MSH-TP15 Fc-eng.	CI 95%	MSH-TP15 Fc k.o.	CI 95%
EC_{50} , L363 (nM)	0,7	3,1 nM - 11,1 nM	0,6	1,2 nM - 10,5 nM	0,9	1,3 nM - 9,3 nM
EC_{50} , BHK CD16a-158V (nM)	340	167,6 nM - 687,3 nM	14,7	6,6 nM - 31,5 nM	-	n.m.
EC_{50} , BHK CD16a-158F (nM)	1017,3	148,3 nM - 6,9 μ M	27,7	7,4 nM - 102,7 nM	-	n.m.

Die mittlere effektive Konzentration ist in nanomolar (nM) angegeben. CI 95% = 95% Konfidenzintervall; n.m.= Berechnung nicht möglich.

3.3. Untersuchung zu antiproliferativen Effekten durch MSH-TP15 bei Myelomzellen

Zu den direkten Wirkmechanismen von Antikörpern gehört die Hemmung des Zellwachstums von Tumorzellen nach Bindung des Antigens auf der Zelloberfläche. Die direkte zytotoxische Wirkung des MSH-TP15 Antikörpers wurde anhand von Proliferationsinhibitionsversuchen mit dem Wildtyp-Antikörper untersucht. Zwei ICAM-1-exprimierende Myelomzelllinien, L363 und MM1.S, wurden auf ihr Wachstum in Anwesenheit von steigenden MSH-TP15- bzw. Kontroll-Antikörperkonzentrationen nach 72 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Nur bei der L363 Myelomzelllinie konnte der MSH-TP15-Antikörper eine signifikante Reduktion der Zellmasse bei einer Konzentration von 100 µg/ml induzieren, wohingegen der anti-EGFR-IgG1 Antikörper Cetuximab, der nicht auf Myelomzellen bindet bei dieser Konzentration keinen antiproliferativen Effekt zeigte (Abb. 8A). Auf die MM1.S-Zellen hatte MSH-TP15 auch bei 100 µg/ml keinen antiproliferativen Effekt (Abb. 8B).

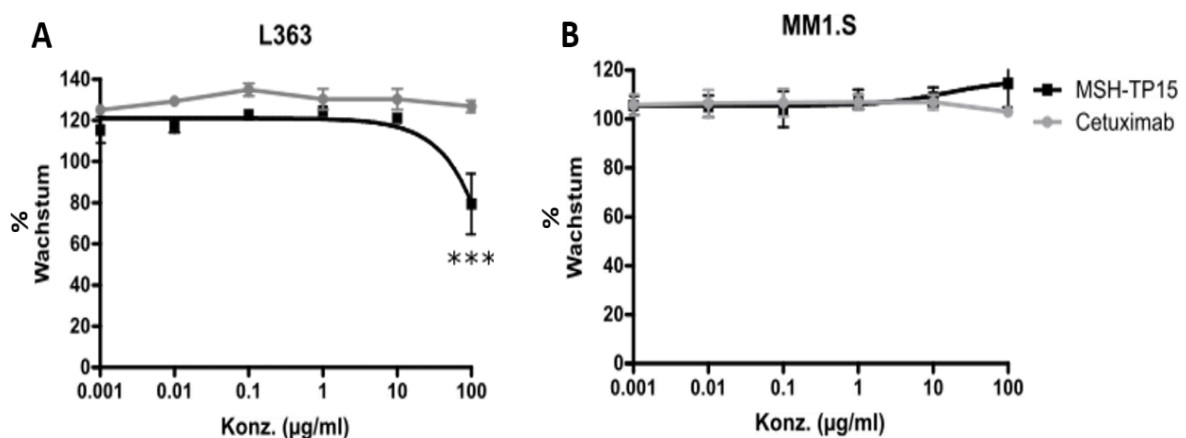


Abbildung 8: Effekte des MSH-TP15 Antikörpers auf das Wachstum von Myelomzellen. L363- (A) bzw. MM1.S-Zellen (B) wurden für 72 h mit aufsteigenden Antikörperkonzentrationen von MSH-TP15 (schwarz) oder dem Kontrollantikörper Cetuximab (grau) inkubiert. Die metabolische Mitochondrienaktivität, wurde prozentual im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels MTS Assay in Triplikaten bestimmt. Es wurden pro Zelllinie mindestens 2 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) graphisch dargestellt. *** $p < 0.001$ im Vergleich zum Kontrollantikörper. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

3.4. Untersuchungen zu Fc-vermittelten Effektormechanismen der MSH-TP15-Antikörpervarianten

Die Fähigkeit der MSH-TP15 Antikörpervarianten indirekte Wirkmechanismen zu vermitteln, wurde mit ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen untersucht, wobei die Versuche zur Effektorzelllyse mit isolierten PBMC oder NK-Zellen und die Versuche zu Komplementvermittelten Lyse mit humanem Serum gesunder Spender durchgeführt wurden.

Um zu untersuchen, ob die MSH-TP15 Antikörpervarianten in der Lage sind ADCC gegen Tumorzellen zu vermitteln, wurden die ICAM-1-exprimierenden Myelomzelllinien INA-6, L363, U266 und MM1.S verwendet. In ersten Experimenten wurden frisch isolierte PBMC gesunder Spender in einem Effektor-zu-Zielzellverhältnis (E:T ratio) von 80:1 mit steigenden Antikörper-Konzentrationen eingesetzt. Der ADCC-optimierte MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper vermittelte dosisabhängig signifikante Lyse aller 4 Myelomzelllinien mit mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50}) im niedrigen nanomolaren Bereich (Abb. 9 und Tab. 13). Nur eine maximal 5%ige Lyse konnte mit dem Wildtyp-IgG1 MSH-TP15 in Konzentrationen von mehr als 10 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden. Der MSH-TP15 Fc k.o. vermittelte keine Tumorzelllyse und verhielt sich wie der Kontroll-IgG1-Antikörper (Abb. 9).

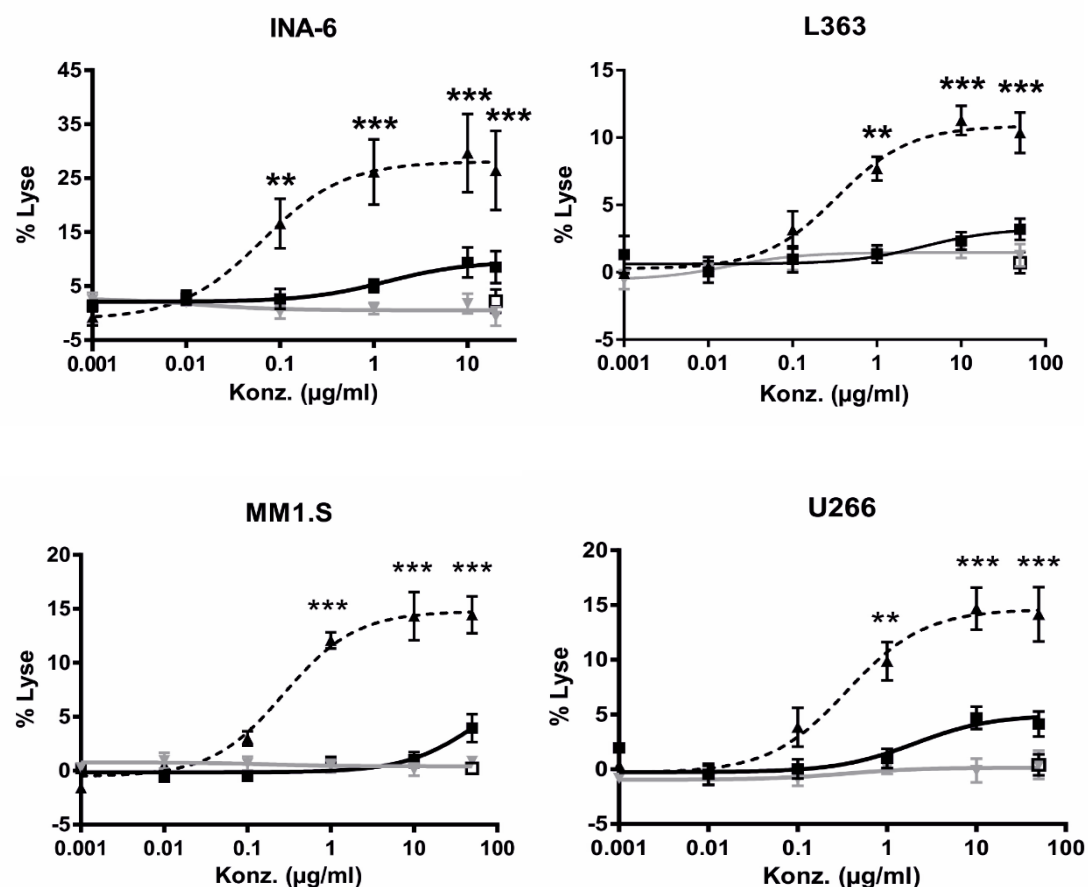


Abbildung 9: ^{51}Cr -Freisetzungsversuche mit den Myelomzelllinien INA-6, L363, MM1.S und U266 und PBMC zur Untersuchung der ADCC-Aktivität der MSH-TP15-Antikörpervarianten. Der MSH-TP15 Fc-eng. (gestrichelte schwarze Linie, ▲) zeigte ADCC-Aktivität gegen alle 4 Myelomzelllinien und rekrutierte effektiv PBMC für die Tumorzelllyse. Nur eine geringfügige Lyse konnte mit dem Wildtyp-IgG1 MSH-TP15 (schwarze Linie, ■) erreicht werden. Der MSH-TP15 Fc k.o. (graue Linie, ▼) hatte keinen Effekt. Effektorzell-zu-Zielzell-Verhältnis (E:T ratio) = 80:1. Als Negativkontrolle diente ein Kontroll-IgG1-Antikörper (□) in der höchsten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Die Versuche wurden pro Zelllinie mindestens 4 Mal in Triplikaten durchgeführt % Lyse = antikörpervermittelte Lyse der Tumorzellen. *** $p < 0.001$ im Vergleich zum MSH-TP15 Fc k.o.; ** $p < 0.01$ im Vergleich zum MSH-TP15 Fc k.o.. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

Tabelle 13: Mittlere effektive Konzentrationen des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers gegen unterschiedlichen Myelmozelllinien.

Zelllinie	INA-6	L363	MM1.S	U266
EC ₅₀ (nM)	0,4	2,2	1,8	2,4
EC ₅₀ (µg/ml)	0,06	0,3	0,2	0,3
CI 95%	45 pM - 2,4 nM	865,3 pM - 7,7 nM	631,2 pM - 5,2 nM	829,3 pM - 17,1 nM

Die mittlere effektive Konzentration ist in nM (Nanomolar) und µg/ml angegeben. CI 95% = 95% Konfidenzintervall.

Wie beabsichtigt führte die S239D/I332E Mutation des MSH-TP15 Fc-eng., die eine höhere Affinität des Antikörpers für beide Allelvarianten von CD16a bewirkt, zu erhöhter ADCC-Aktivität des Antikörpers im Vergleich zum Wildtyp-Antikörper MSH-TP15. Die L234F/L235E/P331S-Mutationen des MSH-TP15 Fc k.o. Antikörpers führte zum Verlust der Fähigkeit, PBMC über die Bindung an FcγR zu rekrutieren und ADCC zu induzieren, obwohl der Antikörper mit derselben Affinität wie MSH-TP15 und MSH-TP15 Fc-eng. an die Tumorzellen bindet (vergleiche Abb. 6).

Um zu untersuchen, ob die in den PBMC zu 5-30% enthaltenen NK-Zellen die Lyse der Tumorzellen durch MSH-TP15 und MSH-TP15 Fc-eng. vermitteln, wurden parallel Experimente mit PBMC und aufgereinigten NK-Zellen desselben Spenders durchgeführt. NK-Zellen exprimieren in der Regel nur den aktivierenden FcγRIIIa/CD16a und gelten als die Effektorzellpopulation im Blut, die IgG1-Antikörper für die spezifische Tumorzelllyse rekrutieren. Deshalb wurden für diese Versuche aus PBMC gesunder Spender durch magnetische Zellsortierung auch die NK-Zellen isoliert. Vor und nach der NK-Zell-Aufreinigung wurden Proben entnommen und durch durchflusszytometrische Messungen der Oberflächenmarker CD3 und CD56 der Anteil an NK-Zellen und die Reinheit der Präparationen sowie die Vitalität überprüft. T-Zellen sind positiv für CD3 und negativ für CD56, wohingegen NK-Zellen CD56-positiv und CD3-negativ sind. Wie in Abbildung 10A exemplarisch gezeigt, war in dieser PBMC-Präparation ein Anteil von 27,3% CD56-positiven NK-Zellen und 39% CD3-positiven T-Zellen enthalten. Nach der Aufreinigung lag der Anteil von CD56-positiven NK-Zellen bei 98,7% (Abb. 10B). Für die ADCC-Experimente wurden nur Präparationen verwendet, bei denen die Vitalität der Zellen (7-AAD-negativ) über 95% lag und nur NK-Zellen, die über 95% CD56-positiv waren. Eine Typisierung des Spenders, um den CD16a-158V/F-Polymorphismus zu bestimmen, wurde nicht durchgeführt.

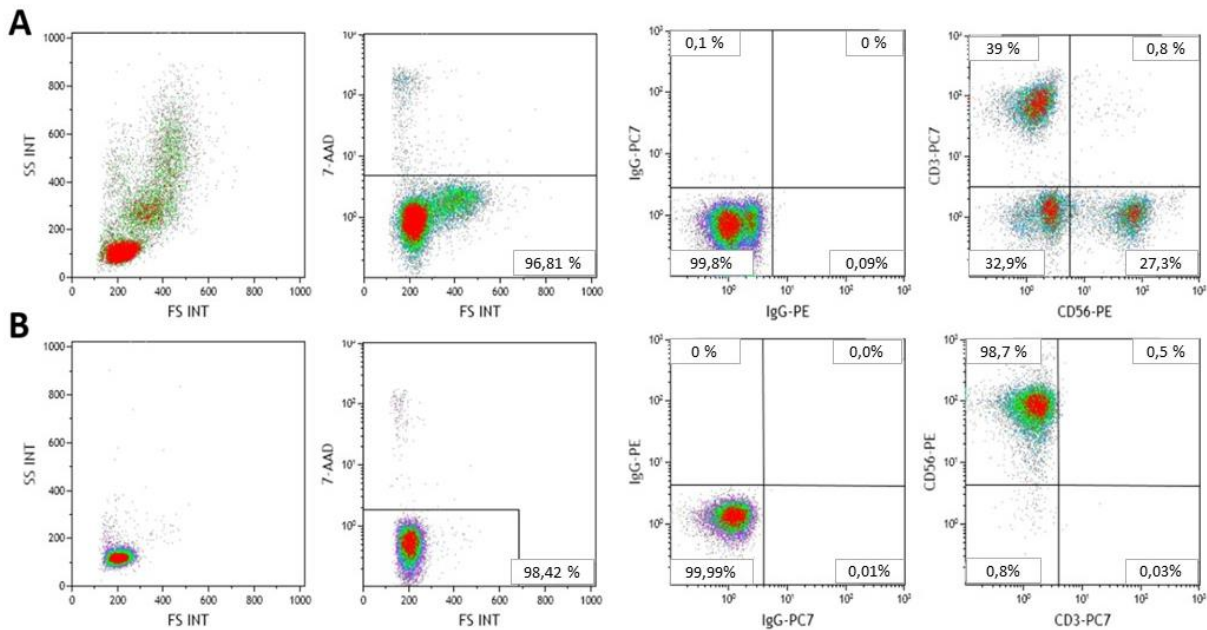


Abbildung 10: Exemplarische durchflusszytometrische Überprüfung einer NK-Zell-Aufreinigung. Vor **(A)** und nach **(B)** der NK-Zell-Aufreinigung aus den PBMC eines gesunden Spenders wurden die Zellen mit CD3-PC7 und CD56-PE bzw. den Isotypkontrollen IgG-PE und IgG-PC7 und dem Vitalitätsfarbstoff 7-AAD inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Beide Zellpräparationen hatten eine Vitalität von über 96 % (7-AAD-negativ). Vor der Aufreinigung waren 27,3% CD56-positive NK-Zellen sowie 39% CD3-positive T-Zellen in den PBMC vorhanden **(A)**. Nach der Aufreinigung war der NK-Zellanteil (CD56-positiv) auf 98,7% gestiegen und nur noch 0,03 % CD3-positive T-Zellen vorhanden **(B)**.

Anschließend wurden die so isolierten NK-Zellen parallel mit den PBMC der gesunden Spender, 10 µg/ml der MSH-TP15-Antikörpervarianten und L363, INA-6 oder frischen Tumorzellen von Patientenzellen in ⁵¹Cr-Experimenten getestet. Im Vergleich zum Kontroll-Antikörper konnten – auch gegen die Tumorzellen von Myelompatienten – mit 10 µg/ml signifikante Lyseraten mit dem ADCC-optimierten MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper erzielt werden, wobei die prozentuale Lyse mit NK-Zellen höher war als mit den PBMC (Abb. 11). Die ADCC-Aktivität des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers war höher als die des Wildtyp-Antikörpers MSH-TP15, bei dem auch mit NK-Zellen als Effektorzellen keine statistisch signifikante Lyse im Vergleich zum Kontroll-IgG1 erreicht werden konnte. Der MSH-TP15 Fc k.o. vermittelte wie erwartet keine ADCC und war auch mit isolierten NK-Zellen ineffektiv. Diese Versuche zeigen, dass MSH-TP15 Fc-eng. effektiv ADCC gegen Tumorzellen durch NK-Zellen vermitteln kann. Die Tumorzelllyse wird dabei durch die verbesserte Bindung des optimierten Fc-Teils von MSH-TP15 Fc-eng. im Vergleich zum Wildtyp-IgG1-Antikörper MSH-TP15 an den aktivierenden FcγRIIIa auf den NK-Zellen erreicht.

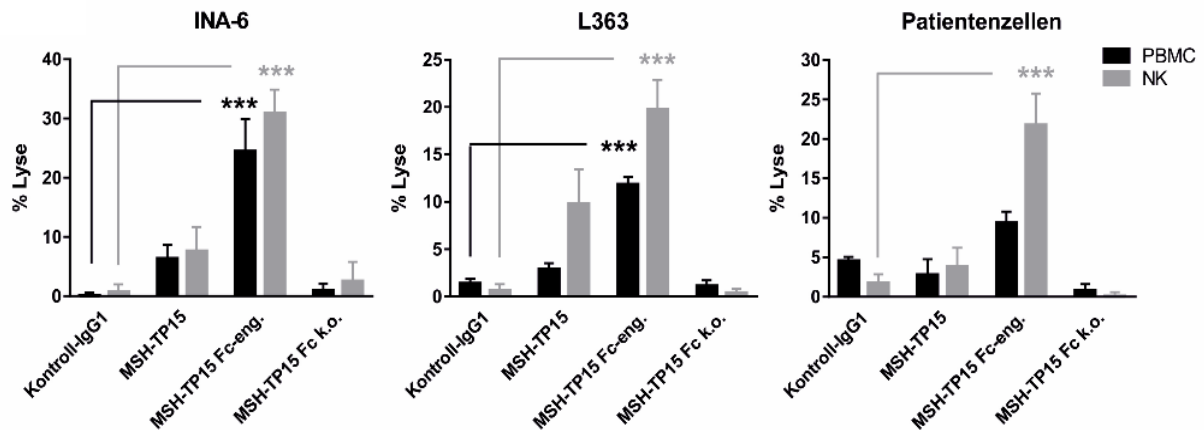


Abbildung 11: ^{51}Cr -Freisetzungsversuche mit Myelomzelllinien INA-6 und L363 und frischen Patientenzellen: Vergleich der ADCC-Aktivität der MSH-TP15-Antikörper gegen INA-6, L363 und frische isolierte Tumorzellen von Patienten mit PBMC (E:T ratio = 80:1) bzw. NK-Zellen (E:T ratio = 10:1). Alle Antikörper wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Kontroll-IgG1-Antikörper. Die Versuche wurden in Triplikaten mindestens 4 Mal durchgeführt. % Lyse = antikörpervermittelte Lyse der Tumorzellen; *** $p < 0.001$ im Vergleich zum Kontrollantikörper. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

Um die CDC-Aktivität der MSH-TP15-Antikörpervarianten zu untersuchen, wurden ^{51}Cr -Freisetzungsversuche mit humanem Serum, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörper und ICAM-1-exprimierenden Daudi Burkitt-Lymphomzellen durchgeführt. Die Fc-Modifikation S239D/I332E, die sich im MSH-TP15 Fc-eng. findet, zeigte in den Versuchen von Lazar und Kollegen keinen Einfluss auf die CDC-Aktivität von IgG1-Antikörpern, wohingegen die L234F, L235E und P331S Mutationen in der Fc k.o. Variante zusätzlich die Bindungsaffinität für C1q dramatisch verringern (Oganesyan et al. 2008; Lazar et al. 2006). Um eine Positivkontrolle in Versuchen mit Komplement zu haben wurde die Daudi Burkitt-Lymphomzelllinie ausgesucht, bei welcher bekannterweise Rituximab eine signifikante CDC-Aktivität aufweist (Engelberts et al. 2016). Im Vergleich zur Positivkontrolle Rituximab zeigte jedoch keiner der MSH-TP15-Antikörper CDC-Aktivität gegen Daudi Burkitt-Lymphomzellen und konnte spezifische Tumorzelllyse mit humanem Serum vermitteln (Abb. 12).

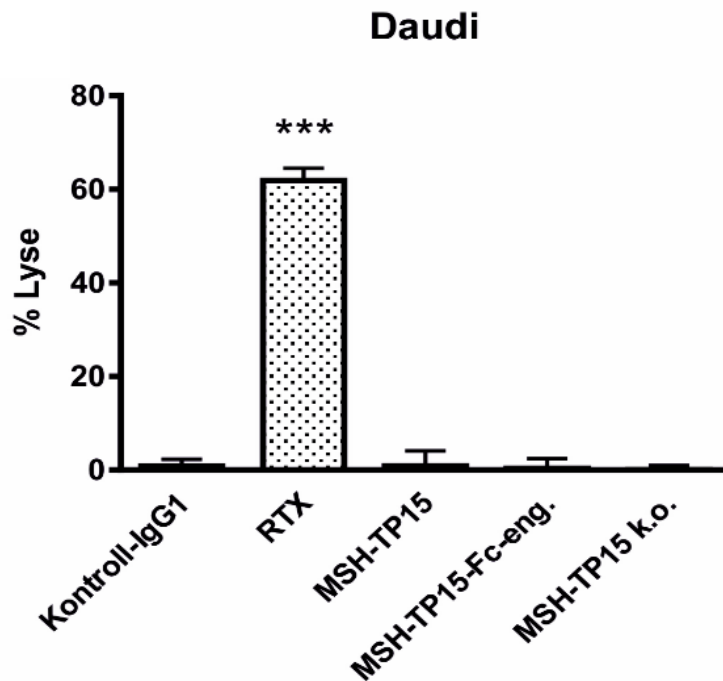


Abbildung 12: ^{51}Cr -Freisetzungsversuche mit Daudi Burkitt-Lymphomzellen: CDC Versuche mit CD20- und ICAM-1-positiven Daudi-Zellen und humanem Serum als Komplement-Quelle. Alle Antikörper wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Rituximab. Als Negativkontrolle diente ein Kontroll-IgG1-Antikörper. Die Versuche wurden in Triplikaten mindestens 3 Mal durchgeführt. % Lyse = antikörpervermittelte Lyse der Tumorzellen; *** $p < 0.001$ im Vergleich zum Kontrollantikörper. Die Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bewertet.

Zusammenfassend vermittelte der MSH-TP15 Fc-eng. in den ADCC-Versuchen spezifische Tumorzelllyse gegen alle 4 Myelomzelllinien und auch gegen Tumorzellen von Myelompatienten. Insgesamt war die prozentuale Lyse des MSH-TP15 Fc-eng. mit NK-Zellen höher als mit PBMC. Mit Wildtyp-IgG1 MSH-TP15 und dem MSH-TP15 Fc k.o. konnten keine signifikanten Tumorzelllysen erreicht werden. Keine Antikörpervariante besaß CDC-Aktivität gegen ICAM-1-positiv Tumorzellen.

Eine direkte Wachstumsinhibition bei den Proliferationsinhibitionsversuchen induzierte der MSH-TP15 nur in geringem Maße und gegen Daudi Burkitt-Lymphomzellen konnte keiner der MSH-TP15 Antikörper spezifische Lyse mit humanem Serum vermitteln. Demnach ist die ADCC-Aktivität der Hauptwirkmechanismus des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers *in vitro*. Wie beabsichtigt führten die S239D/I332E-Mutationen im Fc-Teil des Antikörpers zu erhöhter ADCC-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Antikörper MSH-TP15. Das die Lytische-Aktivität gegen Tumorzellen, insbesondere auch den primären Patientenzellen, ein Fc-vermittelter Effekt des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers ist, zeigt die Fc-Knockout-Variante MSH-TP15 Fc k.o., die trotz vergleichbarer Antigenbindung durch die L234F/L235E/P331S-Mutationen nicht mehr an Fc γ R binden und somit keine Effektorzellen für die Tumorzelllyse rekrutieren kann.

4. Diskussion

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten belegen, dass im Fall der MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpervariante eine Fc-Optimierung von ICAM-1 Antikörpern möglich ist und dadurch die NK-Zelllyse gesteigert werden kann. Die S239D und I332E Mutationen im Fc-Teil des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers führten zu einer erhöhten Bindungsaffinität für beide Allelvarianten des aktivierenden FcγRIIIa/CD16a, der u.a. von NK-Zellen exprimiert wird. Darüber hinaus wird der FcγRIIIa auch von Makrophagen exprimiert und daher könnte durch den MSH-TP15 Fc-eng. auch ADCP vermittelt werden.

In der Tumorthherapie ist nicht nur das Potential der Antikörper direkte und indirekte Wirkechanismen gegen Tumorzellen zu induzieren wichtig, sondern auch ihre biotechnologischen Charakteristika, wie einfache und effektive Reinigung. IgG1 Antikörper zeigen außer diesen Eigenschaften auch die Fähigkeit den neonatalen Rezeptor (FcRn) zu binden und erreichten somit eine lange Halbwertszeit im Serum (Kretschmer et al. 2017; Ghetie und Ward 2000; Bruggemann et al. 1987). Diese Charakteristika tragen zur prominenten Rolle der IgG1 Antikörper in der Tumorthherapie bei. Humane IgG2 können im Vergleich FcγRIIIa effizient aber andere aktivierende Fc-Rezeptoren nur sehr ineffizient binden. Außerdem ist ihre CDC-Aktivität limitiert und stark von der hohen Antigenexpression und Antikörperkonzentration abhängig (Kretschmer et al. 2017; Garred et al. 1989). IgG3 Antikörper zeigten zwar eine starke Fähigkeit komplement- und effektorzellvermittelte Tumorzelllyse zu induzieren (Bruggemann et al. 1987), jedoch ist die Produktion solcher Antikörper bislang eine Herausforderung. IgG3 bilden u.a. sehr leicht Aggregate oder können nicht durch klassische Protein A Chromatographie gereinigt werden. Außerdem binden die meisten nicht den FcRn und erreichen so eine Halbwertszeit von nur 7 Tagen (Stapleton et al. 2011). Obwohl IgG4 Antikörper FcγR in unterschiedlicher Affinität binden können, zeigten sie in Versuchen eine niedrige CDC und ADCC-Aktivität (Bruggemann et al. 1987). In der Klinik vermitteln sie ihren Effekt unabhängig von FcγR (Herbener et al. 2018).

Als Beispiele für IgG1 Antikörper können Rituximab, welcher u.a. für die Behandlung von rezidivierenden fortgeschrittenen Stadien von NHL zugelassen ist, sowie Trastuzumab für die Behandlung von Mammakarzinomen genannt werden (Slamon et al. 2001; Maloney et al. 1997). Für die MM-Therapie wurden Ende 2016/Anfang 2017 die Antikörper Elotuzumab und Daratumumab zugelassen und finden ihre Anwendung aktuell bei vorbehandelten oder nicht auf herkömmliche Chemotherapie ansprechende Patienten, entweder in Kombinationstherapien oder, bei Daratumumab, auch als Monotherapie und in der Erstlinienbehandlung von nicht-transplantierbaren Patienten. Beide Antikörper sind gut verträglich, verbessern das progressionsfreie Überleben, die Tiefe der Remission und das Langzeitüberleben der Patienten (Dimopoulos et al. 2016; Palumbo et al. 2016; Lonial et al. 2016; Lonial et al. 2015).

Allerdings profitieren von der Therapie mit diesen Antikörpern leider nicht alle Patienten, weshalb die Suche nach neuen, effektiven Antikörpern für die klinische Anwendung und die Behandlung dieser Patienten wichtig ist. Zu diesen könnten auch Fc-optimierte ICAM-1 Antikörper wie unser MSH-TP15 Fc-eng. gehören, welche das Potenzial haben eine erhöhte Antitumoraktivität und besseres Ansprechen der Patienten auf die Antikörpertherapie aufzuweisen.

Therapeutische Antikörper können über verschiedene Mechanismen Zytolyse von Tumorzellen vermitteln. Allgemein werden direkte und indirekte Wirkmechanismen unterschieden. Durch spezifische Bindung des Antikörpers an seine Zielstruktur auf der Tumorzelloberfläche können Antikörper direkte Effekte auslösen. Zu diesen gehören z.B. die Blockierung pathophysiologischer Signalwege oder Aktivierung von pro-apoptotischer Signalwegen (Weiner et al. 2012). Der MSH-TP15 konnte in unseren Proliferationsinhibitionsversuchen keine direkte Tumorzelllyse von ICAM-1-positiven Tumorzellen vermitteln. Andere Wirkmechanismen wie z.B. die Interaktion mit Stromazellen wurden jedoch bislang nicht untersucht und könnten einen direkten Effekt dieses Antikörpers zeigen.

Indirekte, Fc-vermittelte Effekte von therapeutischen Antikörpern werden durch Aktivierung von Komponenten des Immunsystems induziert. Zum einen können Effektorzellen nach Bindung von IgG1-Antikörpern an Fc γ R rekrutiert und aktiviert werden (ADCC, ADCP), zum anderen kann das Komplementsystem über die Bindung von C1q an die CH2-Domäne aktiviert werden (CDC) (Redman et al. 2015; Weiner et al. 2012). Der Wildtyp-IgG1 MSH-TP15 zeigte in unseren Versuchen als Hauptwirkmechanismus eine geringe ADCC- und keine CDC-Aktivität, sodass durch Fc-Engineering versucht wurde, die Effektorfunktionen des Antikörpers zu verbessern. Durch Fc-Optimierung wurde in der Vergangenheit bereits versucht, die Affinität von IgG1-Antikörpern zu aktivierenden Fc γ R und für C1q zu verbessern, um so die ADCC-, ADCP- oder CDC-Aktivität von IgG1-Antikörpern zu erhöhen (Lazar et al. 2006; Kellner et al. 2017). Die S239D/I332E-Mutationen, welche im MSH-TP15 Fc-eng. verwendet wurden, zeigten in Versuchen von Lazar und Kollegen eine Erhöhung der Affinität der Antikörper zum aktivierenden Fc γ R11a, was zu einer höheren ADCC-Aktivität führte (Lazar et al. 2006). Dies ließ sich in unseren ⁵¹Cr-Freisetzungsversuchen mit NK-Zellen und PBMC gesunder Spender mit dem MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper ebenfalls erreichen. Er vermittelte spezifische Tumorzelllyse gegen verschiedene Leukämie- und Lymphom-Zelllinien und war auch effektiv gegen frisch isolierte Myelom-Zellen von Patienten. Der MSH-TP15 Fc-eng. erreichte bei diesen Tumorzelllinien EC₅₀ Werte im niedrigen nanomolaren Bereich. Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten eine signifikant bessere Bindung von MSH-TP15 Fc-eng. an beide Allelvarianten von Fc γ R11a (CD16a-158V und CD16a-158F) im Gegensatz zu der Wildtyp-Variante MSH-TP15. Versuche mit der MSH-TP15 Fc k.o. Variante, die mit den L234F/L235E/P331S-Mutationen konstruiert worden war, welche zum Verlust der Fähigkeit von Antikörpern ADCC und CDC zu vermitteln führen (Oganessian et al. 2008), bestätigten die spezifischen, NK-Zell-abhängigen

Antitumoreffekte von MSH-TP15 Fc-eng., da die MSH-TP15 Fc k.o. Variante durch den Verlust der Bindung beider Allelvarianten von FcγRIIIa auch keine Tumorzelllyse in den ADCC-Versuchen vermitteln konnte. Trotz Bindung an die Tumorzellen war keine MSH-TP15-Antikörpervariante in der Lage CDC zu vermitteln und effektiv das Komplementsystem zu aktivieren. Den bisherigen Ergebnissen nach zu urteilen, ist daher die ADCC-Aktivität der primäre Wirkmechanismus des MSH-TP15 Fc-eng. Antikörpers *in vitro*, wobei bislang nur die NK-Zellen und nicht z.B. Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten untersucht worden sind.

In Tiermodellen sowie in klinischen Versuchen von Antikörpern wie Rituximab und Trastuzumab, zeigte sich, dass die gezielte Bindung an FcγR von Effektorzellen eine wichtige Komponente ihrer therapeutischen Aktivität ist (Clynes et al. 2000). In Versuchen mit Mäusen welche keine aktivierenden FcγR exprimierten, haben diese Antikörper ihre therapeutische Aktivität verloren, während bei Mäusen welche den inhibitorischen FcγRIIb nicht exprimierten, die Aktivität signifikant erhöht worden ist (Clynes et al. 2000). Auch unterschiedliche FcR-Polymorphismen von Patienten haben Einfluss auf die Bindungsaffinität von IgG1 Antikörpern und auf das Ergebnis der Behandlung (Cartron 2002; Koene et al. 1997).

NK-Zellen sind eine wichtige Lymphozyten-Untergruppe bei der Tumorbekämpfung, da die Erkennung und Eliminierung von maligne entarteten Zellen zu ihren natürlichen Funktionen zählt (Seidel et al. 2013), und bereits früh und vor den B- und T-Lymphozyten nach einer Stammzelltransplantation rekonstituieren (Williams und Gress 2008). Daher wäre die effektive Rekrutierung von NK-Zellen, z.B. durch Fc-engineerte Antikörper, die verstärkt NK-Zellen über FcγRIIIa aktivieren, insbesondere für die Myelomtherapie interessant. Zurzeit sind aber keine Fc-optimierten Antikörper für die MM-Therapie zugelassen. Zur MM-Therapie gehörende Medikamente, wie IMiDs (z.B. Lenalidomid oder Thalidomid) können die NK-Zellen zusätzlich stimulieren und die ADCC-vermittelte Tumorzelllyse von Antikörpern bei der Therapie des MM noch weiter steigern (Hayashi et al. 2005). Generell ist die Kombination von PI und IMiDs mit den monoklonalen Antikörpern Daratumumab und Elotuzumab sehr effektiv für die Therapie von MM-Patienten und führt zu einem verbesserten medianen Überleben der Patienten bei meist guter Verträglichkeit (Dimopoulos et al. 2016; Palumbo et al. 2016; Lonial et al. 2015). Dabei zeigten z.B. Patienten, die homozygot, die hochaffine FcγRIIIa-Allelvariante CD16a-158V exprimierten, signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie mit Elotuzumab, was mit einer effektiveren Antitumoraktivität durch die Aktivierung der NK-Zellen durch Elotuzumab im Zusammenhang stehen könnte (Jakubowiak et al. 2016). So könnten ADCC-optimierte Antikörper insbesondere beim Myelom und in Kombination mit PI und IMiDs sehr vielversprechend sein.

Der MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper, der effektiv NK-Zellen rekrutieren und ADCC gegen Myelomzellen vermitteln konnte, wurde durch die Mutationen S239D und I332E nach Lazar und Kollegen für die

Bindung an FcγRIIIa optimiert (Lazar et al. 2006). Dieselben Mutationen zeigten auch im Fc-optimierten, anti-HM1.24 Antikörper XmAb5592, in präklinischen Studien *in vitro* und *in vivo* eine hohe ADCC-Aktivität und spezifische MM-Zell-Lyse (Tai et al. 2012). Das Zielantigen HM 1.24 (CD317/BST2) ist ein Transmembranprotein, welches u.a. auf malignen Plasmazellen exprimiert ist (Ohtomo et al. 1999; Tai et al. 2012). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von HM1.24 im Gefäßsystem von breitem Spektrum Medikamentenresistenter solider Lungen-, Pankreas-, Brust-, Nierentumore sowie Lymphomen beschrieben, was dieses Antigen zu einer interessanten Zielstruktur für die Tumorthherapie macht (Tai et al. 2012). XmAb5592 wurde aber bislang nicht in klinischen Studien getestet. Ein weiterer, in klinischen Studien untersuchter Fc-optimierter Antikörper, ist der humanisierte CD-19 Antikörper Xmab5574/MOR208. Auch dieser wurde mit den S239D/I332E-Mutationen Fc-optimiert und zeigte erhöhte ADCC- und ADCP-Aktivität gegen mehrere NHL- und Leukämie-Zelllinien (Kellner et al. 2013; Horton et al. 2008). In der klinischen Phase II-Studie wies die MOR208-Monotherapie eine vielversprechende Aktivität bei Patienten mit DLBCL, Follikulären Lymphom und weiteren NHL, welche sich sogar bei Rituximab-Refraktären Tumoren zeigte (Jurczak et al. 2018). Für die Therapie des Mammakarzinoms wird zur Zeit in Phase III-Studien der Fc-engineerte, anti-HER2-gerichtete Antikörper Margetuximab mit den fünf Mutationen L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L untersucht. Diese Mutationen führten *in vitro* zu erhöhter ADCC-Aktivität gegen HER2-positive Tumorzellen (Nordstrom et al. 2011). In den klinischen Studien, war Margetuximab gut verträglich und zeigte trotz stark vorthesapierter Patienten klinische Aktivität, speziell bei Patienten mit Mammakarzinom mit meistens Nebenwirkungen von Grad 1 und 2 wie Anämie, Diarrhoe, Übelkeit oder Fieber (Bang et al. 2017). Die klinischen Studien mit den Fc-engineerten Antikörpern Margetuximab und MOR208 zeigen, dass sich solche ADCC-optimierten IgG-Antikörper für die Tumorthherapie eignen, wobei die Verträglichkeit auch von der Expressionsbreite des Antigens abhängig ist (Jurczak et al. 2018; Bang et al. 2017). Unser Fc-optimierter MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper könnte in klinischen Versuchen mit MM Patienten Antitumoraktivität aufweisen und eine interessante Therapieoption werden.

Da der Beitrag einzelner Effektormechanismen, zur therapeutischen Aktivität von Antikörpern noch nicht völlig verstanden ist, ist die Auswahl einer Strategie beim Fc-Engineering nicht trivial. Deshalb könnte die gleichzeitige Optimierung mehrerer Effektormechanismen, ein vielversprechender Ansatz sein. Eine duale Modifikation von Effektorfunktionen wie ADCC und CDC könnte weitere Vorteile mit sich bringen. In Situationen wo, z.B. die Zugänglichkeit für Effektorzellen, welche ADCC vermitteln limitiert ist (wie z.B. bei soliden Tumoren), könnte ein weiterer Effektormechanismus eines Antikörpers über Komplement zu Tumorzelllyse führen. Außerdem könnte anhand von Interaktionen zwischen Zielzellen, welche mit Komplement opsoniert worden sind, und anhand von Komplementrezeptoren auf Effektorzellen ein synergistischer Effekt mit ADCC erreicht werden (Gelderman et al. 2004). Erste

Antikörper mit einem dualen Wirkmechanismus wurden bereits entwickelt, wie z.B. ein CDC optimierter CD-20 IgG1 Antikörper, der durch Wirt und Kollegen gleichzeitig als nicht-fucosylierte Variante untersucht wurde. In Ergänzung zu einer erhöhten CDC-Aktivität zeigte dieser durch eine höhere Bindungsaffinität zu FcγRIIIa, auch eine verstärkte ADCC-Aktivität *in vitro* (Wirt et al. 2017; Moore et al. 2010). Jedoch können Wechselwirkungen mit Immunzellen und dem Komplement zu unerwünschten Nebenwirkungen wie z.B. anaphylaktischen Reaktionen führen, wo ein typischer Antikörper, welcher nur über einen Wirkmechanismus wie der MSH-TP15 Fc-eng. seine Wirkung vermittelt, vorteilhaft sein kann. Außerdem ist es schwierig anhand von Tiermodellen den Wirkmechanismus eines Antikörpers in Patienten vorherzusagen (Loisel et al. 2007). Humane FcγRIIIa transgene Mäuse welche ADCC und CDC vermitteln wurden als Tiermodelle für die Untersuchung von Effektormechanismen in der Antikörpertherapie vorgestellt (Smith et al. 2012). Affen könnten jedoch eine effektivere Methode sein, um *in vivo* ADCC oder CDC-Aktivität zu beurteilen.

Um neue Antikörper für die MM Therapie zu entwickeln wird nach geeigneten Zielstrukturen, welche u.a. spezifisch auf Plasmazellen exprimiert werden, gesucht. Das Zielantigen für unsere MSH-TP15 Varianten ist das ICAM-1. Es ist ein Glykoprotein, welches zur Immunoglobulin-Superfamilie gehört und unter physiologischen Bedingungen im Körper in niedrigem Maße auf u.a. Fibroblasten, Epithelzellen und Leukozyten exprimiert wird. Liganden, die an das Glykoprotein binden sind u.a. LFA-1 und Mac-1 (Diamond et al. 1993; Marlin und Springer 1987). ICAM-1 erfüllt eine wichtige Funktion bei Zell-Zell-Interaktionen und der Rekrutierung von Immunzellen bei Infektionen oder Verletzungen, wobei es durch inflammatorische Zytokine zur Hochregulation von ICAM-1 auf Endothelzellen und Leukozyten, der Adhäsion der Immunzellen an die Endothelwand und zu deren Einwanderung in das Gewebe kommt (Bella et al. 1998; Kawano et al. 1991; Smith et al. 1989). In der Pathophysiologie des MM wird Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder VCAM-1 eine wichtige Rolle in der MM-Zellaggregation sowie der Tumorinvasion und Lokalisation im Knochen zugeschrieben (Schlesinger und Bendas 2015; Kawano et al. 1991). Erhöhte Konzentrationen dieser Glykoproteine im Serum sowie ihre Überexpression auf Tumorzellen ist negativ mit dem Fortschreiten der Erkrankung und der Überlebenszeit von Krebspatienten assoziiert (Terpos et al. 2016; Sampaio et al. 2009; Schmidmaier und Baumann 2008). Außerdem spielt die Interaktion zwischen ICAM-1 und seinen Liganden (z.B. LFA-1) eine wichtige Rolle bei der vorkommenden Makrophagen-vermittelten Medikamentenresistenz von Myelomzellen. Blockierende Antikörper gegen diese Moleküle führten zur Hemmung der Fähigkeit von Makrophagen, Myelomzellen zu schützen (Zheng et al. 2012). Anhand dieser Eigenschaften, kann ICAM-1 ein Ziel für neue Antikörper wie den MSH-TP15-Fc eng. in der MM Therapie darstellen. In *in vitro* und Tiermodellen wurden andere anti-ICAM-1 Antikörper bereits erfolgreich auf Antitumoraktivität untersucht.

Der erste anti-ICAM-1-Antikörper, der gegen humane Myelomzellen entwickelt und getestet wurde, war UV3. UV3 vermittelte spezifische Tumorzelllyse *in vitro* und *in vivo* und verlängerte das Überleben von Mäusen mit humanen ICAM-1-exprimierenden Myelom und soliden Tumoren (Huang et al. 1995; Brooks et al. 2008). Dabei zeigte sich, dass die indirekten Effekte und die Interaktion mit dem Immunsystem für die Antitumoraktivität des Antikörpers essentiell war (Coleman et al. 2006). Auch BI-505, der erste humane anti-ICAM-1 IgG1 Antikörper, welcher in klinischen Studien für therapierefraktäre MM- und SM-Patienten untersucht worden ist (Wichert et al. 2017; Hansson et al. 2015), wirkte in präklinischen *in vivo* Studien in immundefizienten Mäusen über ADCP, einem Fc-vermittelten Effektormechanismus, und inhibierte so signifikant das MM-Zell-Wachstum (Veitonmaki et al. 2013). Um die indirekten Effektormechanismen zu verstärken entwickelten wir mit den MSH-TP15-Fc eng. eine Fc-optimierte Variante eines anti-ICAM-1 Antikörpers. In unseren Untersuchungen wies er erfolgreich eine verstärkte ADCC-Aktivität auf, sodass wir zeigten, dass man die zytotoxische Aktivität von ICAM-1 Antikörpern steigern kann. Durch die Fc-Optimierung könnte diese höher als bei anderen bislang untersuchten anti-ICAM-1 Antikörpern sein.

Außer dem Fc-Engineering rücken auch andere immuntherapeutische Ansätze wie Checkpoint Inhibitoren, CAR-T Zellen oder bispezifische Antikörper in den Vordergrund von Untersuchungen zur Tumorthherapie. Die direkte Modulation von Immunzell-Checkpoint-Rezeptoren durch Antikörper, wurde bislang am meisten für T-Zellen untersucht. Diese Rezeptoren können kostimulierende Signale für die Aktivierung oder Blockierung der Immunantwort von T-Zellen vermitteln (Topalian et al. 2015). Zu den Rezeptoren welche die T-Zell Aktivierung hemmen zählen u.a. der PD-1 und CTLA-4 (Rotte et al. 2018). Erste Antikörper, die gegen Checkpoint-Ziele gerichtet sind, wurden bereits in der Klinik zugelassen. Zu diesen zählt Ipilimumab, welcher gegen den CTLA-4 Rezeptor gerichtet ist und z.B. eine Erhöhung des Gesamtüberlebens in Kombination mit Dacarbazine bei Melanom Patienten im Stadium III-IV in Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Ipilimumab zeigt (Achkar und Tarhini 2017). Als Alternative werden auch Antikörper gegen aktivierende Rezeptoren entwickelt, um die T-Zell Antwort zu stimulieren (Antonia et al. 2016). Insgesamt wurden bislang 6 gegen Checkpoint-Ziele gerichtete Antikörper in der Tumorthherapie zugelassen und weitere 17 sind in fortgeschrittenen Stadien von klinischen Untersuchungen (Rotte et al. 2018). Auch für die Behandlung von MM wurden bereits Checkpoint Inhibitoren untersucht. In präklinischen Studien zeigte eine PD-1/PD-L1 Blockade erhöhte Zytotoxizität gegenüber MM Zellen durch erhöhte NK-Zell und T-Zell Aktivität (Ray et al. 2015). In klinischen Versuchen wurden jedoch mit Checkpoint Inhibitoren als Monotherapie bislang keine wirksame Tumorregression erreicht. (Lesokhin et al. 2016; Suen et al. 2015). Neue therapeutische Ansätze, wo Checkpoint Inhibitoren Teil einer Kombinationsstherapie zusammen mit u.a. IMiDs und Dexamethason sind, zeigten erhöhte Effektivität bei vorbehandelten, nicht auf Therapie ansprechenden Patienten (Thanendrarajan et al.

2017). Diese wurden zwischenzeitlich durch die amerikanischen Behörden gestoppt, da Studien mit Pembrolizumab eine erhöhtes Todesrisiko aufwiesen (U.S. Food and Drug Administration 20.09.2017), sodass weitere Untersuchungen vorsichtig, mit spezieller Aufmerksamkeit auf Toxizität weitergeführt werden müssen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Bedarf an anderen neuen Behandlungsmethoden wie den Fc-optimierten ICAM-1 Antikörpern weiterhin groß ist.

Ein weiteres therapeutisches Konzept bieten die CAR T-Zellen an. CAR T-Zellen sind engineerete T-Zellen, die einen synthetischen Rezeptor aus scFv eines monoklonalen Antikörpers und einer Signal-Domäne von T-Zell-Rezeptor-Komplex (z.B. CD3 ζ) exprimieren. Dieser Rezeptor kann Antigene auf Zielzellen wie monoklonale Antikörper erkennen und dann eine T-Zell-Aktivierung hervorrufen, vergleichbar mit dem T-Zell Rezeptor Signalweg (Ruella und June 2016). Die CAR T-Zellen überwinden einige Einschränkungen von T-Zell Rezeptoren wie z.B. die Notwendigkeit einer Expression und Kostimulation durch MHC-Moleküle, was zu einer MHC-unabhängigen Erkennung von Zielzellen führt (Gross et al. 1989; Kuwana et al. 1987). Seit 2017 sind zwei CAR T-Zell Therapien zugelassen. Zu diesen gehört Tisagenlecleucel (CTL019), eine gegen CD19 gerichtete CAR T-Zell Therapie, welche ihre Anwendung bei Kindern und Jugendlichen mit therapierefraktärer oder rezidivierender akuter lymphatischer Leukämie (ALL) findet (Maude et al. 2018). Geeignete CAR-T Zell Therapien fürs MM sind bereits Bestandteil von klinischen Untersuchungen. Dafür wurden mehrere Zielantigene wie u.a. das *B-Cell maturation antigen* (BCMA) ausgesucht. Mit einer anti-BCMA CAR-T Therapie wurde bereits erfolgreich eine Remission bei Patienten erreicht (Ali et al. 2016). Zu den großen Hindernissen dieser Therapie gehört die Resistenzbildung durch die immunsuppressive MM Mikroumgebung (Ghosh et al. 2018). Die Entwicklung von neuen CAR-T Zellen, welche widerstandsfähig gegenüber diesen Verhältnissen sind, sollte eine spannende Aufgabe in der Zukunft werden.

Ein anderer therapeutischer Ansatz, welcher seit Milstein und Kollegen 1983 verfolgt wurde, sind Antikörper, die an zwei unterschiedliche Antigene oder Epitope binden können (Milstein und Cuello 1983). Dies führt zu einem breiten Wirkungsspektrum bispezifischer Antikörper wie u.a. die Lenkung von Effektorzellen zu Tumorzellen oder das gleichzeitige blockieren von zwei unterschiedlichen Signalwegen (Zhang et al. 2017). Bislang sind zwei bispezifische Antikörper in der Tumorthherapie zugelassen und mindestens 61 weitere werden in klinischen Studien untersucht (Strohl 2018). Als Beispiel kann der 2014 zugelassene anti-CD3 ϵ x anti-CD19 Antikörper Blinatumomab genannt werden, welcher für die Behandlung von therapierefraktärer oder rezidivierender B-Zell ALL-Patienten zu Anwendung kommt. Er kann CD3 positive T-Zellen aktivieren und zu malignen CD19+ B-Zellen lenken (Brischwein et al. 2007; Loffler et al. 2000). Dass bispezifische Antikörper eine neue Therapieoption in der Behandlung von MM sein könnten, zeigten präklinischen Versuche mit BI 836909. BI 836909 ist ein BCMA/CD3 ϵ bispezifischer Antikörper, welcher in *in vitro* Versuchen spezifische Lyse von MM Zellen

vermittelte und zum verlängerten Überleben von Mäusen in Xenograft-Modellen geführt hat (Hipp et al. 2016). Die gleichzeitige Bindung an BCMA-positive Myelomzellen sowie CD3-positive T-Zellen führte zu Aktivierung der T-Zellen und Lyse der BCMA-positiven Zellen (Hipp et al. 2016). Nächste Schritte wie die Untersuchungen von Toxizität sowie Effektivität in MM Patienten sollten zu weiteren wichtigen Erkenntnissen dieser Behandlungsoption beitragen. Ein gemeinsames unerwünschtes Ereignis bei der Therapie mit CAR T-Zellen und bispezifischen Antikörpern ist jedoch das *cytokine-release syndrome* (CRS), welches bis zu lebensbedrohenden Zuständen führen kann (Frey und Porter 2016). Es wird durch vermehrte Aktivierung von T-Zellen und gleichzeitiger Vernichtung von Tumorzellen hervorgerufen, was zu einer großen Freisetzung von Zytokinen führt (Brudno und Kochenderfer 2016; Frey und Porter 2016). Dies zeigt, dass weiterhin der Bedarf an anderen Therapieoptionen wie den Fc-optimierten ICAM-1 Antikörpern besteht, welche z.B. ohne ein Risiko CRS auszulösen geeigneter für die MM Behandlung sein könnten.

Eine klinische Studie mit Enlimomab, einem Maus-Antikörper gegen humanes ICAM-1, für die Behandlung von rheumatoider Arthritis oder akuten Schlaganfällen zeigte eine gute Verträglichkeit und bei Patienten mit früher rheumatoider Arthritis zeigte sich eine klinische Verbesserung unter der Therapie mit Enlimomab (Schneider et al. 1998; Kavanaugh et al. 1996). BI-505, der erste ebenfalls humane, aber nicht Fc-optimierte anti-ICAM-1 IgG1 Antikörper, der in klinischen Studien für therapierefraktäre MM- und SM-Patienten untersucht worden ist, zeigte zum größten Teil eine gute Verträglichkeit. Nebenwirkungen wie Fieber, Körperschmerzen oder Zittern wurden von Patienten höchstens als mild beschrieben (Wichert et al. 2017; Hansson et al. 2015). In klinischen Phase 1 und 2 Studien zeigte BI-505 allerdings keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität der Erkrankung von SM- und MM-Patienten (Wichert et al. 2017; Hansson et al. 2015), weshalb die weitere klinische Entwicklung von BI-505 gestoppt wurde.

Die Fc-Optimierung kann anhand unserer Ergebnisse die Effektivität eines ICAM-1 Antikörper deutlich erhöhen, weshalb Untersuchungen zu Verträglichkeit dieser Antikörper einen großen Nutzen, nicht nur für den von uns generierten MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper, sondern auch für künftige Fc-optimierte ICAM-1 Antikörpern haben könnten. Wichtig für unseren MSH-TP15 Fc-eng. wären Daten zum Sicherheitsprofil von Fc-optimierten ICAM-1 Antikörpern. Dieses wurde bislang jedoch nicht untersucht, was Aussagen zu der Toxizität und sicheren Anwendung des MSH-TP15 Fc-eng. nicht möglich macht.

Fc-optimierte ICAM-1 Antikörper könnten eine neue Therapieoption für das MM darstellen. ICAM-1/CD54 spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von malignen Plasmazellen mit Knochenmarkstromazellen (BMSC), was ein protektives Milieu für die Tumorzellen schafft und zur Chemoresistenz der Tumorzellen unter der Therapie beiträgt (Cook et al. 1997; Schmidmaier und Baumann 2008). Es

ist daher möglich, dass unser MSH-TP15 Fc-eng. Antikörper in diese Interaktionen durch z.B. Blockierung von ICAM-Liganden wie LFA-1 oder Mac-1 eingreift. Weitere Analysen des Epitops an welches unser Antikörper bindet, könnten allgemein zum Verständnis solcher Wirkmechanismen von Fc-optimierten ICAM-1 Antikörpern beitragen und auf potenziell neue hinweisen. Durch die Fc-Optimierung des MSH-TP15 Fc-eng. zeigten wir, dass das zytotoxische Potential von ICAM-1 Antikörpern *in vitro* erhöht werden kann. Dieses könnte sich auch in weiteren klinischen Versuchen widerspiegeln, in denen bislang ICAM-1 Antikörper wenig Antitumoraktivität aufgewiesen haben. Unser MSH-TP15 Fc-eng. hätte somit möglicherweise das Potenzial als erster ICAM-1 Antikörper durch seine Fc-Optimierung eine signifikante Antitumoraktivität in klinischen Versuchen zu vermitteln. Dies würde zeigen, dass auch in klinischen Versuchen die Antitumoraktivität von ICAM-1 Antikörpern durchs Fc-Engineering erhöht werden kann.

5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist trotz vieler Behandlungsmöglichkeiten in vielen Fällen nicht heilbar. Die in den letzten Jahren in der Therapie des Multiplen Myeloms zugelassenen Antikörper Daratumumab und Elotuzumab zeigen überzeugende Therapieerfolge und finden mit Daratumumab inzwischen auch Anwendung als Erstlinientherapie in Kombination mit verschiedenen anderen Substanzklassen. Jedoch sprechen nicht alle Patienten auf eine Antikörpertherapie an bzw. rezidivieren nach kurzer Zeit. Es besteht daher weiterhin großer Bedarf an neuen Therapieoptionen für eine signifikante Anzahl an Patienten. Hier könnten alternative / neue Zielstrukturen zur Entwicklung von weiteren Antikörpertherapien beitragen. Neben anderen Antigenen stellt ICAM-1/CD54 aufgrund seiner wichtigen Rolle in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms eine vielversprechende Zielstruktur dar. Bislang zeigten jedoch ICAM-1 Antikörper in der Klinik zwar gute Verträglichkeit, aber ungenügende therapeutische Aktivität in der Therapie des Multiplen Myeloms. Durch Modifikationen im Fc-Teil eines Antikörpers, dem sogenannten Fc-Engineering, lassen sich einzelne Effektorfunktionen eines Antikörpers (z.B. ADCC) gezielt verstärken und damit möglicherweise die therapeutische Aktivität steigern.

Ziel dieser Arbeit war die Frage zu klären inwieweit sich durch Modifikation des Fc-Teils eines ICAM-1 Antikörpers dessen ADCC Aktivität, einem wichtigen Effektormechanismus vieler therapeutischer Antikörper, signifikant verbessern lässt, um möglicherweise das therapeutische Potential zu erhöhen. Dazu wurden drei humane IgG1-Antikörpervarianten (Wildtyp Fc-Domäne, ADCC-optimierte Fc-Domäne, Knock-out Fc-Domäne) entwickelt und hinsichtlich ihrer Effektorfunktionen verglichen. Die drei neuen ICAM-1 Antikörpervarianten wurden erfolgreich durch transiente Transfektion produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die drei Varianten zeigten wie erwartet keine signifikanten Unterschiede in der Bindung von ICAM-1. Eine komplementabhängige Tumorzelllyse konnte für

keine der Varianten nachgewiesen werden und direkte Proliferationsinhibition wurde nur sehr ineffizient vermittelt. Jedoch konnte durch den Austausch von zwei Aminosäuren im Fc-Teil (S239D, I332E) die Affinität zu FcγRIIIa im Vergleich zum Wildtyp Antikörper um den Faktor 23,5 erhöht werden und dadurch die NK-Zell-vermittelte Lyse verschiedener Tumorzelllinien und frisch isolierter Tumorzellen signifikant gesteigert werden.

Mit unseren Versuchen zeigten wir das Effektormechanismen von ICAM-1 Antikörpern durch Fc-Engineering optimiert werden können, womit möglicherweise ihr therapeutischen Potenzial in der klinischen Anwendung verbessert werden könnte. Damit könnte der in der Arbeit beschriebene Fc-optimierte ICAM-1 Antikörper eine interessante Substanz für die Therapie des Multiplen Myeloms darstellen. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig um das therapeutische Potenzial gegenüber Nebenwirkungen abzuwägen.

6. Literaturverzeichnis

Agius, M. A.; Klodowska-Duda, G.; Maciejowski, M.; Potemkowski, A.; Li, J.; Patra, K.; Wesley, J.; Madani, S.; Barron, G.; Katz, E.; Flor, A. (2017): Safety and tolerability of inebilizumab (MEDI-551), an anti-CD19 monoclonal antibody, in patients with relapsing forms of multiple sclerosis. Results from a phase 1 randomised, placebo-controlled, escalating intravenous and subcutaneous dose study. In: *Mult Scler.* 1, S. 1-11.

Achkar, T.; Tarhini, A. A. (2017): The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. In: *J Hematol Oncol.* 10 (1), S. 88.

Ali, S. A.; Shi, V.; Maric, I.; Wang, M.; Stroncek, D. F.; Rose, J. J.; Brudno, J. N.; Stetler-Stevenson, M.; Feldman, S. A.; Hansen, B. G.; Fellowes, Vi. S.; Hakim, F. T.; Gress, R. E.; Kochenderfer, J. N. (2016): T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. In: *Blood* 128 (13), S. 1688–1700.

Ansell, S. M.; Armitage, J. (2005): Non-Hodgkin Lymphoma. Diagnosis and Treatment. In: *Mayo Clin Proc.* 80 (8), S. 1087–1097.

Antonia, S. J.; Vansteenkiste, Jo. F.; Moon, E. (2016): Immunotherapy. Beyond Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Therapies. In: *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 35, 450-458.

Arnaout, M. A. (2016): Biology and structure of leukocyte β (2) integrins and their role in inflammation. In: *F1000Research* 5, F1000 Faculty Rev-2433.

Bang, Y. J.; Giaccone, G.; Im, S. A.; Oh, D. Y.; Bauer, T. M.; Nordstrom, J. L.; Li, H.; Chichili, G. R.; Moore, P. A.; Hong, S.; Stewart, S. J.; Baughman, J. E.; Lechleider, R. J.; Burris, H. A. (2017): First-in-human phase 1 study of margetuximab (MGAH22), an Fc-modified chimeric monoclonal antibody, in patients with HER2-positive advanced solid tumors. In: *Ann Oncol.* 28 (4), S. 855–861.

Bartrop, J. A.; Owen, T. C.; Cory, A. H.; Cory, J. G. (1991): 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. In: *Bioorg Med Chem Lett.* 1 (11), S. 611–614.

Bella, J.; Kolatkar, P. R.; Marlor, C. W.; Greve, J. M.; Rossmann, M. G. (1998): The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (8), S. 4140–4145.

Bianchi, G.; Anderson, K. C. (2014): Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. In: *CA Cancer J Clin.* 64 (6), S. 422–444.

- Bladé, J.; Fernández de Larrea, C.; Rosiñol, L.; Cibeira, M. T.; Jiménez, R.; Powles, R. (2011): Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma. Incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach. In: *J Clin Oncol.* 29 (28), S. 3805–3812.
- Bloom, Ja. W.; Madanat, M. S.; Ray, M. K. (1996): Cell Line and Site Specific Comparative Analysis of the N-Linked Oligosaccharides on Human ICAM-1des454–532 by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In: *Biochemistry* 35 (6), S. 1856–1864.
- Boles, K. S.; Mathew, P. A. (2001): Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. In: *Immunogenetics* 52 (3-4), S. 302–307.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem.* 72 (1), S. 248–254.
- Brischwein, K.; Parr, L.; Pflanz, S.; Volkland, J.; Lumsden, J.; Klinger, M.; Locher, M.; Hammond, S. A.; Kiener, P.; Kufer, P.; Schlereth, B.; Baeuerle, P. A. (2007): Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. In: *J Immunother.* 30 (8), S. 798–807.
- Brooks, K. J.; Coelman, E. J.; Vitetta, E. S. (2008): The antitumor activity of an anti-CD54 antibody in SCID mice xenografted with human breast, prostate, non-small cell lung, and pancreatic tumor cell lines. In: *Int J Cancer.* 123 (10), S. 2438–2445.
- Brudno, J. N.; Kochenderfer, J. N. (2016): Toxicities of chimeric antigen receptor T cells. Recognition and management. In: *Blood* 127 (26), S. 3321–3330.
- Bruggemann, M.; Williams, G. T.; Bindon, C. I.; Clark, M. R.; Walker, M. R.; Jefferis, R.; Waldmann, H.; Neuberger, M. S. (1987): Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. In: *J Exp Med.* 166 (5), S. 1351–1361.
- Burger, R.A.; Bakker, F.; Schmalzing, M.; Bernand, S.; Baum, W.; Duerr, B.; Hocke, G.M.; Steininger, H. (2001): Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. In: *Hematol. J.* 2 (1), S. 42–53.
- Busfield, S. J.; Biondo, M.; Wong, M.; Ramshaw, H. S.; Lee, E. M.; Ghosh, S.; Braley, H.; Panousis, C.; Roberts, A. W.; He, S. Z.; Thomas, D.; Fabri, L.; Vairo, G.; Lock, R. B.; Lopez, A. F.; Nash, A. D. (2014): Targeting of acute myeloid leukemia in vitro and in vivo with an anti-CD123 mAb engineered for optimal ADCC. In: *Leukemia* 28 (11), S. 2213–2221.
- Byrne, M.; Salmasinia, D.; Leather, H.; Cogle, C. R.; Davis, A.; Hsu, J. W.; Wiggins, L.; Chang, M. N.; An, Q.; Wingard, J. R.; Moreb, J. S. (2014): Tandem Autologous Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma Patients Based on Response to Their First Transplant—A Prospective Phase II Study. In: *Clin Med Insights Oncol.* 8, S. 101–105.
- Capstik, P. B. (1963): Growth of baby hamster kidney cells in suspension. In: *Proc R Soc Med.* 56, S. 1062–1064.
- Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B.; Henner, D.; Wong, W. L.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E.; Shepard, H. M. (1992): Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (10), S. 4285–4289.
- Cartron, G. (2002): Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fcγ3 gene. In: *Blood* 99 (3), S. 754–758.
- Chen, D.; Frezza, M.; Schmitt, S.; Kanwar, J.; Dou, Q. P. (2011): Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug. Current Status and Future Perspectives. In: *Curr Cancer Drug Targets.* 11 (3), S. 239–253.
- Clynes, R. A.; Towers, T. L.; Presta, L. G.; Ravetch, J. V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. In: *Nat Med.* 6 (4), S. 443–446.
- Coleman, E. J.; Brooks, K. J.; Smallshaw, J. E.; Vitetta, E. S. (2006): The Fc Portion of UV3, an Anti-CD54 Monoclonal Antibody, Is Critical for its Antitumor Activity in SCID Mice With Human Multiple Myeloma or Lymphoma Cell Lines. In: *J Immunother.* 29 (5), S. 489–498.
- Collins, S. M.; Bakan, C. E.; Swartzel, G. D.; Hofmeister, C. C.; Efebera, Y. A.; Kwon, H.; Starling, G. C.; Ciarlariello, D.; Bhaskar, S.; Brierecheck, E. L.; Hughes, T.; Yu, J.; Rice, A.; Benson, D. M. (2013): Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation. Evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. In: *Cancer Immunol Immunother.* 62 (12), S. 1841–1849.
- Cook, G.; Dumbar, M.; Franklin, I. M. (1997): The Role of Adhesion Molecules in Multiple Myeloma. In: *Acta Haematol.* 97 (1-2), S. 81–89.

- De Maria, A.; Bozzano, F.; Cantoni, C.; Moretta, L. (2010): Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16(+) NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (2), S. 728–732.
- de Weers, M. de; Tai, Y-T.; van der Veer, M. S.; Bakker, J. M.; Vink, T.; Jacobs, D. C. H.; Oomen, L. A.; Peipp, M.; Valerius, T.; Slootstra, J. W.; Mutis, T.; Bleeker, W. K.; Anderson, K. C.; Lokhorst, H. M.; van de Winkel, Jan G. J.; Parren, Paul W. H. I. (2011): Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. In: *J. Immunol.* 186 (3), S. 1840–1848.
- Diamond, M. S.; Garcia-Aguilar, J.; Bickford, J. K.; Corbi, A. L.; Springer, T. A. (1993): The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. In: *J Cell Biol.* 120 (4), S. 1031–1043.
- Diamond, M. S.; Staunton, D. E.; Marlin, S. D.; Springer, T. A. (1991): Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. In: *Cell* 65 (6), S. 961–971.
- Diehl, V.; Schaadt, M.; Kirchner, H.; Hellriegel, K-P.; Gudat, F.; Fonatsch, C. (1978): Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: A comparative study. In: *Blut* 36 (6), S. 331–338.
- Dimopoulos, M. A.; Oriol, A.; Nahi, H.; San-Miguel, J.; Bahlis, N. J.; Usmani, S. Z.; Rabin, N.; Orlowski, R. Z.; Komarnicki, M.; Suzuki, K.; Plesner, T.; Yoon, S-S.; Ben Yehuda, D.; Richardson, P. G.; Goldschmidt, H.; Reece, D.; Lisby, S.; Khokhar, N. Z.; O'Rourke, L.; Chiu, C.; Qin, X.; Guckert, M.; Ahmadi, T.; Moreau, P. (2016): Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. In: *N Engl J Med.* 375 (14), S. 1319–1331.
- Engelberts, P. J.; Voorhorst, M.; Schuurman, J.; van Meerten, T.; Bakker, J. M.; Vink, T.; Mackus, W. J. M.; Breij, E. C. W.; Derer, S.; Valerius, T.; van de Winkel, J. G. J.; Parren, P. W. H. I.; Beurskens, F. J. (2016): Type I CD20 Antibodies Recruit the B Cell Receptor for Complement-Dependent Lysis of Malignant B Cells. In: *J Immunol.* 197 (12), S. 4829–4837.
- Frey, N. V.; Porter, D. L. (2016): Cytokine release syndrome with novel therapeutics for acute lymphoblastic leukemia. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016 (1), S. 567–572.
- Garred, P.; Michaelsen, T. E.; Aase, A. (1989): The IgG Subclass Pattern of Complement Activation Depends on Epitope Density and Antibody and Complement Concentration. In: *Scand J Immunol.* 30 (3), S. 379–382.
- Gelderman, K. A.; Tomlinson, S.; Ross, G. D.; Gorter, A. (2004): Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. In: *Trends Immunol.* 25 (3), S. 158–164.
- Ghetie, V.; Ward, E. S. (2000): Multiple Roles for the Major Histocompatibility Complex Class I– Related Receptor FcRn. In: *Annu Rev Immunol.* 18 (1), S. 739–766.
- Ghosh, A.; Mailankody, S.; Giral, S. A.; Landgren, C. O.; Smith, E. L.; Brentjens, R. J. (2018): CAR T cell therapy for multiple myeloma. Where are we now and where are we headed? In: *Leuk Lymphoma.* 59 (9), S. 2056–2067.
- Glorius, P.; Baerenwaldt, A.; Kellner, C.; Staudinger, M.; Dechant, M.; Stauch, M.; Beurskens, F. J.; Parren, P. W. H. I.; van de Winkel, J. G. J.; Valerius, T.; Humpe, A.; Repp, R.; Gramatzki, M.; Nimmerjahn, F.; Peipp, M. (2013): The novel tribody [(CD20)2xCD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. In: *Leukemia* 27, 190–201.
- Graham, F. L.; van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. In: *Virology* 52 (2), S. 456–467.
- Greenstein, S.; Krett, N. L.; Kurosawa, Y.; Ma, C.; Chauhan, D.; Hideshima, T.; Anderson, K. C.; Rosen, S. T. (2003): Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines. In: *Exp Hematol.* 31 (4), S. 271–282.
- Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. (1989): Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (24), S. 10024–10028.
- Haas, M. de; Kleijer, M.; van Zwieten, R.; Roos, D.; dem Borne, A. E. von (1995): Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences. A study of 21 individuals from 14 families. In: *Blood* 86 (6), S. 2403–2413.
- Hansson, M.; Gimsing, P.; Badros, A.; Niskanen, T. M.; Nahi, H.; Offner, F.; Salomo, M.; Sonesson, E.; Mau-Sorensen, M.; Stenberg, Y.; Sundberg, A.; Teige, I.; van Droogenbroeck, J.; Wichert, S.; Zangari, M.; Frendeus, B.; Korsgren, M.; Poelman, M.; Tricot, G. (2015): A Phase I Dose-Escalation Study of Antibody BI-505 in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. In: *Clin Cancer Res.* 21 (12), S. 2730–2736.
- Harousseau, J-L. (2006): Thalidomide in multiple myeloma: past, present and future. In: *Future Oncol.* 2 (5), S. 577–589.
- Hayashi, T.; Hideshima, T.; Akiyama, M.; Podar, K.; Yasui, H.; Raje, N.; Kumar, S.; Chauhan, D.; Treon, S. P.; Richardson, P.; Anderson, K. C. (2005): Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. In: *Br J Haematol.* 128 (2), S. 192–203.

- Herbener, P.; Schönfeld, K.; König, M.; Germer, M.; Przyborski, J. M.; Bernöster, K.; Schüttrumpf, J. (2018): Functional relevance of in vivo half antibody exchange of an IgG4 therapeutic antibody-drug conjugate. In: *PLoS One*. 13 (4), e0195823.
- Hipp, S.; Tai, Y-T.; Blanset, D.; Deegen, P.; Wahl, J.; Thomas, O.; Rattel, B.; Adam, P. J.; Anderson, K. C.; Friedrich, M. (2016): A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo. In: *Leukemia* 31 (8), 1743-1751.
- Horton, H. M.; Bernett, M. J.; Pong, E.; Peipp, M.; Karki, S.; Chu, S. Y.; Richards, J. O.; Vostiar, I.; Joyce, P. F.; Repp, R.; Desjarlais, J. R.; Zhukovsky, E. A. (2008): Potent In vitro and In vivo Activity of an Fc-Engineered Anti-CD19 Monoclonal Antibody against Lymphoma and Leukemia. In: *Cancer Res.* 68 (19), S. 8049–8057.
- Howlader, N.; Noone, A.M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Bishop, K.; Kosary, C.L.; Yu, M.; Ruhl, J. (2018): SEER Cancer Statistics Review (CSR), 1975-2014. National Cancer Institute. Bethesda.
- Huang, Y-W; Richardson, J. A.; Vitetta, E. S. (1995): Anti-CD54 (ICAM-1) Has Antitumor Activity in SCID Mice with Human Myeloma Cells. In: *Cancer Res.* 55 (3), S. 610–616.
- 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. In: *J Immunol.* 166 (4), S. 2571–2575.
- Imai, K.; Matsuyama, S.; Miyake, S.; Suga, K.; Nakachi, K. (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. In: *Lancet* 356 (9244), S. 1795–1799.
- International Immunogenetics Database (IMGT) (2018): Monoclonal antibodies with clinical indications (IMGT/mAb-DB). Online verfügbar unter <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/GenesClinical/monoclonalantibodies/#Human%20monoclonal%20antibodies>.
- Jakubowiak, A.; Offidani, M.; Pégourie, B.; La Rubia, J. de; Garderet, L.; Laribi, K.; Bosi, A.; Marasca, R.; Laubach, J.; Mohrbacher, A.; Carella, A. M.; Singhal, A. K.; Tsao, L. C.; Lynch, M.; Bleickardt, E.; Jou, Y-M.; Robbins, M.; Palumbo, A. (2016): Randomized phase 2 study. Elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. In: *Blood* 127 (23), S. 2833–2840.
- Johnson & Johnson (17.10.2017): Johnson & Johnson Reports 2017 Third-Quarter Results. New Brunswick, N.J. Ernie Kne-witz. Online verfügbar unter <https://www.jnj.com/media-center/press-releases/johnson-johnson-reports-2017-third-quarter-results>.
- Jurczak, W.; Zinzani, P. L.; Gaidano, G.; Goy, A.; Provencio, M.; Nagy, Z.; Robak, T.; Maddocks, K.; Buske, C.; Ambarkhane, S.; Winderlich, M.; Dirnberger-Hertweck, M.; Korolkiewicz, R.; Blum, K. A. (2018): Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's Lymphoma. In: *Ann Oncol.* 29 (5), S. 1266–1272.
- Kaufmann, S. H. E. (2014): Basiswissen Immunologie. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Kavanaugh, A. F.; Davis, L. S.; Jain, R. I.; Nichols, L. A.; Norris, S. H.; Lipsky, P. E. (1996): A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis. In: *J Rheumatol.* 23 (8), S. 1338–1344.
- Kawano, M. M.; Huang, N.; Tanaka, H.; Ishikawa, H.; Sakai, A.; Tanabe, O.; Nobuyoshi, M.; Kuramoto, A. (1991): Homotypic cell aggregations of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. In: *Br J Haematol.* 79 (4), S. 583–588.
- Kellner, C.; Otte, A.; Cappuzzello, E.; Klausz, K.; Peipp, M. (2017): Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. In: *Transfus Med Hemother.* 44 (5), S. 327–336.
- Kellner, C.; Derer, S.; Valerius, T.; Peipp, M. (2014): Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. In: *Methods* 65 (1), S. 105–113.
- Kellner, C.; Zhukovsky, E. A.; Pötzke, A.; Brüggemann, M.; Schrauder, A.; Schrappe, M.; Kneba, M.; Repp, R.; Humpe, A.; Gramatzki, M.; Peipp, M. (2013): The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. In: *Leukemia* 27 (7), S. 1595–1598.
- Kelton, W.; Mehta, N.; Charab, W.; Lee, J.; Lee, C.; Kojima, T.; Kang, T. H.; Georgiou, G. (2014): IgGA: A “Cross-Isotype” Engineered Human Fc Antibody Domain that Displays Both IgG-like and IgA-like Effector Functions. In: *Chem Biol.* 21 (12), S. 1603–1609.
- Klausz, K.; Cieker, M.; Kellner, C.; Oberg, H.; Kabelitz, D.; Valerius, T.; Burger, R.; Gramatzki, M.; Peipp, M. (2017): A novel Fc-engineered human ICAM-1/CD54 antibody with potent anti-myeloma activity developed by cellular panning of phage display libraries. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77552–77566.

- Klein, E.; Klein, G.; Nadkarni, J. S.; Nadkarni, J. J.; Wigzell, H.; Clifford, P. (1968): Surface IgM-kappa Specificity on a Burkitt Lymphoma Cell and in Derived Culture Lines. In: *Cancer Res.* 28 (7), S. 1300–1310.
- Koene, H. R.; Kleijer, M.; Algra, J.; Roos, D.; von dem Borne, A. E.; Haas, M. de (1997): Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. In: *Blood* 90 (3), S. 1109–1114.
- Koerner, S. P.; André, M. C.; Leibold, J. S.; Kousis, P. C.; Kübler, A.; Pal, M.; Haen, S. P.; Bühring, H.-J.; Grosse-Hovest, L.; Jung, G.; Salih, H. R. (2016): An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. In: *Leukemia* 31 (2), S. 459–469.
- Köhler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497.
- Köhler, M.; Greil, C.; Hudecek, M.; Lonial, S.; Raje, N.; Wäsch, R.; Engelhardt, M. (2018): Current developments in immunotherapy in the treatment of multiple myeloma. In: *Cancer* 124 (10), S. 2075–2085.
- Kontermann, R. E.; Brinkmann, U. (2015): Bispecific antibodies. In: *Drug Des Devel Ther.* 20 (7), S. 838–847.
- Kretschmer, A.; Schwanbeck, R.; Valerius, Th.; Rösner, T. (2017): Antibody Isotypes for Tumor Immunotherapy. In: *Transfus Med Hemother.* 44 (5), S. 320–326.
- Kumar, S. (2017): Emerging options in multiple myeloma. Targeted, immune, and epigenetic therapies. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017 (1), S. 518–524.
- Kumar, S. K.; Dispenzieri, A.; Lacy, M. Q.; Gertz, M. A.; Buadi, F. K.; Pandey, S.; Kapoor, P.; Dingli, D.; Hayman, S. R.; Leung, N.; Lust, J.; McCurdy, A.; Russell, S. J.; Zeldenrust, S. R.; Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. (2014): Continued improvement in survival in multiple myeloma. Changes in early mortality and outcomes in older patients. In: *Leukemia* 28 (5), S. 1122–1128.
- Kumar, S. K.; Fonseca, R.; Ketterling, R. P.; Dispenzieri, A.; Lacy, M. Q.; Gertz, M. A.; Hayman, S. R.; Buadi, F. K.; Dingli, D.; Knudson, R. A.; Greenberg, A.; Russell, S. J.; Zeldenrust, S. R.; Lust, J. A.; Kyle, R. A.; Bergsagel, L.; Rajkumar, S. V. (2012): Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. In: *Blood* 119 (9), S. 2100–2105.
- Kuwana, Y.; Asakura, Y.; Utsunomiya, N.; Nakanishi, M.; Arata, Y.; Itoh, S.; Nagase, F.; Kurosawa, Y. (1987): Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 149 (3), S. 960–968.
- Kyle, R. A.; Durie, B. G. M.; Rajkumar, S. V.; Landgren, O.; Blade, J.; Merlini, G.; Kroger, N.; Einsele, H.; Vesole, D. H.; Dimopoulos, M.; San Miguel, J.; Avet-Loiseau, H.; Hajek, R.; Chen, W. M.; Anderson, K. C.; Ludwig, H.; Sonneveld, P.; Pavlovsky, S.; Palumbo, A.; Richardson, P. G.; Barlogie, B.; Greipp, P.; Vescio, R.; Turesson, I.; Westin, J.; Boccadoro, M. (2010): Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. In: *Leukemia* 24 (6), S. 1121–1127.
- Languino, L. R.; Duperray, A.; Joganic, K. J.; Fornaro, M.; Thornton, G. B.; Altieri, D. C. (1995): Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (5), S. 1505–1509.
- Laubach, J. P.; Moreau, P.; San-Miguel, J. F.; Richardson, P. G. (2015): Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. In: *Clin Cancer Res.* 21 (21), S. 4767–4773.
- Lazar, G. A.; Dang, W.; Karki, S.; Vafa, O.; Peng, J. S.; Hyun, L.; Chan, C.; Chung, H. S.; Eivazi, A.; Yoder, S. C.; Vielmetter, J.; Carmichael, D. F.; Hayes, R. J.; Dahiyat, B. I. (2006): Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (11), S. 4005–4010.
- Lee, H.-Z.; Miller, B. W.; Kwitkowski, V. E.; Ricci, S.; DelValle, P.; Saber, H.; Grillo, J.; Bullock, J.; Florian, J.; Mehrotra, N.; Ko, C.-W.; Nie, L.; Shapiro, Ma.; Tolnay, M.; Kane, R. C.; Kaminskas, E.; Justice, R.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. (2014): U.S. Food and drug administration approval. Obinutuzumab in combination with chlorambucil for the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. In: *Clin Cancer Res.* 20 (15), S. 3902–3907.
- Lee, K. J.; Chow, V.; Weissman, A.; Tulpule, S.; Aldoss, I.; Akhtari, M. (2016): Clinical use of blinatumomab for B-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. In: *Ther Clin Risk Manag.* 12, S. 1301–1310.
- Lesokhin, A. M.; Ansell, S. M.; Armand, P.; Scott, E. C.; Halwani, A.; Gutierrez, M.; Millenson, M. M.; Cohen, A. D.; Schuster, S. J.; Lebovic, D.; Dhodapkar, M.; Avigan, D.; Chapuy, B.; Ligon, Az. H.; Freeman, G. J.; Rodig, S. J.; Cattray, D.; Zhu, L.; Grosso, J. F.; Garelik, M. B. B.; Shipp, M. A.; Borrello, I.; Timmerman, J. (2016): Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy. Preliminary Results of a Phase Ib Study. In: *J Clin Oncol.* 34 (23), S. 2698–2704.

- Loffler, A.; Kufer, P.; Lutterbuse, R.; Zettl, F.; Daniel, P. T.; Schwenkenbecher, J. M.; Riethmuller, G.; Dorken, B.; Bargou, R. C. (2000): A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. In: *Blood* 95 (6), S. 2098–2103.
- Loisel, S.; Ohresser, M.; Pallardy, M.; Dayde, D.; Berthou, C.; Cartron, G.; Watier, H. (2007): Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. In: *Crit Rev Oncol Hematol.* 62 (1), S. 34–42.
- Lokhorst, H.; Einsele, H.; Vesole, D.; Bruno, B.; San Miguel, J.; Pérez-Simon, J. A.; Kröger, N.; Moreau, P.; Gahrton, G.; Gasparetto, C.; Giralt, S.; Bensinger, W. (2010): International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. In: *J Clin Oncol.* 28 (29), S. 4521–4530.
- Lonial, S.; Weiss, B. M.; Usmani, S. Z.; Singhal, S.; Chari, A.; Bahlis, N. J.; Belch, A.; Krishnan, A.; Vescio, R. A.; Mateos, M. V.; Mazumder, A.; Orlowski, R. Z.; Sutherland, H. J.; Bladé, J.; Scott, E. C.; Oriol, A.; Berdeja, J.; Gharibo, M.; Stevens, D. A.; LeBlanc, R.; Sebag, M.; Callander, N.; Jakubowiak, A.; White, D.; La Rubia, J. de; Richardson, P. G.; Lisby, S.; Feng, H.; Uhlar, C. M.; Khan, I.; Ahmadi, T.; Voorhees, P. M. (2016): Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. In: *Lancet* 387 (10027), S. 1551–1560.
- Lonial, S.; Dimopoulos, M.; Palumbo, A.; White, D.; Grosicki, S.; Spicka, I.; Walter-Croneck, A.; Moreau, P.; Mateos, M-V.; Magen, H.; Belch, A.; Reece, D.; Beksac, M.; Spencer, A.; Oakervee, H.; Orlowski, R. Z.; Taniwaki, M.; Röllig, C.; Einsele, H.; Wu, K. L.; Singhal, A.; San-Miguel, J.; Matsumoto, M.; Katz, J.; Bleickardt, E.; Poulart, V.; Anderson, K. C.; Richardson, P. (2015): Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. In: *N Engl J Med* 373 (7), S. 621–631.
- Maloney, D. G.; Grillo-López, A. J.; White, C. A.; Bodkin, D.; Schilder, R. J.; Neidhart, J. A.; Janakiraman, N.; Foon, K. A.; Liles, T-M.; Dallaire, B. K.; Wey, K.; Royston, I.; Davis, T.; Levy, R. (1997): IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin Lymphoma. In: *Blood* 90 (6), S. 2188–2195.
- Marlin, S. D.; Springer, T. A. (1987): Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). In: *Cell* 51 (5), S. 813–819.
- Mateos, M-V.; Dimopoulos, M. A.; Cavo, M.; Suzuki, K.; Jakubowiak, A.; Knop, S.; Doyen, C.; Lucio, P.; Nagy, Z.; Kaplan, P.; Pour, L.; Cook, M.; Grosicki, S.; Crepaldi, A.; Liberati, A. M.; Campbell, P.; Shelekhova, T.; Yoon, S-S.; Iosava, G.; Fujisaki, T.; Garg, M.; Chiu, C.; Wang, J.; Carson, R.; Crist, W.; Deraedt, W.; Nguyen, H.; Qi, M.; San-Miguel, J. (2017): Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. In: *N Engl J Med* 378 (6), S. 518–528.
- Maude, S. L.; Laetsch, T. W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M. R.; Stefanski, H. E.; Myers, G. D.; Qayed, M.; Moerlose, B. de; Hiramatsu, H.; Schlis, K.; Davis, K. L.; Martin, P. L.; Nemecek, E. R.; Yanik, G. A.; Peters, C.; Baruchel, A.; Boissel, N.; Mechinaud, F.; Balduzzi, A.; Krueger, J.; June, C. H.; Levine, B. L.; Wood, P.; Taran, T.; Leung, M.; Mueller, K. T.; Zhang, Y.; Sen, K.; Lebwohl, D.; Pulsipher, M. A.; Grupp, S. A. (2018): Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. In: *N Engl J Med.* 378 (5), S. 439–448.
- McCourt, P. A.; Ek, B.; Forsberg, N.; Gustafson, S. (1994): Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. In: *J Biol Chem.* 269 (48), S. 30081–30084.
- Mellor, J. D.; Brown, M. P.; Irving, H. R.; Zalcborg, J. R.; Dobrovic, A. (2013): A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. In: *J Hematol Oncol.* 6 (1).
- Meulendijks, D.; Jacob, W.; Voest, E. E.; Mau-Sorensen, M.; Martinez-Garcia, M.; Taus, A.; Fleitas, T.; Cervantes, A.; Lolkema, M. P.; Langenberg, M. H. G.; Jonge, M. J. de; Sleijfer, S.; Han, J-Y.; Calles, A.; Filip, E.; Kim, S-W.; Schellens, J. H. M.; Wilson, S.; Thomas, M.; Ceppi, M.; Meneses-Lorente, G.; James, I.; Vega-Harring, S.; Dua, R.; Nguyen, M.; Steiner, L.; Adessi, C.; Michielin, F.; Bossenmaier, B.; Weisser, M.; Lassen, U. N. (2017): Phase Ib Study of Lumretuzumab Plus Cetuximab or Erlotinib in Solid Tumor Patients and Evaluation of HER3 and Heregulin as Potential Biomarkers of Clinical Activity. In: *Clin Cancer Res.* 23 (18), S. 5406–5415.
- Miller, J.; Knorr, R.; Ferrone, M.; Houdei, R.; Carron, C. P.; Dustin, M. L. (1995): Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. In: *J Exp Med.* 182 (5), S. 1231–1241.
- Milstein, C.; Cuello, A. C. (1983): Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. In: *Nature* 305 (5934), S. 537–540.
- Mina, R.; D'Agostino, M.; Cerrato, C.; Gay, F.; Palumbo, A. (2017): Plasma cell leukemia. Update on biology and therapy. In: *Leuk Lymphoma.* 58 (7), S. 1538–1547.
- 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. In: *MAbs.* 2 (2), S. 181–189.

- Moreau, P.; Masszi, T.; Grzasko, N.; Bahlis, N. J.; Hansson, M.; Pour, L.; Sandhu, I.; Ganly, P.; Baker, B. W.; Jackson, S.; Stoppa, A.-M.; Simpson, D. R.; Gimsing, P.; Palumbo, A.; Garderet, L.; Cavo, M.; Kumar, S. K.; Touzeau, C.; Buadi, F.; Laubach, J. P.; Lin, J.; Berg, D.; DiBacco, A.; Hui, A.-M.; Richardson, P. G. (2015): Ixazomib, an Investigational Oral Proteasome Inhibitor (PI), in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone (IRd), Significantly Extends Progression-Free Survival (PFS) for Patients (Pts) with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma (RRMM). The Phase 3 Tourmaline-MM1 Study (NCT01564537). In: *Blood* 126 (23), S. 727.
- Mössner, E.; Brünker, P.; Moser, S.; Püntener, U.; Schmidt, C.; Herter, S.; Grau, R.; Gerdes, C.; Nopora, A.; van Puijenbroek, E.; Ferrara, C.; Sondermann, P.; Jäger, C.; Strein, P.; Fertig, G.; Friess, T.; Schüll, C.; Bauer, S.; Dal Porto, J.; Del Nagro, C.; Dababagh, K.; Dyer, M. J. S.; Poppema, S.; Klein, C.; Umaña, P. (2010): Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. In: *Blood* 115 (22), S. 4393–4402.
- Muchtar, E.; Gertz, M. A.; Magen, H. (2016): A practical review on carfilzomib in multiple myeloma. In: *Eur J Haematol.* 96 (6), S. 564–577.
- Nelson, A. L. (2009): Antibody fragments. Hope and hype. In: *MAbs.* 2 (1), S. 77–83.
- Nilsson, K.; Bennich, H.; Johansson, S.G.; Ponten, J. (1970): Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. In: *Clin Exp Immunol.* 7 (4), S. 477–489.
- Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. In: *Nat Rev Immunol.* 8 (1), S. 34–47.
- Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V. (2005): Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. In: *Science* 310 (5753), S. 1510–1512.
- Nordstrom, J. L.; Gorlatov, S.; Zhang, W.; Yang, Y.; Huang, L.; Burke, S.; Li, H.; Ciccarone, V.; Zhang, T.; Stavenhagen, J.; Koenig, S.; Stewart, S. J.; Moore, P. A.; Johnson, S.; Bonvini, E. (2011): Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. In: *Breast Cancer Res.* 13 (6), R123.
- Oganesyan, V.; Gao, C.; Shirinian, L.; Wu, H.; Dall'Acqua, W. F. (2008): Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64 (Pt 6), S. 700–704.
- Ohtomo, T.; Sugamata, Y.; Ozaki, Y.; Ono, K.; Yoshimura, Y.; Kawai, S.; Koishihara, Y.; Ozaki, S.; Kosaka, M.; Hirano, T.; Tsuchiya, M. (1999): Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 258 (3), S. 583–591.
- Palumbo, A.; Chanan-Khan, A.; Weisel, K.; Nooka, A. K.; Masszi, T.; Beksac, M.; Spicka, I.; Hungria, V.; Munder, M.; Mateos, M. V.; Mark, T. M.; Qi, M.; Schecter, J.; Amin, H.; Qin, X.; Deraedt, W.; Ahmadi, T.; Spencer, A.; Sonneveld, P. (2016): Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. In: *N Engl J Med.* 375 (8), S. 754–766.
- Patnaik, S. K.; Stanley, P. (2006): Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. In: *Methods Enzymol.* 416, S. 159–182.
- Pear, W.; Nolan, G.; Scott, M.; Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (18), S. 8392–8396.
- Quach, H.; Ritchie, D.; Stewart, A. K.; Neeson, P.; Harrison, S.; Smyth, M. J.; Prince, H. M. (2010): Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. In: *Leukemia* 24 (1), S. 22–32.
- Rajan, A. M.; Rajkumar, S. V. (2015): Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. In: *Blood Cancer J.* 5 (10), S. e365.
- Rajkumar, S. V., and Kumar, S. (2016): Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. In: *Mayo Clin Proc.* 91 (1), S. 101–119.
- Rajkumar, S. V. (2016): Myeloma today. Disease definitions and treatment advances. In: *Am J Hematol.* 91 (1), S. 90–100.
- Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, E.; Richardson, P.; Landgren, O.; Paiva, B.; Dispenzieri, A.; Weiss, B.; LeLeu, X.; Zweegman, S.; Lonial, S.; Rosinol, L.; Zamagni, E.; Jagannath, S.; Sezer, O.; Kristinsson, S. Y.; Caers, J.; Usmani, S. Z.; Lahuerta, J. J.; Johnsen, H. E.; Beksac, M.; Cavo, M.; Goldschmidt, H.; Terpos, E.; Kyle, R. A.; Anderson, K. C.; Durie, B. G.M.; Miguel, J. F.S. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. In: *Lancet Oncol.* 15 (12), S. e538-e548.
- Ramos, T. N.; Bullard, D. C.; Barnum, S. R. (2015): ICAM-1. Isoforms and Phenotypes. In: *J Immunol.* 192 (10), S. 4469–4474.

- Ray, A.; Das, D. S.; Song, Y.; Richardson, P.; Munshi, N. C.; Chauhan, D.; Anderson, K. C. (2015): Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. In: *Leukemia* 29 (6), S. 1441–1444.
- Redman, J. M.; Hill, E. M.; AlDeghaither, D.; Weiner, L. M. (2015): Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. In: *Mol Immunol.* 67 (2 Pt A), S. 28–45.
- Robertson, M. J.; Ritz, J. (1990): Biology and clinical relevance of human natural killer cells. In: *Blood* 76 (12), S. 2421–2438.
- Rotte, A.; Jin, J. Y.; Lemaire, V. (2018): Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. In: *Ann Oncol.* 29 (1), S. 71–83.
- Ruella, M.; June, C. H. (2016): Chimeric Antigen Receptor T cells for B Cell Neoplasms. Choose the Right CAR for You. In: *Curr Hematol Malig Rep.* 11 (5), S. 368–384.
- Sampaio, M. S. S.; Vettore, A. L.; Yamamoto, M.; Chauffaille, M.; Zago, M. A.; Colleoni, G. W. B. (2009): Expression of eight genes of nuclear factor-kappa B pathway in multiple myeloma using bone marrow aspirates obtained at diagnosis. In: *Histol Histopathol.* 24 (8), S. 991–997.
- Sarma, J. V.; Ward, P. A. (2010): The Complement System. In: *Cell Tissue Res.* 343 (1), S. 227–235.
- Scallan, B. J.; Tam, S. H.; McCarthy, S. G.; Cai, A. N.; Raju, T. S. (2007): Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. In: *Mol Immunol.* 44 (7), S. 1524–1534.
- Sehn, L. H.; Chua, N.; Mayer, J.; Dueck, G.; Trněný, M.; Bouabdallah, K.; Fowler, N.; Delwail, V.; Press, O.; Salles, G.; Gribben, J.; Lennard, A.; Lugtenburg, P. J.; Dimier, N.; Wassner-Fritsch, E.; Fingerle-Rowson, G.; Cheson, B. D. (2016): Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN). A randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. In: *Lancet Oncol.* 17 (8), S. 1081–1093.
- Seidel, U.; Schlegel, P.; Lang, P. (2013): Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. In: *Front Immunol.* 4, S. 76.
- Sengsayadeth, S.; Malard, F.; Savani, B. N.; Garderet, L.; Mohty, M. (2017): Posttransplant maintenance therapy in multiple myeloma. The changing landscape. In: *Blood cancer journal* 7 (3), e545.
- Sharman, J. P.; Farber, C. M.; Mahadevan, D.; Schreeder, M. T.; Brooks, H. D.; Kolibaba, K. S.; Fanning, S. R.; Klein, L. M.; Sportelli, P.; Miskin, H. P.; Weiss, M. S.; Greenwald, D. R. (2017): Ublituximab (TG-1101), a Novel Glycoengineered Anti-CD20 Monoclonal Antibody, in Combination with Ibrutinib Is Highly Active in Patients with Relapsed and/or Refractory CLL and MCL; Results of a Phase II Trial. In: *Br J Haematol.* 176 (3), S. 412–420.
- Shields, R. L.; Lai, J.; Keck, R.; O'Connell, L. Y.; Hong, K.; Meng, Y. G.; Weikert, S. H. A.; Presta, L. G. (2002): Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity. In: *J Biol Chem.* 277 (30), S. 26733–26740.
- Shinkawa, T.; Nakamura, K.; Yamane, N.; Shoji-Hosaka, E.; Kanda, Y.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Anazawa, H.; Satoh, M.; Yamasaki, M.; Hanai, N.; Shitara, K. (2003): The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. In: *J Biol Chem.* 278 (5), S. 3466–3473.
- Schewe, D. M.; Alsadeq, A.; Sattler, C.; Lenk, L.; Vogiatzi, F.; Cario, G.; Vieth, S.; Valerius, T.; Roskopf, S.; Meyersieck, F.; Alten, J.; Schrappe, M.; Gramatzki, M.; Peipp, M.; Kellner, C. (2017): An Fc engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. In: *Blood* 130 (13), S. 1543–1552.
- Schlesinger, M.; Bendas, G. (2015): Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. In: *Int J Cancer.* 136 (11), S. 2504–2514.
- Schmidmaier, R.; Baumann, P. (2008): ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. In: *Curr Med Chem.* 15 (10), S. 978–990.
- Schneider, D.; Berrousot, J.; Brandt, T.; Hacke, W.; Ferbert, A.; Norris, S. H.; Polmar, S. H.; Schäfer, E. (1998): Safety, Pharmacokinetics and Biological Activity of Enlimomab (Anti-ICAM-1 Antibody): An Open-Label, Dose Escalation Study in Patients Hospitalized for Acute Stroke. In: *Eur Neurol.* 40 (2), S. 78–83.
- Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. In: *N Engl J Med* 344 (11), S. 783–792.

- Smith, C. W.; Marlin, S. D.; Rothlein, R.; Toman, C.; Anderson, D. C. (1989): Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. In: *J Clin Invest.* 83 (6), S. 2008–2017.
- Smith, P.; DiLillo, D. J.; Bournazos, S.; Li, F.; Ravetch, J. V. (2012): Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (16), S. 6181–6186.
- Stapleton, N. M.; Andersen, J. T.; Stemerding, A. M.; Bjarnarson, S. P.; Verheul, R. C.; Gerritsen, J.; Zhao, Y.; Kleijer, M.; Sandlie, I.; Haas, M. de; Jonsdottir, I.; van der Schoot, C. E.; Vidarsson, G. (2011): Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. In: *Nat Commun.* 2, S. 599.
- Strohl, W. R. (2018): Current progress in innovative engineered antibodies. In: *Protein Cell* 9 (1), S. 86–120.
- Suen, H.; Brown, R.; Yang, S.; Ho, P. J.; Gibson, J.; Joshua, D. (2015): The failure of immune checkpoint blockade in multiple myeloma with PD-1 inhibitors in a phase 1 study. In: *Leukemia* 29 (7), 1621–1622.
- Tai, Y-T.; Horton, H. M.; Kong, S-Y.; Pong, E.; Chen, H.; Cemerski, S.; Bernett, M. J.; Nguyen, D-H. T.; Karki, S.; Chu, S. Y.; Lazar, G. A.; Munshi, N. C.; Desjarlais, J. R.; Anderson, K. C.; Muchhal, U. S. (2012): Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered humanized anti-HM1.24 antibody against multiple myeloma via augmented effector function. In: *Blood* 119 (9), S. 2074–2082.
- Tai, Y-T.; Dillon, M.; Song, W.; Leiba, M.; Li, X-F.; Burger, P.; Lee, A. I.; Podar, K.; Hideshima, T.; Rice, A. G.; van Abbema, A.; Jesaitis, L.; Caras, I.; Law, D.; Weller, E.; Xie, W.; Richardson, P.; Munshi, N. C.; Mathiot, C.; Avet-Loiseau, H.; Afar, D. E. H.; Anderson, K. C. (2008): Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. In: *Blood* 112 (4), S. 1329–1337.
- Terpos, E.; Migkou, M.; Christoulas, D.; Gavriatopoulou, M.; Eleutherakis-Papaiakovou, E.; Kanellias, N.; Iakovaki, M.; Panagiotidis, I.; Zogas, D. C.; Fotiou, D.; Kastiris, E.; Dimopoulos, M. A. (2016): Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma. Reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment. In: *Blood Cancer J.* 6, e428.
- Thanendrarajan, S.; Puryear, J.; Schinke, C. D.; van Rhee, F.; Zangari, M.; Mathur, P.; Mohan, M.; Susanibar, S.; Kamimoto, J. J.; Hoque, S.; Radhakrishnan, M.; Farmer, P.; Rasche, L.; Weinhold, N.; Walker, B. A.; Davies, F. E.; Morgan, G. J. (2017): Nivolumab for Treatment of Advanced, Refractory, High-Risk Multiple Myeloma. In: *Blood* 130 (Suppl 1), S. 1858.
- Thomann, M.; Reckermann, K.; Reusch, D.; Prasser, J.; Tejada, M. L. (2016): Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. In: *Mol Immunol.* 73, S. 69–75.
- Topalian, S. L.; Drake, C. G.; Pardoll, D. M. (2015): Immune checkpoint blockade. A common denominator approach to cancer therapy. In: *Cancer cell* 27 (4), S. 450–461.
- Topham, N. J.; Hewitt, E. W. (2009): Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? In: *Immunology* 128 (1), S. 7–15.
- U.S. Food and Drug Administration (20.09.2017): FDA Alerts Healthcare Professionals and Oncology Clinical Investigators about Two Clinical Trials on Hold Evaluating KEYTRUDA® (pembrolizumab) in Patients with Multiple Myeloma. 10903 New Hampshire Avenue, Silver Spring, MD 20993. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/Drugs/Drug-Safety/ucm574305.htm>.
- van de Donk, N.W. C. J.; Janmaat, M. L.; Mutis, T.; Lammerts van Bueren, J. J.; Ahmadi, T.; Sasser, A. K.; Lokhorst, H. M.; Parren, P. W.H.I. (2016): Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. In: *Immunol Rev.* 270 (1), S. 95–112.
- Veitonmaki, N.; Hansson, M.; Zhan, F.; Sundberg, A.; Lofstedt, T.; Ljungars, A.; Li, Z-C.; Martinsson-Niskanen, T.; Zeng, M.; Yang, Y.; Danielsson, L.; Kovacek, M.; Lundqvist, A.; Martensson, L.; Teige, I.; Tricot, G.; Frendeus, B. (2013): A human ICAM-1 antibody isolated by a function-first approach has potent macrophage-dependent antimyeloma activity in vivo. In: *Cancer cell* 23 (4), S. 502–515.
- Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispen, T. (2014): IgG subclasses and allotypes. From structure to effector functions. In: *Front Immunol.* 5, S. 520.
- Warmerdam, P. A.; van de Winkel, J. G.; Vlug, A.; Westerdaal, N. A.; Capel, P. J. (1991): A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. In: *J Immunol.* 147 (4), S. 1338–1343.
- Weiner, L. M.; Murray, J. C.; Shuptrine, C. W. (2012): Antibody-Based Immunotherapy of Cancer. In: *Cell* 148 (6), S. 1081–1084.

- Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S. (2010): Antibodies and cancer therapy: Versatile platforms for cancer immunotherapy. In: *Nat Rev Immunol.* 10 (5), S. 317–327.
- Weiskopf, K.; Weissman, I. L. (2015): Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. In: *MAbs.* 7 (2), S. 303–310.
- Wichert, S.; Juliusson, G.; Johansson, Å.; Sonesson, E.; Teige, I.; Wickenberg, A. T.; Frendeus, B.; Korsgren, M.; Hansson, M.; Hills, R. K. (2017): A single-arm, open-label, phase 2 clinical trial evaluating disease response following treatment with BI-505, a human anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody, in patients with smoldering multiple myeloma. In: *PLoS One.* 12 (2), S. e0171205.
- Williams, K. M.; Gress, R. E. (2008): Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. In: *Best Pract Res Clin Haematol.* 21 (3), S. 579–596.
- Winsett, F. T.; Lewis, D. J.; Duvic, M. (2017): Mogamulizumab for the treatment of relapsed or refractory adult T-cell leukemia-lymphoma. In: *Expert Rev Hematol.* 10 (9), S. 757–760.
- Wirt, T.; Roszkopf, S.; Rosner, T.; Eichholz, K. M.; Kahrs, A.; Lutz, S.; Kretschmer, A.; Valerius, T.; Klausz, K.; Otte, A.; Gramatzki, M.; Peipp, M.; Kellner, C. (2017): An Fc Double-Engineered CD20 Antibody with Enhanced Ability to Trigger Complement-Dependent Cytotoxicity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. In: *Transfus Med Hemother.* 44 (5), S. 292–300.
- Woyach, J. A.; Ruppert, A. S.; Awan, F.; Jones, J. A.; Waymer, S.; Lozanski, G.; Muthusamy, N.; Byrd, J. C. (2015): A Phase II Study of the Fc Engineered CD19 Antibody MOR208 in Combination with Lenalidomide for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). In: *Blood* 126 (23), S. 2953.
- Xiaoli, L.; Jianming, W.; Carter, R. H.C.; Edberg, J. C.; Kaihong, S.; Cooper, G. S.; Kimberly, R. P. (2003): A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. In: *Arthritis Rheum.* 48 (11), S. 3242–3252.
- Xing, L.; Casasnovas, J. M.; Cheng, R. H. (2003): Structural Analysis of Human Rhinovirus Complexed with ICAM-1 Reveals the Dynamics of Receptor-Mediated Virus Uncoating. In: *J Virol.* 77 (11), S. 6101–6107.
- Yamane-Ohnuki, N.; Kinoshita, S.; Inoue-Urakubo, M.; Kusunoki, M.; Iida, S.; Nakano, R.; Wakitani, M.; Niwa, R.; Sakurada, M.; Uchida, K.; Shitara, K.; Satoh, M. (2004): Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells. An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. In: *Bio-technol Bioeng.* 87 (5), S. 614–622.
- Zhang, X.; Yang, Y.; Fan, D.; Xiong, D. (2017): The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. In: *Exp Hematol Oncol.* 6 (1), S. 12.
- Zheng, Y.; Yang, J.; Qian, J.; Qiu, P.; Hanabuchi, S.; Lu, Y.; Wang, Z.; Liu, Z.; Li, H.; He, J.; Lin, P.; Weber, D.; Davis, R. E.; Kwak, L.; Cai, Z.; Yi, Q. (2012): PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. In: *Leukemia* 27 (3), S. 702–710.

7. Danksagung

Ich möchte meinen beiden Betreuern Frau Dr. Klausz und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peipp danken. Ihre Geduld und Hilfsbereitschaft schätze ich jeden Tag ein bisschen mehr. Durch ihre konstruktive Kritik, Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft konnte ich mich und die Arbeit immer weiter verbessern.

Großen Dank an Herr Prof. Dr. med. Gramatzki für die Schaffung von optimalen Bedingungen im Institut und meine Aufnahme in dieses sowie die Möglichkeit, hier meine Dr. Arbeit anfertigen zu können.

Insgesamt möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. Peipp und allen Mitarbeitern des hämatologischen Institutes danken für die freundliche Aufnahme. Speziell für die Unterstützung bei der technischen Realisation und Einarbeitung bei den Versuchen möchte ich Britta und Katrin danken.

Als letztes möchte ich meinen Brüdern und Eltern sowie Hannah danken für die seelische Unterstützung während der letzten Jahre.

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, andere als die in ihr angegebene Literatur nicht benutzt und dass ich alle ganz oder annähernd übernommene Textstellen sowie verwendete Grafiken, Tabellen und Auswertungsprogramme kenntlich gemacht habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation nur in diesen und keinen anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesen Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Name

Ort, Datum

9. Publikationen

Originalarbeiten:

Klausz, K.; Cieker, M.; Kellner, C.; Oberg, H.; Kabelitz, D.; Valerius, T.; Burger, R.; Gramatzki, M.; Peipp, M. (2017): A novel Fc-engineered human ICAM-1/CD54 antibody with potent anti-myeloma activity developed by cellular panning of phage display libraries. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77552–77566.

Poster:

Klausz, K.; Cieker, M.; Burger, R.; Günther, A.; Kellner, C.; Peipp, M.; Gramatzki, M. (2015): A novel human Fc-optimized ICAM-1/CD54 antibody (MSH-TP15e) with potent anti-myeloma activity in vitro and in vivo. In: *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 15, e221.