

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

**Funktionelle Charakterisierung Fc-optimierter CD19-gerichteter  
Antikörper**

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

vorgelegt von  
**Sophia Katharina Roßkopf**  
aus Gräfelfing

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Kellner, Klinikum der Universität München, Klinik für Anaesthesiologie, Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika u. Hämostaseologie, ATMZH Forschungslabor

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ottmar Janßen, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.07.2019

gez.: Prof. Dr. Monika Brüggemann  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antikörper in der Therapie von Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper .....	4
1.2.1 Direkte Effektormechanismen .....	4
1.2.2 Indirekte Wirkmechanismen .....	5
1.3 Optimierung von Antikörpern.....	9
1.3.1 Fc-Engineering.....	9
1.3.1.1 Glyko-Engineering.....	9
1.3.1.2 Protein-Engineering .....	11
1.3.2 Weitere Strategien zur Optimierung von therapeutischen Antikörpern.....	12
1.4 Leukämien und Lymphome der B-Zell-Reihe.....	13
1.4.1 Zielantigene auf Leukämien und Lymphomen der B-Zell-Reihe .....	14
1.4.2 CD19 als Zielantigen auf Zellen B-lymphoider Neoplasien .....	16
1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1 Materialien .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Kits.....	21
2.1.3 Lösungen und Puffer .....	22
2.1.4 Zelllinien.....	23
2.1.5 Zellkulturmedien.....	25
2.1.6 Antikörper.....	26
2.1.7 Verbrauchsgegenstände .....	27
2.1.8 Geräte .....	28
2.1.9 Software.....	29
2.2 Methoden .....	30
2.2.1 Zellkultur .....	30

2.2.2	Expression und Reinigung der Antikörper .....	30
2.2.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	31
2.2.4	Konzentrationsbestimmung der Antikörper-Chargen .....	31
2.2.5	Proteintransfer und Immundetektion von Proteinen .....	32
2.2.5.1	Anti-human IgG-Blot.....	32
2.2.5.2	Lektin-Blot .....	32
2.2.6	Durchflusszytometrische Methoden.....	32
2.2.6.1	Analyse der Bindung der Antikörper .....	33
2.2.6.2	Analyse der C1q-Bindung .....	33
2.2.6.3	B-Zell-Depletion .....	34
2.2.7	Isolierung von Effektorzellen und Plasma aus peripherem Blut .....	35
2.2.8	<sup>51</sup> Chrom-Freisetzungsversuche .....	35
2.2.9	Statistische Analyse .....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
3.1	Effektormechanismen von Wildtyp CD19-Antikörpern .....	37
3.2	Eingesetzte Antikörpervarianten.....	38
3.3	Produktion und Reinigung der Antikörperkonstrukte.....	40
3.4	Analyse des Fucosylierungsstatus der Fc-Domänen .....	42
3.5	Analyse der Bindungseigenschaften von Fc-optimierten CD19-Antikörpern .....	43
3.5.1	CD19-Bindung.....	43
3.5.2	FcγRIIIa-Bindung .....	46
3.5.3	C1q-Bindung.....	48
3.6	Zytotoxizitätsanalyse der Fc-optimierten CD19-Antikörper .....	49
3.6.1	ADCC-Aktivität .....	49
3.6.2	CDC-Aktivität.....	53
3.6.3	B-Zell-Depletion .....	56
3.7	Überblick über die verschiedenen Fc-optimierten CD19-Antikörper.....	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
4.1	Fc-Engineering zur Optimierung monoklonaler Antikörper.....	61

4.1.1	Fc-optimierte CD19-Antikörper.....	61
4.1.2	Simultane Steigerung der ADCC- und CDC-Aktivität.....	64
4.2	CD19 als Zielstruktur für Fc-optimierte Antikörper .....	69
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>WEITERE INFORMATIONSMITTEL .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>87</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	87
8.2	Tabellenverzeichnis.....	89
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
ADCP	antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose ( <i>antibody-dependent cell-mediated phagocytosis</i> )
ALL	akute lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BiTE	<i>bispecific T-cell engager</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität ( <i>complement-dependent cytotoxicity</i> )
CDCC	komplementabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>complement-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
CDCP	Komplementabhängige zellvermittelte Phagozytose ( <i>complement-dependent cell-mediated phagocytosis</i> )
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
C <sub>H</sub>	konstante Domäne der schweren Kette
C <sub>L</sub>	konstante Domäne der leichten Kette
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cpm	Zählungen pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
E:T-Ratio	Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen (Targetzellen)
Fab	Antigen-bindendes Fragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	kristallisierbare Domäne eines Antikörpers ( <i>fragment crystallizable</i> )
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Fd	<i>fragment difficult</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFP	gefrorenes Frischplasma ( <i>fresh frozen plasma</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FL	follikuläres Lymphom
FSC	<i>forward scatter</i>
HAMA	<i>human-anti mouse-antibody</i>
HC	schwere Kette ( <i>heavy chain</i> )
HCL	Haarzelleukämie
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
Ig	Immunglobulin
LC	leichte Kette ( <i>light chain</i> )
MAC	Membranangriffskomplex ( <i>membrane attack complex</i> )
mCRP	<i>membrane-bound complement regulatory proteins</i>
MEM alpha	<i>Minimum Essential Medium alpha</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Magermilchpulver
MNC	mononukleäre Zellen ( <i>mononuclear cells</i> )
MRD	minimale Resterkrankung ( <i>minimal residual disease</i> )
MZL	Mantelzell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKG2D	<i>natural-killer group 2 member D</i>
PBA	Phosphat-gepufferte Albuminlösung ( <i>phosphate buffered albumin solution</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC7	Phycoerythrin Cyanin 7
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V <sub>H</sub>	variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub>	variable Domäne der leichten Kette

# 1 EINLEITUNG

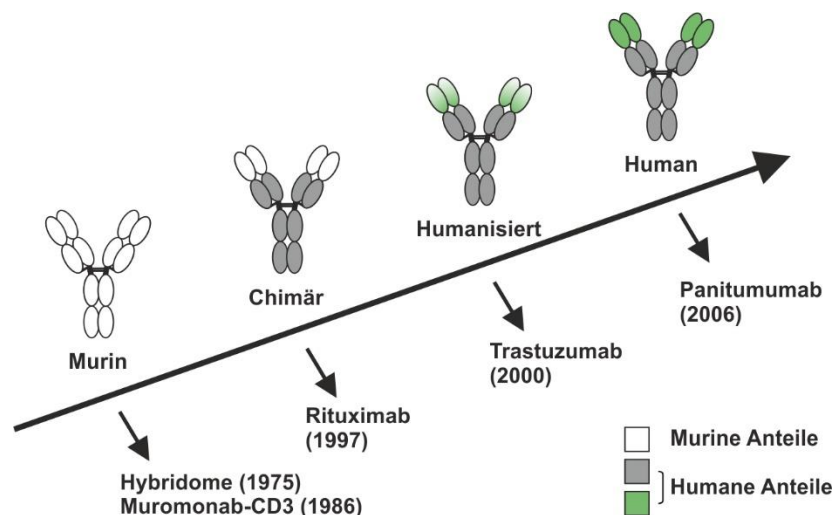
## 1.1 Antikörper in der Therapie von Tumorerkrankungen

Antikörper, durch B-Lymphozyten produzierte Proteine, werden heutzutage zur gerichteten Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt. Sie bilden mittlerweile eine fest etablierte Wirkstoffklasse in der Therapie maligner Erkrankungen sowie von System- oder Autoimmunerkrankungen (Hafeez et al. 2018). Durch ihre spezifische Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an ihre entsprechenden Zielstrukturen, die sogenannten Antigene, stellen sie eine selektive, zielgerichtete Immuntherapie dar. Die Zielstrukturen werden dabei möglichst so gewählt, dass ihre Expression auf entarteten Tumorzellen möglichst hoch und gleichzeitig auf gesundem Gewebe relativ gering ist. Durch diese Selektivität geht die Antikörpertherapie im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie in vielen Fällen mit deutlich geringeren Nebenwirkungen einher. Bei der Antikörpertherapie handelt es sich mit der erstmaligen klinischen Zulassung eines therapeutischen Antikörpers im Jahr 1986 um eine relativ neuartige Therapieform. Dieser monoklonale Antikörper, genannt Muromonab-CD3 (OKT3), gegen das Antigen *cluster of differentiation* (CD) 3 auf T-Zellen wurde zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach allogener Organtransplantation eingesetzt (Kung et al. 1979; Smith 1996). Vor allem die Zulassung des CD20-Antikörpers Rituximab im Jahr 1997 stellte den großen Durchbruch dieser Therapieform in der Tumorthherapie dar und hat die Behandlung von unterschiedlichen Leukämieformen und Lymphomen der B-Zell-Reihe revolutioniert (Maloney et al. 1997; McLaughlin et al. 1998).

Die Entwicklungsgeschichte von therapeutischen Antikörpern reicht allerdings bereits bis an das Ende des 19. Jahrhunderts zurück (Strebhardt und Ullrich 2008). Zu dieser Zeit entstanden mit Paul Ehrlichs „Seitenkettentheorie“ und seinem Konzept der Zauberkugeln (engl. „*magic bullets*“) bereits erste Visionen über die Existenz spezifischer, zielgerichteter Moleküle. Ehrlich ging davon aus, dass Körperzellen „Seitenketten“ (Antitoxine) tragen, die an bestimmte Nährstoffe und spezifische Toxine binden können und durch Abgabe an das Blut das Toxin als Antitoxin neutralisieren können (Ehrlich 1900). Ehrlichs „Seitenketten“ wurden im Lauf der Zeit als von aktivierten B-Zellen produzierte Antikörper oder Immunglobuline identifiziert. Mitte des 20. Jahrhundert gelang schließlich Rodney R. Porter und Gerald Edelman die Aufklärung der genauen Struktur von Antikörpern (Edelman et al. 1969; Porter 1973). Durch die Entwicklung der Hybridom-Technik im Jahr 1975 war man nun in der Lage, reichliche Mengen eines monoklonalen Antikörpers mit definierter Spezifität zu produzieren. Bei diesem Verfahren werden antikörperproduzierende B-Zellen aus immunisierten Mäusen mit einer Myelomzelllinie fusioniert und so immortalisierte B-Hybridomzellen erzeugt. Nach Vereinzelung erhält man Hybridomzellen, die einen bestimmten, monoklonalen Antikörper produzieren (Köhler und Milstein 1975). Im Menschen eingesetzt führten diese murinen

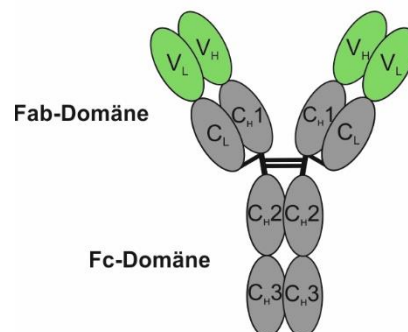


Antikörper neben therapeutischen Erfolgen allerdings zu ausgeprägten immunogenen Reaktionen, da sie vom humanen Immunsystem als fremd erkannt wurden. Durch die Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern (engl. *human-anti mouse-antibodies*, HAMAs) in den Patienten wurden die murinen Antikörper neutralisiert und verloren so ihre therapeutische Wirkung (Shawler et al. 1985). Erst durch Weiterentwicklung der biotechnologischen Verfahren gelang es, Antikörper mit immer geringerem immunogenem Potential und effizienterer Interaktion mit dem humanem Immunsystem zu generieren. Dazu wurden die murinen Anteile der Antikörper schrittweise durch die entsprechenden humanen Domänen ersetzt (Abbildung 1). Durch Chimärisieren von murinen Antikörpern wurden beispielsweise alle Regionen eines Antikörpers, bis auf die variablen Regionen, durch humane Anteile ersetzt (Morrison et al. 1984). Ein Beispiel dafür stellt der chimäre CD20-Antikörper Rituximab dar (Reff et al. 1994). Bei humanisierten Antikörpern bestehen zusätzlich noch weitere Teile der variablen Region aus humanen Anteilen und nur die hypervariablen komplementaritätsbestimmenden Regionen (engl. *complementarity-determining regions*, CDR), als Teil der variablen Region, ist murinen Ursprungs (Jones et al. 1986). Durch die Produktion von Antikörpern in transgenen Tieren, in denen die für die Produktion spezieeigener Antikörper elementaren Gensegmente deletiert und Gene für humane Antikörper eingefügt wurden, oder durch die Phagen-Display Technologie können vollständig humane Antikörper generiert werden (Clackson et al. 1991; Lonberg 2005). Zudem können humane Antikörper auch durch humane, immortalisierte B-Gedächtniszellen gewonnen werden (Lanzavecchia et al. 2007).



**Abbildung 1: Übersicht über die zeitliche Entwicklung der Antikörper-Technologien und Zulassung entsprechender Antikörper.** Mit der Zeit wurden Antikörper mit immer geringeren murinen Anteilen entwickelt. Abgewandelt nach Kellner und Peipp 2013.

Im Moment sind bereits zahlreiche Antikörper für eine klinische Behandlung zugelassen und allein im Jahr 2018 erhielten zwölf weitere eine klinische Zulassung (Kaplon und Reichert 2019). Dabei handelt es sich in der Regel um Antikörper vom IgG-Isotyp (Strohl 2018). Insgesamt existieren fünf verschiedene Antikörper-Isotypen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), die unter anderem Unterschiede in ihrer Struktur, *in vivo* Plasmaretentionszeit und Funktion aufweisen. Beim Menschen werden für den IgG-Isotyp vier verschiedene IgG Subklassen (1-4) beschrieben. Diese unterscheiden sich insbesondere im Aufbau der konstanten schweren Kette und dadurch in Teilen ihrer Wirkmechanismen (Schroeder und Cavacini 2010). Die Struktur eines IgG-Antikörpers ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt. Dieser besitzt annähernd eine Y-Form und besteht aus je zwei identischen leichten (engl. *light chain*, LC) und zwei identischen schweren (engl. *heavy chain*, HC) Polypeptidketten (Edelman 1973). Die beiden schweren Ketten sowie jeweils ein schwere und eine leichte Kette sind kovalent über Disulfidbrücken verbunden. Die einzelnen leichten und schweren Ketten setzen sich dabei aus mehreren, ca. 110 Aminosäuren großen Immunglobulin-Domänen zusammen. Die leichten Ketten werden jeweils aus einer variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L$ ) Domäne aufgebaut, während die schweren Ketten neben einer variablen ( $V_H$ ) aus drei konstanten ( $C_{H1-3}$ ) Regionen bestehen. Sequenzunterschiede der variablen Regionen zwischen einzelnen Antikörpern resultieren in verschiedenen Antigen-spezifitäten, was zu ihrer Bezeichnung als variable Domäne führt.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers.** Ein IgG-Antikörper setzt sich aus zwei identischen leichten (engl. *light*, L) und schweren (engl. *heavy*, H) Ketten zusammen. Diese sind untereinander über Disulfidbrücken verbunden (schwarze Linie). Eine leichte Kette besteht aus einer variablen ( $V_L$ , grün) und einer konstanten ( $C_L$ , grau) Domäne, während die größere schwere Kette sich aus einer variablen ( $V_H$ , grün) und drei konstanten ( $C_{H1-3}$ , grau) Domänen zusammensetzt. IgG-Antikörper besitzen zwei Antigen-bindende Fragmente (Fab-Domäne), die die Antigen-Spezifität bestimmen und die aus der leichten Kette sowie der  $V_H$ - und  $C_{H1}$ -Domäne der schweren Kette bestehen. Die  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ -Domänen bilden die Fc-Domäne, die mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immunzellen oder Komplementfaktoren interagieren kann.

Die leichte Kette sowie das aus  $V_H$ - und  $C_{H1}$ -Domäne bestehende *fragment difficult* (Fd) der schweren Kette bilden das Antigen-bindende Fragment (engl. *fragment antigen binding*, Fab) eines Antikörpers. Jeder monoklonale Antikörper besitzt somit zwei Fab-Domänen, die in der Regel das identische Antigen binden. Die  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ -Domäne der beiden schweren Ketten stellen das Fc-Fragment (engl. *fragment crystallizable*) dar, das mit verschiedenen Komponenten des Immunsystems interagieren kann. Zwischen der  $C_{H1}$ - und  $C_{H2}$ -Domäne

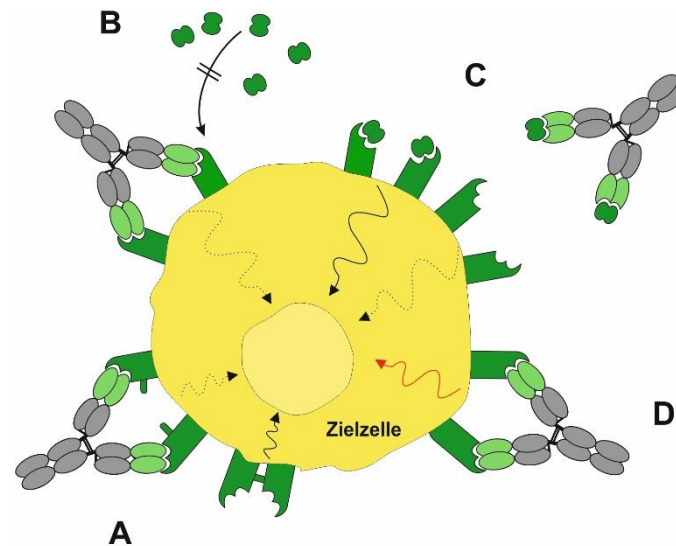
befindet sich eine bewegliche Gelenkregion der Polypeptidkette, die sogenannte *Hinge*-Region (Edelman 1973; Padlan 1994). Weiterhin ist in den C<sub>H</sub>2-Domänen der Fc-Domäne jeweils eine verzweigte Zuckerkette an die Aminosäure Asparagin in der Position 297 (N297) gebunden (Arnold et al. 2007).

## 1.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Für therapeutische Antikörper konnten zahlreiche verschiedene Effektormechanismen identifiziert werden (Scott et al. 2012; Weiner, 2015). Unterschieden wird dabei zwischen direkten, Fab-vermittelten Effekten, die sich durch die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen ergeben, und zwischen indirekten, Fc-vermittelten Effekten. Bei Letzteren wird die Wirkung eines Antikörpers indirekt durch die Rekrutierung von Komponenten des Immunsystems, wie Effektorzellen oder Komplement, nach Bindung an die Fc-Domäne eines Antikörpers vermittelt.

### 1.2.1 Direkte Effektormechanismen

Direkte, Fab-vermittelte Effekte benötigen nicht notwendigerweise die Fc-Domäne und beruhen allein auf der direkten Interaktion eines Antikörpers mit seinem Zielantigen (Glennie et al. 2007; Scott et al. 2012) (Abbildung 3). Dieses befindet sich in der Regel an der Zelloberfläche, kann aber auch ein freies, lösliches Molekül darstellen. Durch die Bindung an Wachstumsrezeptoren können therapeutische Antikörper unter anderem intrazelluläre Signalwege unterbrechen und so das Tumorstadium einschränken. Dies ist beispielsweise für den chimären Antikörper Cetuximab, der gegen den Wachstumsrezeptor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtet ist, beschrieben. Dieser Antikörper verhindert durch die Bindung an EGFR die Dimerisierung des Rezeptors, wodurch es zur Unterbindung der stimulierenden Signalkaskade und zu geringerer Tumorzellproliferation kommt (Patel et al. 2009). Zudem wird die Bindung des eigentlichen Liganden *epidermal growth factor* (EGF) gestört und so die Rezeptoraktivierung unterbunden. Durch das Ausbleiben der pro-proliferierenden Signalkaskade des Rezeptors resultiert dies unter anderem in einem Zellzyklusarrest (Ciardiello und Tortora 2008). Auch lösliche Faktoren wie beispielsweise Wachstumshormone oder Zytokine können Zielstrukturen für therapeutische Antikörper darstellen und mit diesen neutralisiert werden. So können zum Beispiel proliferationsstimulierende Signale auf Tumorzellen unterbunden oder Apoptose in malignen Zellen induziert werden (Zhong et al. 2017). Zudem können Antikörper verschiedene Oberflächenproteine kreuzvernetzen und auf diese Weise intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die einen Zyklusarrest oder die Induktion von Apoptose bewirken (Shan et al. 1998).



**Abbildung 3: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.** Therapeutische Antikörper können durch Bindung an lösliche oder zellgebundene Liganden proliferative (schwarzer Pfeil) intrazelluläre Signalwege inhibieren (gestrichelter schwarzer Pfeil) (A-C): (A) Blockade der Rezeptor-Dimerisierung, (B) Blockade der Rezeptor-Ligandeninteraktion durch Rezeptorbindung, (C) Blockade der Rezeptor-Ligandeninteraktion durch Ligandenbindung. Des Weiteren können Antikörper durch Bindung an ein Zelloberflächenantigen den Zelltod (roter Pfeil) in der Zielzelle induzieren (D). Abgewandelt nach Kellner und Peipp 2013.

Eine weitere Form der Fab-vermittelten Effekte stellt das Modulieren des Immunsystems mit Hilfe von Antikörpern dar. So können Antikörper beispielsweise durch Blockade immunsuppressiver Rezeptoren auf T-Zellen zur Einleitung oder Aufrechterhaltung einer T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen führen (Leach et al. 1996). Einer dieser Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist der gegen das inhibitorische Molekül *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA4) auf T-Zellen gerichtete humane Antikörper Ipilimumab (Hafeez et al. 2018).

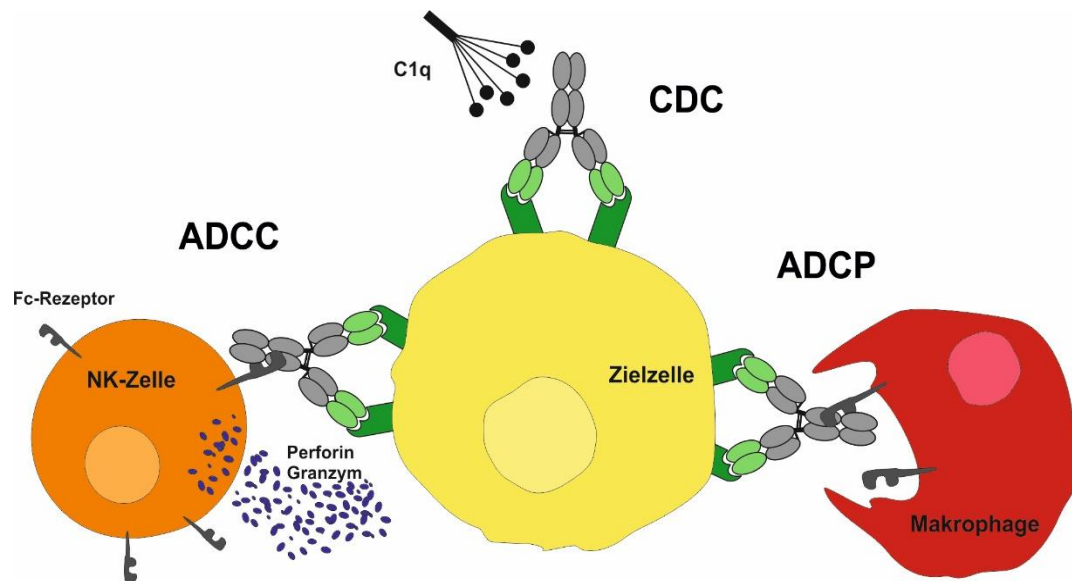
### 1.2.2 Indirekte Wirkmechanismen

Neben den direkten Effekten können Antikörper ihre Wirkung auch indirekt durch Aktivierung anderer Effektoren wie Komplement oder Effektorzellen vermitteln. Dabei werden die Komponenten des Immunsystems über die Bindung an die Fc-Domäne aktiviert, während der Antikörper gleichzeitig an das entsprechende Zielantigen gebunden ist. Die komplementabhängige Zytotoxizität (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) stellt eine Form der indirekten Effektormechanismen dar (Abbildung 4). Dabei kommt es in Antigen/Antikörper-Komplexen zur Bindung des Komplementfaktors C1q an die Fc-Domäne eines Antikörpers. Nach Kreuzvernetzung mehrerer Antikörper über C1q wird der klassische Weg des Komplementsystems ausgelöst. Dieser führt über die Aktivierung der Komplementfaktoren C2-C9 zur Formierung des Membranangriffskomplexes (engl. *membrane attack complex*, MAC) an der Zelloberfläche und löst dadurch die Zellyse aus (Dunkelberger und Song 2010). Antikörper wie Rituximab sind in der Lage, Tumorzellen durch CDC zu lysieren (Reff et al. 1994). Die Bedeutung der CDC-Aktivität vor allem für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper *in vivo* ist im Moment noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. So

konnte für Rituximab in C3- oder C4-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass ein intaktes Komplementsystem keine Voraussetzung für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper darstellt (Uchida et al. 2004; Nimmerjahn und Ravetch 2005). Andererseits konnten verschiedene Arbeitsgruppen in Mausmodellen die elementare Bedeutung von CDC als Wirkmechanismus nachweisen (Di Gaetano et al. 2003; Golay et al. 2006). Darüber hinaus konnten in Patienten mit refraktärer chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und häufig zusätzlich bestehendem Defizit an Komplementfaktoren durch die kombinierte Gabe von Rituximab und gefrorenem Frischplasma (engl. *fresh frozen plasma*, FFP), als Quelle für Komplementfaktoren, gute klinische Ansprechraten erreicht werden (Klepfish et al. 2009; Xu et al. 2011).

Durch Aktivierung des Komplementsystems können zusätzlich auch Effektorzellen rekrutiert werden. So werden im Ablauf des klassischen Wegs der Komplementaktivierung neben der Formierung des Membranangriffskomplexes auch Opsonine wie der Faktor C3b gebildet. Dieser bindet kovalent an die Zelloberfläche von Tumorzellen und kann durch Komplementrezeptoren auf Immunzellen erkannt werden. Immunzellen werden auf diese Weise aktiviert und sind in der Lage, Tumorzellen zu eliminieren (Dunkelberger und Song 2010; Lee et al. 2017). Bei diesen Mechanismen handelt es sich um die komplementabhängige zellvermittelte Phagozytose (engl. *complement-dependent cell-mediated phagocytosis*, CDCP) oder die komplementabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *complement-dependent cell-mediated cytotoxicity*, CDCC).

Eine weitere Form der indirekten, immunvermittelten Wirkungsweisen stellt die Rekrutierung von Effektorzellen dar, die Tumorzellen effizient über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (*antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP) beseitigen können. Dabei kommt es zur Interaktion der Fc-Domäne eines IgG-Antikörpers mit aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immuneffektorzellen, wie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten oder Monozyten. Diese werden durch die Interaktion stimuliert und aktiviert und sind so in der Lage abhängig vom Zelltyp, Tumorzellen auf verschiedene Weise zu eliminieren. Durch Rekrutierung von Monozyten, als auch Granulozyten kann die Phagozytose der Tumorzellen vermittelt werden (ADCP). NK-Zellen, Monozyten sowie Granulozyten können nach ihrer Aktivierung durch Freisetzung von lytischen Faktoren zur Lyse der Tumorzelle führen (ADCC) (Scott et al. 2012; Weiner 2015). Vor allem die über Fc $\gamma$ -Rezeptoren vermittelte Rekrutierung von Effektorzellen stellt einen wichtigen Wirkmechanismus vieler therapeutischer Antikörper, wie Rituximab und Trastuzumab, einen Antikörper gegen den Wachstumsrezeptor *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), dar (Clynes et al. 2000; de Haij et al. 2010; Musolino et al. 2008).



**Abbildung 4: Indirekte, immunvermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.** Antikörper gebunden an ihr entsprechendes Zielantigen können über ihren Fc-Teil verschiedene Komponenten des Immunsystems aktivieren. Durch die Interaktion der Fc-Domäne mit dem Komplementfaktor C1q kann komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) induziert werden. Die Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immuneffektorzellen führt zu deren Aktivierung. Diese können durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) zur Elimination der Zielzelle führen. Abgewandelt nach Kellner und Peipp 2013.

Für IgG existieren verschiedene humane Fc $\gamma$ -Rezeptoren, Fc $\gamma$ RI-III (CD64, CD32, CD16), die auf diversen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Formen ist in Tabelle 1 dargestellt. Dabei kann zwischen einem inhibierenden und mehreren aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren unterschieden werden. Vor allem das Vorhandensein aktivierender Rezeptoren auf Effektorzellen ist für die therapeutische Wirksamkeit entscheidend. Dies zeigte sich für klinisch relevante Antikörper wie Rituximab oder Trastuzumab in Maus-Modellen, in denen durch genetischen *Knockout* der Fc $\gamma$ R-assoziierten, gemeinsamen FcR  $\gamma$ -Kette keine aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden und so die Wirksamkeit der Antikörper stark verringert ist (Clynes et al. 2000). Des Weiteren führt auch die Interaktion mit dem inhibierenden Fc $\gamma$ RIIb auf Monozyten oder Makrophagen zu einer geringeren zytotoxischen Aktivität (Clynes et al. 2000). Wichtig scheint ebenfalls die Tatsache, dass myeloische Effektorzellen gleichzeitig sowohl aktivierende als auch den inhibierenden Fc $\gamma$ RIIb exprimieren, während NK-Zellen davon ausgenommen sind und in der Regel nur den aktivierenden Fc $\gamma$ RIIIa und teilweise auch den aktivierenden Fc $\gamma$ RIIc exprimieren (van Sorge et al. 2003; Nimmerjahn und Ravetch 2008). Weiterhin wurden für mehrere Rezeptoren verschiedene Allele identifiziert, die weiteren Einfluss auf die Affinität zur Fc-Domäne von therapeutischen Antikörpern haben. Für Fc $\gamma$ RIIIa wurde eine Variante, Fc $\gamma$ RIIIa-158V (Valin), beschrieben, die im Vergleich zu Fc $\gamma$ RIIIa-158F (Phenylalanin) die Fc-Domäne eines IgG-Antikörpers mit einer deutlich höheren Affinität bindet. In *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass die Expression der Fc $\gamma$ RIIIa-158V Variante mit

gesteigerten ADCC-Raten durch NK-Zellen assoziiert war (Dall'Ozzo et al. 2004). Die verschiedenen Allele von FcγRIIIa haben zudem Auswirkungen auf die Ansprechraten in Patienten bei der Therapie mit Rituximab oder anderen therapeutischen Antikörpern. Patienten, die homozygot für Valin in der Position 158 von FcγRIIIa sind, zeigen ein deutlich gesteigertes Ansprechen und längeres progressionsfreies Überleben bei einer Therapie mit Rituximab als F/F-homozygote oder heterozygoten Patienten (Cartron et al. 2002; Weng und Levy 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch für das hochaffine Allel FcγRIIa-131H (Histidin) im Vergleich mit FcγRIIa-131R (Arginin) (Musolino et al. 2008). Zudem besitzen die verschiedenen Rezeptorformen unterschiedliche Affinitäten für die Fc-Domänen. So weist beispielweise FcγRI eine sehr hohe Affinität für IgG auf, während alle anderen Fcγ-Rezeptoren nur niedrig affin sind. Auch die verschiedenen IgG-Isotypen weisen unterschiedliche Affinitäten zu aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf. IgG-Isotypen mit hoher Affinität zu aktivierenden und geringer Bindung an inhibierenden Fcγ-Rezeptoren zeigen in Tiermodellen eine höhere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen als IgG-Isotypen mit nachgewiesener geringerer Affinität zu aktivierenden Rezeptoren (Nimmerjahn und Ravetch 2005). Für jeden Antikörper kann so ein A/I-Profil errechnet werden, das aus dem Quotienten der Bindungsstärke an aktivierende (A) und inhibierenden (I) Fcγ-Rezeptoren besteht. Antikörperisotypen mit einem hohen A/I-Wert haben eine potentere Antitumoraktivität (Nimmerjahn und Ravetch 2005). Das A/I-Profil kann dazu genutzt werden, die Effektivität einer Therapie einzuschätzen. Die verschiedenen Daten lassen darauf schließen, dass abhängig vom Antikörperisotyp als auch von Fcγ-Rezeptor-Polymorphismen die Bindungen zwischen Fc-Domäne und Fcγ-Rezeptor unterschiedlich stark sind und sich so auf die zytotoxische Aktivität eines Antikörpers auswirken.

**Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen humanen Fcγ-Rezeptoren**, abgewandelt nach Woof und Burten 2004; Nimmerjahn und Ravetch 2008; van der Heijden et al. 2012.

	Aktivierend					Inhibierend
Name	FcγRI (CD64)	FcγRIIa (CD32a)	FcγRIIc (CD32c)	FcγRIIIa (CD16a)	FcγRIIIb (CD16b)	FcγRIIb (CD32b)
Affinität	Hoch	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Niedrig
Allele	-	FcγRIIa-131H FcγRIIa-131R	-	FcγRIIIa-158V FcγRIIIa-158F	NA1*** NA2***	FcγRIIb-232I FcγRIIb-232T
Expression auf	Makrophagen Monozyten Granulozyten* Dendritische Zellen*	Makrophagen Monozyten Granulozyten Dendritische Zellen	Makrophagen Monozyten Granulozyten NK-Zellen**	Makrophagen Monozyten NK-Zellen	Granulozyten	Makrophagen Monozyten Granulozyten Dendritische Zellen B-Zellen

\* nach Stimulation; \*\* funktionaler FcγRIIc in ca. 10-20% der Individuen exprimiert; \*\*\* NA, *Neutrophil specific antigen*.

### 1.3 Optimierung von Antikörpern

Die Entwicklung therapeutischer Antikörper hat die Prognose für viele Tumorpatienten enorm verbessert und ist heute Standard in der Behandlung vieler Tumorerkrankungen. Allerdings können davon nicht alle Patienten profitieren (Cobleigh et al. 1999; McLaughlin et al. 1998). So stellen das Nicht-Ansprechen, der Wirksamkeitsverlust im Lauf der Antikörpertherapie und die Entwicklung eines Rezidivs große Herausforderungen im Rahmen der Antikörpertherapie dar. Aufgrund dieser Tatsache stellt die Weiterentwicklung therapeutischer Antikörper aktuell ein zentrales Gebiet der translationalen Forschung dar. Dabei werden einerseits Ansätze wie das Fc-Engineering verfolgt, bei denen Veränderungen an der Fc-Domäne eines Antikörpers durchgeführt werden. Auf der anderen Seite werden neue Antikörperformate generiert, die eine neue Struktur besitzen und so eine gesteigerte Rekrutierung von Effektorzellen aufweisen (z.B. bispezifische Antikörper). Ein weiterer Ansatzpunkt ist, Antikörper mit Zellgiften zu koppeln und so den Antikörper als Transportprotein zu einer bestimmten Zielstruktur zu nutzen (Weiner 2015).

#### 1.3.1 Fc-Engineering

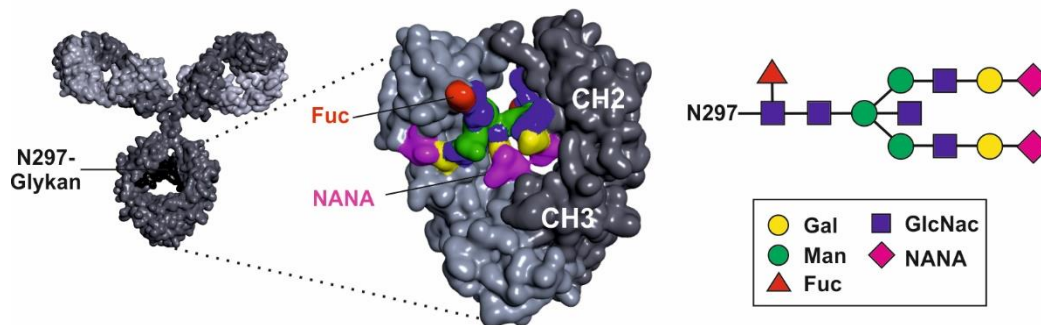
Insbesondere für die indirekten, Fc-vermittelten Wirkmechanismen konnte mehrfach die Bedeutung für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper gezeigt werden (Zafir-Lavie et al. 2007; Scott et al. 2012). Aus diesem Grund wird beim Fc-Engineering versucht, durch gezielte Veränderungen an der Fc-Domäne eines Antikörpers dessen Affinität zu Fc $\gamma$ -Rezeptoren oder zu Komplementfaktoren zu steigern. Eine dadurch erhöhte zytotoxische Aktivität soll so in einer gesteigerten Effektivität der therapeutischen Antikörper resultieren. Dazu kann zum einen die Fc-gebundene Glykanstruktur (sog. Glyko-Engineering) sowie die Aminosäuresequenz (sog. Protein-Engineering) der Fc-Domäne verändert werden.

##### 1.3.1.1 Glyko-Engineering

Strategien des sogenannten Glyko-Engineerings werden momentan vor allem zur Steigerung der ADCC-Aktivität eingesetzt. Dabei spielt für die Interaktion der Fc-Domäne mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren oder Komplementfaktoren die an Asparagin in der Position 297 (N297) gebundene Oligosaccharidkette in IgG1 Antikörpern eine bedeutende Rolle (Abbildung 5). Das Fehlen jeglicher Glykosylierung in der Fc-Domäne eines Antikörpers führt zu ausgeprägten Veränderungen in der Antikörperstruktur insbesondere in der C<sub>H</sub>2-Domäne, sodass dieser nicht mehr in der Lage ist, Fc $\gamma$ R oder C1q zu binden (Feige et al. 2009; Tao und Morrison 1989). Innerhalb des Glykans wurde vor allem die über  $\alpha$ -1,6-gebundene Fucose als kritischer Zucker identifiziert. Für Antikörper mit einem geringeren Fucose-Gehalt im Oligosaccharid der Fc-Domäne wurde im Vergleich mit nativen IgG1 Antikörpern eine gesteigerte Affinität für Fc $\gamma$ RIIIa nachgewiesen (Ferrara et al. 2011). Diese um bis das 50-fache gesteigerte Bindung



führt zu einer erhöhten ADCC-Induktion vermittelt durch NK-Zellen gegen Tumorzellen (Shields et al. 2002).



**Abbildung 5: Darstellung des an Anspargin297 gebundenen Glykans.** Innerhalb eines IgG1-Antikörper ist typischerweise an jede der beiden schweren Ketten (dunkelgrau) in der CH<sub>2</sub>-Domäne je eine Oligosaccharidkette (schwarz) an die Aminosäure N297 gebunden (hellgrau: leichte Kette). Die Kernstruktur des Glykan gebunden an N297 bildet ein Heptaglykan aus vier *N*-Acetylglucosamin-Resten (GlcNac) und drei Mannose-Resten (Man). Erweitert werden kann diese durch Fucose (Fuc), ein mittelständiges GlcNac, Galaktose (Gal) und Sialinsäure (NANA). Aus Kellner et al. 2017 mit Erlaubnis des S. Karger AG Verlages.

Um den Fucose-Gehalt therapeutischer Antikörper zu reduzieren, existieren verschiedene Strategien. Ein gängiger Ansatz ist die Expression der Antikörper in speziellen Zelllinien wie beispielsweise Lec13 Zellen. Bei Lec13 Zellen handelt es sich um eine mutierte Variante der *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zelllinie. Diese Zellen sind aufgrund eines Enzymdefekts im Fucose-Stoffwechsel nicht in der Lage, Fucose selbst zu bilden und produzieren daher Antikörper mit einem geringeren Fucose-Gehalt im Glykan der Fc-Domänen (Ripka et al. 1986). Des Weiteren kann die Expression in bestimmten Hybridomzellen erfolgen, in denen einzelne Enzyme des Fucose-Stoffwechsels auf genetischer Ebene depletiert werden (Yamane-Ohnuki et al. 2004). Dies ermöglicht die Produktion von therapeutischen Antikörpern ohne jegliche Fucose. Neben Fucose wurde auch für andere Zucker-Reste, wie Galaktose und Sialinsäure, ein Einfluss auf die ADCC-Aktivität gezeigt, auch wenn sich dieser möglicherweise im Vergleich mit Fucose als geringer darstellt (Naso et al. 2010; Thomann et al. 2016).

Mit Obinutuzumab und Mogamulizumab sind aktuell zwei glyko-optimierte Antikörper in der Tumorthherapie klinisch zugelassen. Bei Obinutuzumab handelt es sich um einen humanisierten CD20-Antikörper mit geringem Fucose-Gehalt, der im Jahr 2013 durch die FDA die Zulassung für die Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) erhielt (Lee et al. 2014; Mössner et al. 2010). Mogamulizumab, ein humanisierter, afucosylierter Antikörper gegen den Chemokin-Rezeptor CCR4, wird bei Patienten mit Mycosis fungoides und Sézary-Syndrom sowie in Japan in der Behandlung der adulten T-Zell-Leukämie eingesetzt (Kaplon und Reichert 2019; Yu et al. 2017).

Aktuell werden Strategien des Glyko-Engineerings vor allem zur Steigerung der ADCC-Aktivität und weniger zu Optimierung der CDC-Aktivität angewendet. Allerdings konnten Quast und Kollegen nachweisen, dass eine veränderte Rituximab Variante mit einem höheren Gehalt

an Sialinsäure als der kommerziell erwerbliche Rituximab zu einer geringeren CDC-Induktion gegenüber Tumorzellen fähig ist (Quast et al. 2015).

### 1.3.1.2 Protein-Engineering

Ansätze des sogenannten Protein-Engineerings durch Veränderung der Aminosäuresequenz der Fc-Domäne werden sowohl zur Steigerung der ADCC und ADCP, als auch zur Erhöhung der CDC-Aktivität eingesetzt. Es konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die in den entsprechenden Bindungsstellen liegen und zu einer gesteigerten Bindungsaffinität der Fc-Domäne zu Fc $\gamma$ -Rezeptoren oder zum Komplementfaktor C1q führen (Kellner et al. 2014; Strohl 2009). Lazar und Kollegen gelang es, Antikörpervarianten mit unterschiedlicher Antigenspezifität und der zweifache Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E) in der C<sub>H</sub>2-Domäne des Fc-Teils zu generieren, die eine deutlich gesteigerte Affinität für Fc $\gamma$ RIIIa und eine etwas erhöhte Bindung an den inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb aufwiesen (Lazar et al. 2006). Im Vergleich mit dem Wildtyp-Antikörper IgG1 führte diese zweifache Aminosäuresubstitution in der Fc-Domäne eines Antikörpers zu gesteigerter ADCC vermittelt durch NK-Zellen. Zudem waren diese Antikörpervarianten auch bei Tumorzellen mit geringer Antigendichte in der Lage effektiv ADCC zu vermitteln. Bei einer Variante des CD20-Antikörpers Rituximab mit der Aminosäuresubstitution DE zeigte sich bei unveränderter CDC-Aktivität eine deutlich gesteigerte ADCC- und etwas erhöhte ADCP-Aktivität (Lazar et al. 2006). Im Hintergrund von CD19-Antikörpern führte die zweifache Aminosäuresubstitution (S239D/I332E) in der Fc-Domäne ebenfalls zu einer deutlich gesteigerten ADCC-Induktion und effizienter *in vivo* B-Zell-Depletion in Makaken, während der Wildtyp IgG1 Antikörper gegen CD19 kaum in der Lage ist, Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zu vermitteln (Horton et al. 2008; Zalevsky et al. 2009).

Ähnliche Strategien des Protein-Engineering, wie die zur Steigerung der ADCC-Aktivität werden ebenfalls zur Optimierung der CDC-Aktivität angewendet (Idusogie et al. 2001; Moore et al. 2010). Moore und Kollegen generierten zahlreiche Antikörper mit diversen Aminosäuresubstitutionen in der Fc-Domäne und unterschiedlicher CDC-Aktivität. In diesem Zusammenhang konnten sie die Aminosäuren S267, H268 und S324 als bedeutend für eine wirksame CDC-Induktion identifizieren. Die dreifache Aminosäuresubstitution EFT (S267E/H268F/S324T) weist bei gleichzeitig stark reduzierter ADCC-Induktion eine bis zu siebenfache Steigerung der CDC-Aktivität auf. Durch zwei zusätzliche Aminosäure-substitutionen, G236A und I332E, wird eine ADCC-Aktivität wie die des IgG1 Wildtyp-Antikörpers erreicht und die CDC-Aktivität um das 23-fache gesteigert (Moore et al. 2010).

Neben Protein-Engineering-Strategien, die auf der Substitution einzelner Aminosäuren in der Fc-Domäne beruhen, werden auch Ansätze verfolgt, bei denen größere Aminosäuresequenzen zwischen verschiedenen Antikörper-Subklassen oder -Isotypen ausgetauscht werden. So weisen gemischte IgG1/IgG3-Antikörpervarianten, deren schweren Ketten sowohl

Anteile eines IgG1 als auch eines IgG3 Antikörpers enthalten, ebenfalls eine Steigerung der CDC-Aktivität auf (Natsume et al. 2008). Des Weiteren können auch sogenannte „Cross-Isotyp“-Antikörper generiert werden. IgGA „Cross-Isotyp“-Antikörper, bei denen Teile der schweren Kette eines IgG-Antikörpers durch Anteile von IgA ersetzt werden, besitzen sowohl Effektormechanismen von IgG als auch von IgA auf (Kelton et al. 2014).

### 1.3.2 Weitere Strategien zur Optimierung von therapeutischen Antikörpern

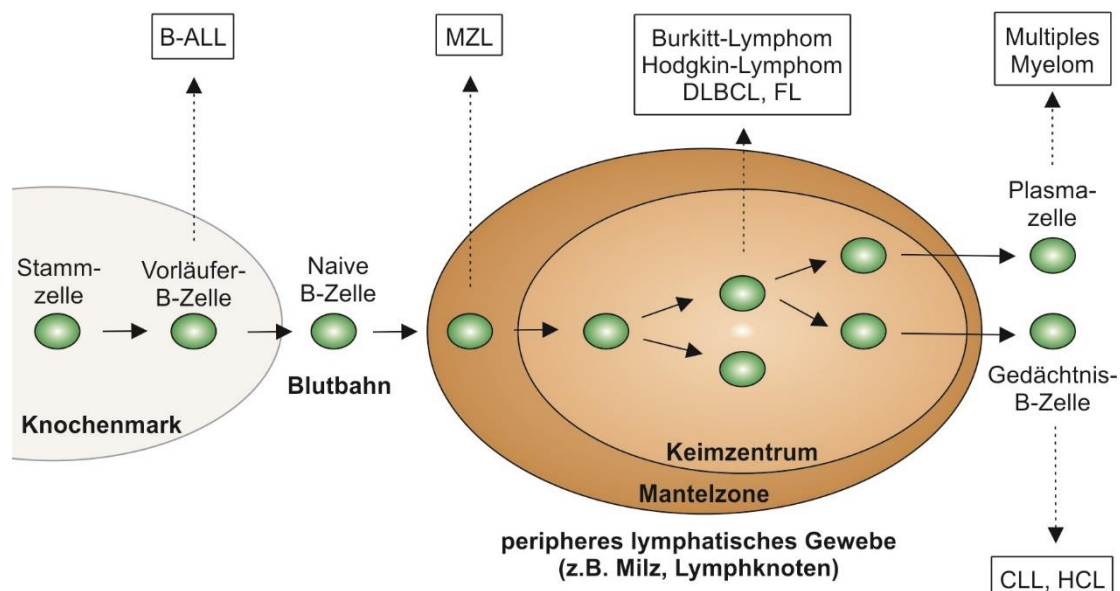
Um die Effektivität therapeutischer Antikörper zu verbessern, werden neben der Optimierung der Fc-Domäne eines Antikörpers in letzter Zeit zahlreiche neue, abgewandelte Antikörper-Formate generiert. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur vom Aufbau eines klassischen IgG1 Antikörpers. Eine große und vielfältige Gruppe stellen dabei sogenannte bispezifische Antikörper dar. Diese zeichnen sich durch zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen aus, wovon eine häufig direkt an Strukturen auf Tumorzellen bindet, während die zweite gegen aktivierende Rezeptoren (Trigger-Moleküle) auf Immuneffektorzellen gerichtet ist (Kontermann und Brinkmann 2015). Dadurch sind bispezifische Antikörper in der Lage, Tumor- und Effektorzellen in räumliche Nähe zu bringen und so die zellvermittelte Lyse der Tumorzelle zu induzieren. Für bispezifische Antikörper wurden mittlerweile ca. 100 verschiedene Formate beschrieben (Brinkmann und Kontermann, 2017). Sie unterscheiden sich unter anderem durch das Vorhandensein oder Fehlen einer Fc-Region, wodurch die Effektormechanismen der Antikörperderivate bestimmt werden. Eine klinisch erfolgreiche Form bispezifischer Antikörper stellen sogenannte BiTE- (engl. *bispecific T-cell engager*) Moleküle zur Aktivierung von T-Zellen über das Trigger-Molekül CD3 dar (Velasquez et al. 2018). Diese bestehen aus zwei verschiedenen Einzelkettenfragmenten der variablen Region (engl. *single-chain fragment variable*, scFv) verknüpft über eine kurze Peptidsequenz. Bei Blinatumomab (Blinicyto®), das zur Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) klinisch zugelassen ist, handelt es sich um das erste therapeutisch eingesetzte BiTE-Molekül (Yuraszek et al. 2017). Es bindet an CD19, eine Oberflächenstruktur auf B-Lymphozyten, sowie CD3 auf T-Zellen, wodurch diese aktiviert und speziell zytotoxische T-Zellen in die Nähe von CD19-positiven Tumorzellen geleitet werden.

Neben bispezifischen Antikörpern stellt das Kombinieren von monoklonalen Antikörpern und zytotoxischen Stoffen innerhalb eines Moleküls eine weitere Strategie zur Optimierung der Antikörpertherapie dar. Innerhalb dieser sogenannten Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten oder Immunkonjugate sind Zellgifte wie beispielsweise bakterielle Toxine oder Mitosegifte kovalent an einen Antikörper gebunden. Durch die selektive Bindung an Oberflächenstrukturen, die möglichst ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden, werden nach Internalisierung des Antikörper-Wirkstoff-Konjugats gezielt Tumorzellen abgetötet und gesundes Gewebe weitgehend geschont (Thomas et al. 2016). Einzelne dieser Konstrukte sind bereits zur

Behandlung verschiedener Tumorentitäten zugelassen, wie beispielsweise Brentuximab Vedotin, das an CD30 bindet, zur Therapie von Patienten mit Hodgkin Lymphom (Scott 2017).

### 1.4 Leukämien und Lymphome der B-Zell-Reihe

Therapeutische Antikörper erweisen sich besonders in der Therapie von B-Zell-Neoplasien als effizient (Cheson 2006). B-lymphoide Leukämien und Lymphomen entstehen, wenn B-Lymphozyten in einer der Entwicklungsstufe in der B-Zell-Reifung maligne entarten und unkontrolliert proliferieren (Shaffer et al. 2002). Die verschiedenen Neoplasien der B-Zell-Reihe stellen eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen dar. Dabei gehen Leukämien in der Regel aus entarteten, häufig nur gering differenzierten Zellen im Knochenmark hervor. Lymphome der B-Zell-Reihe hingegen entstehen überwiegend in peripherem lymphatischem Gewebe, wie Lymphknoten oder der Milz, meist aus reiferen B-Lymphozyten in späteren Entwicklungsstadien. Die verschiedenen B-lymphoiden Neoplasien werden entsprechend der Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) eingeteilt. Dabei werden Charakteristika des jeweiligen Differenzierungsstadiums hinsichtlich morphologischer, immunphänotypischer und genetischer Eigenschaften der Tumorzellen sowie klinische Merkmale berücksichtigt (Swerdlow et al. 2008). Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten und einige der daraus hervorgehenden Leukämien und Lymphome.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung und daraus hervorgehender B-Zell-Malignome.** Aus den verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung können sich jeweils unterschiedliche Leukämie- oder Lymphomformen entwickeln. B-ALL, B-Zell akute lymphatische Leukämie; MZL, Mantelzell-Lymphom; DLBCL, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, follikuläres Lymphom; CLL, chronische lymphatische Leukämie; HCL, Haarzelleukämie. Abgewandelt nach Tiacci et al. 2006; Swerdlow et al. 2008.

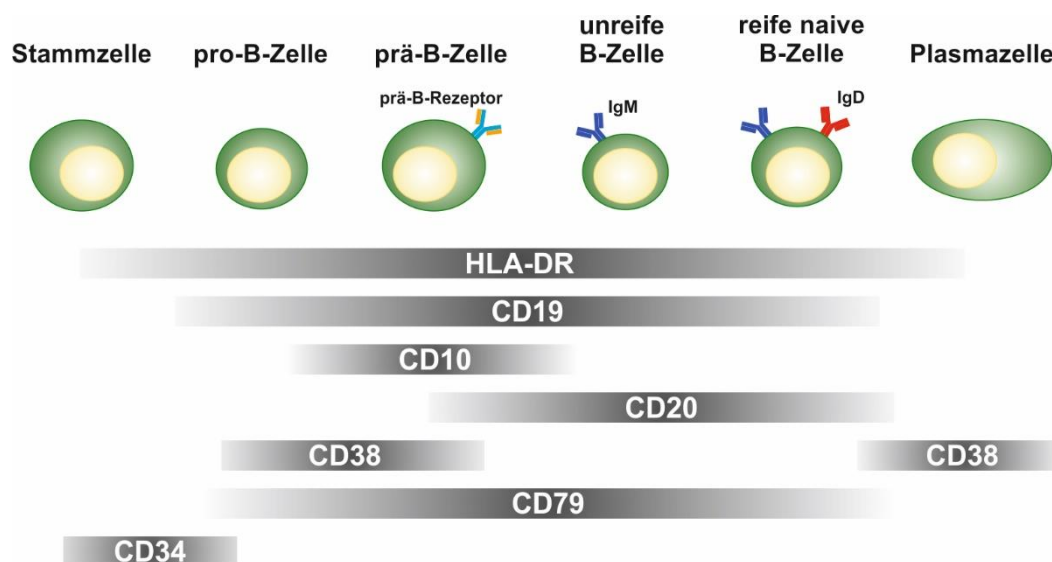
Leukämien der B-Zellen werden in eine akute und eine chronische Form eingeteilt, die sich hinsichtlich Erkrankungsalter, Verlauf und Prognose stark unterscheiden (Swerdlow et al. 2008). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) stellt dabei eine häufige maligne Erkrankung des Kindesalters dar und kann abhängig vom Differenzierungsstadium der Leukämiezellen in B-Vorläufer-ALL und die selten reife B-ALL eingeteilt werden (Gökbuget 2015; Hunger und Mullighan 2015). Zu den B-Vorläufer-ALLs zählen die pro-B-ALL, die common ALL sowie die prä-B-ALL (Gökbuget 2015). Bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) hingegen handelt es sich um eine langsam fortschreitende Erkrankung des älteren Menschen. Innerhalb der malignen Lymphome der B-Zell-Reihe wird aufgrund histologischer Eigenschaften zwischen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden. Diese können chronisch-indolent oder akut, aggressiv verlaufen. NHLs stellen dabei eine heterogene Gruppe sehr verschiedener Krankheitsbilder dar. Dazu werden unter anderem das Mantelzell-Lymphom, das Burkitt-Lymphom, das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom oder auch das Plasmozytom gezählt. Leukämien und Lymphomen der B-Zell-Reihe sind teilweise nicht immer eindeutig voneinander abgrenzbar und so wird beispielsweise die CLL zu den indolenten NHLs gezählt (Swerdlow et al. 2008).

Zur Behandlung der verschiedenen Leukämien und Lymphome der B-Zell-Reihe existieren je nach Art und Aggressivität der Erkrankung unterschiedliche Therapieschemata. Es kommen dabei verschiedene Therapieverfahren zum Einsatz, die kombiniert und auch simultan angewendet werden. Dazu zählen konventionelle Ansätze wie Chemotherapie oder auch Strahlentherapie. In einigen Fällen ist eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation notwendig. Aktuell spielen auch sogenannte zielgerichtete Therapieansätze, unter anderem sogenannte *small molecules*, wie beispielsweise Tyrosinkinase-Inhibitoren, sowie die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, eine immer größere Rolle (Greaves 2016).

#### **1.4.1 Zielantigene auf Leukämien und Lymphomen der B-Zell-Reihe**

Die Effektivität einer Antikörper-basierten Therapie und mit ihr verbundene Nebenwirkungen hängen sehr stark von dem gewählten Zielantigen ab. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung entsprechend geeignete Zielstrukturen zu identifizieren. Das Zielantigen eines therapeutischen Antikörpers soll dabei möglichst konstant, in großer Menge und insbesondere möglichst selektiv auf Tumorzellen exprimiert werden, um so eine spezifischere Therapie mit geringeren Nebenwirkungen als beispielsweise mit konventioneller Chemotherapie zu ermöglichen (Scott et al. 2012). Darüber hinaus soll das Zielantigen vorzugsweise nicht auf Stammzellen exprimiert werden, um im Anschluss an eine Therapie mit Antikörpern eine Regeneration gesunder Zellpopulationen zu ermöglichen. Gleichzeitig ist eine Expression auf Tumorstammzellen wünschenswert, um die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs zu verringern (Park et al. 2009).

Für B-Lymphozyten wurde eine Stadien-spezifische Expression von Differenzierungsantigenen während ihrer Entwicklung beschrieben (Abbildung 7), von denen einige Oberflächenantigene bereits klinisch vielfach genutzte Zielstrukturen in der Therapie von B-lymphoiden Neoplasien mit Antikörpern darstellen. Dabei handelt es sich bei den Zelloberflächenantigenen CD19, CD20 als auch CD22 aufgrund ihres überwiegend linien-restringierten Expressionsprofils um attraktive Zielantigene zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen der B-Zell-Reihe (Scheuermann und Racila 1995). Insbesondere CD20 ist eine sehr vielversprechende Zielstruktur, für die bereits mehrere Antikörper und Immunkonjugate die klinische Zulassung erhalten haben. Dementsprechend hat der CD20-Antikörper Rituximab die Prognose von vielen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen stark verbessert. Weitere CD20-gerichtete Antikörper, die sich in der klinischen Anwendung befinden, sind unter anderem Ofatumumab, Obinutuzumab und Ibritumomab-Tiuxetan (Scott et al. 2012; Weiner 2015). Auch für CD22 wurde mit Inotuzumab Ozogamicin ein Immunkonjugat durch die FDA zur Behandlung CD22-positiver B-Vorläufer-ALL zugelassen (Lamb 2017)



**Abbildung 7: Stadien-spezifisches Expressionsmuster von Differenzierungsantigenen während der B-Zell-Entwicklung.** B-Zellen exprimieren abhängig von ihrem Entwicklungsstadium verschiedene Differenzierungsantigene. Die exprimierten Antigene können potentielle Zielstruktur für eine Antikörper-basierte Therapie von Leukämien und Lymphomen der B-Zell-Reihe darstellen. Abgewandelt nach Rothe und Schmitz 1996.

Neoplasien, die allerdings aus einem sehr früheren Differenzierungsstadium hervorgehen, wie es bei vielen Formen der B-ALL insbesondere den B-Vorläufer-ALLs der Fall ist, exprimieren in der Regel kein CD20, da dieses erst ab dem Stadium der prä-B-Zelle nachgewiesen werden kann (Rothe und Schmitz 1996). So konnte für die B-Vorläufer-ALL gezeigt werden, dass über 50% der Patienten keine ausreichenden Mengen an CD20 exprimieren und für diese Patienten aus diesem Grund eine Therapie mit Rituximab nicht in Frage kommt (Jeha et al. 2006). In diesen Fällen ist ein Zielantigen wie beispielsweise CD19 notwendig, das bereits in früheren

Entwicklungsstadien exprimiert wird. Darüber hinaus entwickeln einige NHL-Patienten unter der Therapie mit Rituximab CD20-negative Tumorzellen und weisen somit eine Resistenz gegenüber Rituximab auf (Davis et al. 1999). Auch in diesen Situationen kann CD19 ein mögliches alternatives Zielantigen für eine weitere Behandlung mit therapeutischen Antikörpern darstellen und macht CD19 insgesamt zu einer sehr vielversprechenden Zielstruktur für die Therapie von B-Zell-Neoplasien.

#### **1.4.2 CD19 als Zielantigen auf Zellen B-lymphoider Neoplasien**

CD19 stellt ein sehr spezifisches Antigen für B-Lymphozyten dar, da es fast ausschließlich auf Zellen der B-Zell-Reihe exprimiert wird. Ob es darüber hinaus auch auf follikulär dendritischen Zellen exprimiert wird, ist noch nicht eindeutig geklärt (Schriever et al. 1989; Scheuermann und Racila 1995). Im Detail handelt es sich bei CD19 um ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 95 kDa, das der Immunglobulin (Ig) Superfamilie angehört (Tedder et al. 1994). Es zählt mit einer Transmembrandomäne, einem extrazellulären N- sowie einem intrazellulären C-Terminus zu den Typ 1 Transmembranproteinen. Der aus 242 Aminosäuren bestehende verhältnismäßig lange intrazelluläre Anteil von CD19 enthält neun konservierte Tyrosin-Reste, die Teil der Signalübertragung sind. Der extrazelluläre Bereich von CD19 setzt sich aus drei Domänen, zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen verbunden über eine kurze Sequenz, zusammen (Tedder und Isaacs 1989; Haas und Tedder 2005). Auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten assoziiert dieser extrazelluläre Anteil mit CD21 (CR2), CD225 (Leu-13) und CD81 (TAPA-1) (Bradbury et al. 1992). In diesem Komplex moduliert CD19 B-Zell-Rezeptor-abhängige sowie -unabhängige intrazelluläre Signalwege. Auf diese Weise ist es in die Regulation der Entwicklung und Aktivierung von B-Lymphozyten involviert (Wang et al. 2012). Die Expression von CD19 lässt sich in beinahe allen Entwicklungsstadien der B-Zellen nachweisen. So exprimieren bereits frühe Vorstufen wie die pro-B-Zelle CD19, während die Expression im Stadium der terminal differenzierten Plasmazelle wieder verloren geht (Nadler et al. 1983; Scheuermann und Racila 1995). Im Verlauf der B-Zell-Entwicklung zeigt sich dabei eine zunehmende Expressionsstärke von CD19 (Sato et al. 1997). Da CD19 nicht auf CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Scheuermann und Racila 1995), kann eine Regeneration der Lymphozyten nach einer durchgeführten Immuntherapie mit CD19 als Zielstruktur erfolgen. Insgesamt wird CD19 auf den meisten B-Zell-Neoplasien, einschließlich der aus frühen Entwicklungsstadien hervorgehenden häufig CD20-negativen B-Vorläufer-ALL, exprimiert (Jeha et al. 2006; Lang et al. 2004; Uckun et al. 1988). Ausnahmen, bei denen normalerweise kein CD19 nachgewiesen werden kann, sind das Plasmozytom und das Hodgkin-Lymphom (Masir et al. 2006). Dieses Expressionsmuster macht CD19 zu einer sehr attraktiven Zielstruktur auf B-Zell-Malignomen. Darüber hinaus ist von Bedeutung, dass der Antikörper-Antigen-Komplex nach Antikörperbindung an CD19 im Vergleich beispielsweise mit CD22 deutlich langsamer internalisiert wird (Press et al. 1989).

So kann CD19 zum einen als Zielantigen für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, zum anderen auch für Immuntherapie-Ansätze zur Rekrutierung von Immunzellen genutzt werden.

Ansätze mit unmodifizierten, monoklonalen Antikörpern gegen CD19 zeigten bisher keine Erfolge und die Antikörper weisen *in vitro* eine sehr geringe ADCC-, ADCP- und CDC-Aktivität gegenüber Leukämie- und Lymphomzellen auf (Horton et al. 2008; Kellner et al. 2013). Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um CD19 als effektive Zielstruktur zu nutzen. Durch Fc-Engineering von CD19-Antikörpern (siehe 1.3.1), wurden verschiedene neue Antikörper-Konstrukte entwickelt, um so die Zytotoxizität zu verbessern. So weist der glyko-optimierte, afucosylierte Inebilizumab (Medi-551) eine gesteigerte Affinität zu FcγIIIa-Rezeptoren auf. *In vitro* führte dies zu einer ausgeprägten ADCC- als auch ADCP-Aktivität mit Monozyten und NK-Zellen. Gleichzeitig zeigte der modifizierte Antikörper auch *in vivo* eine hohe therapeutische Aktivität (Matlawska-Wasowska et al. 2013). Inebilizumab wurde in einer klinischen Studie mit erwachsenen Patienten mit NHL, CLL oder weiteren B-Zell-Malignomen evaluiert und wies neben einer guten Verträglichkeit die gewünschte Antitumor-Aktivität auf (Forero-Torres et al. 2013). Auch der Protein-optimierte CD19-Antikörper MOR208 (früher Xmab®5574) mit der zweifachen Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E) in der C<sub>H2</sub>-Domäne weist eine gesteigerte ADCC- als auch ADCP-Aktivität auf (Horton et al. 2008). Dieser wird momentan in verschiedenen klinischen Studien getestet (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02763319, Identifier: NCT01685008). In weiteren *in vivo* Mausmodellen und einem CD19-Antikörper mit der entsprechenden DE-Substitution konnte die Effizienz dieses Antikörpers in einer experimentellen MRD- (engl. *minimal residual disease*, minimale Resterkrankung) Situation nachgewiesen werden (Schewe et al. 2017). Die MRD stellt einen prognostisch sehr wichtigen Faktor in der Therapie der ALL dar (Schrappe et al. 2011).

Da der Antigen-Antikörper-Komplex nach Antikörperbindung an CD19 internalisiert wird, stellt CD19 ebenfalls eine interessante Zielstruktur für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (siehe 1.3.2) dar. Das CD19-Immunkonjugat Coltuximab ravtansine (SAR3419), bestehend aus einem CD19-Antikörper verbunden mit dem Mikrotubuli-Gift Maytansinoid DM4, führte in einem *in vivo* Xenograftmodell zu verzögertem Wachstum von ALL (Carol et al. 2013). Eine kürzlich durchgeführte Phase-2-Studie an erwachsenen Patienten mit ALL wurde allerdings aufgrund sehr geringem klinischen Ansprechen auf das Immunkonjugat vorzeitig abgebrochen (Kantarjian et al. 2016). Mit Denintuzumab mafodotin (SGN-CD19A), einem weiteren Immunkonjugat aus einem CD19-Antikörper gekoppelt mit Monomethyl Auristatin F, wurden in einer Phase-1-Studie mit Patienten mit B-ALL und aggressiven B-Zell-Lymphomen vielversprechende Ergebnisse erzielt (Fathi et al. 2015).

Die größten klinischen Erfolge mit CD19 als Zielantigen wurden bislang mit T-Zell basierter Immuntherapie erzielt. BiTE-Moleküle (siehe 1.3.2) wie Blinatumomab, die durch ihre Antigen-spezifität für CD3, in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren, zeigten in zahlreichen



klinischen Studien mit Patienten mit einer Form von B-Vorläufer-ALL hohe antileukämische Aktivität (Martinelli et al. 2017; Topp et al. 2015). Blinatumomab wurde auf Grund der nachgewiesenen Effektivität von der FDA zur Behandlung von adulter und pädiatrischer refraktärer oder rezidivierender ALL zugelassen (Pulte et al. 2018).

Ein weiterer T-Zell-basierter Ansatz ist die sehr vielversprechende *chimeric antigen receptor* (CAR) Technologie, bei der dem Patienten genetisch modifizierte T-Zellen injiziert werden. Bei CD19-CAR T-Zellen im Speziellen handelt es sich um T-Zellen, die einen CD19-spezifischen CAR exprimieren. Dieser chimäre Rezeptor setzt sich zur Antigenbindung aus einem CD19-scFv gebunden an eine intrazelluläre Aktivierungsdomäne ( $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptor-Komplexes) sowie einer kostimulatorischen Domäne, z.B. CD28 oder CD134, zusammen (Dotti et al. 2014). Durch die Verwendung von autologen T-Zellen kann dabei die Gefahr einer Graft-versus-Host-Erkrankung vermieden werden (Ramos et al. 2014). Dazu werden dem Patienten mittels Leukapherese T-Zellen entnommen und mit dem CAR-Konstrukt transduziert. Die CAR T-Zellen werden *ex vivo* in Anwesenheit spezifischer Wachstumsfaktoren expandiert und dem Patienten anschließend über Infusionen reinjiziert (Aldoss et al. 2017). In mehreren klinischen Studien mit CD19-CAR T-Zellen und Patienten mit ALL oder B-Zell-Lymphomen konnten große klinische Erfolge erzielt werden (Lee et al. 2015; Schuster et al. 2017). Im August 2017 wurden CD19-CAR T-Zellen unter dem Namen Kymriah (Tisagenlecleucel) als erste Gentherapie durch die FDA zur Behandlung pädiatrischer B-Vorläufer-ALL zugelassen (O'Leary et al. 2019).

## 1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Therapeutische Antikörper stellen heutzutage einen fest etablierten Bestandteil in der Therapie vieler maligner Erkrankungen dar. Allerdings wird aktuell nach Strategien gesucht, die Therapie mit Antikörpern weiter zu verbessern, da bislang nicht alle Patienten gleichermaßen von dieser Therapieform profitieren. Eine der derzeit vielversprechendsten Strategien stellt das Fc-Engineering da. Dabei kann sowohl die Aminosäuresequenz (Protein-Engineering) als auch die Glykosylierung (Glyko-Engineering) der Fc-Domäne eines Antikörpers verändert werden, um so die ADCC- oder CDC-Aktivität zu verbessern. Bisher wurden allerdings in der Regel Ansätze beschrieben, die entweder ADCC oder CDC, aber nicht beide Effektor-mechanismen gleichzeitig steigerten. Für Zielantigene wie CD19 stellt sich das Optimieren von entsprechenden Antikörpern als zwingend erforderlich dar, da entsprechend des derzeitigen Wissenstandes der native IgG1 CD19-Antikörper nicht in der Lage ist, effektiv Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zu vermitteln, und somit nicht therapeutisch nutzbar ist.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob durch bereits etablierte Fc-Engineering-Strategien auch im Hintergrund eines CD19-Antikörpers eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität erreicht werden kann. Dazu wurden verschiedene,

durch Fc-Engineering optimierte CD19-Antikörpervarianten charakterisiert und funktionell getestet. Diese sollten dabei hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens, ihrer Glykosylierung und ihrer Zytotoxizität mit einem nativen IgG1 CD19-Antikörper verglichen werden. Dabei wurde in dem Versuch, einen Antikörper mit sowohl gesteigerter ADCC- als auch CDC-Aktivität zu generieren, eine Antikörpervariante getestet, die durch das Kombinieren von Protein- und Glyko-Engineering zweifach optimiert war. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der zur Steigerung der CDC eine fünffache Aminosäuresubstitution (S267E/H268F/S324T/G236A/I332E) in der Fc-Domäne enthielt. Gleichzeitig sollte dieser Antikörper glyko-optimiert werden, indem der Fucose-Gehalt der Fc-Domäne reduziert wurde, um so auch die ADCC-Fähigkeit zu steigern. Für dieses CD19-Konstrukt sollte im Rahmen der Arbeit überprüft werden, ob es sowohl potent CDC als auch ADCC vermittelt. Entsprechende Varianten für CD19 sind bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Gleichzeitig wurde neben der doppelt optimierten Antikörpervariante jeweils die entsprechende rein Protein-optimierte als auch eine rein glyko-optimierte Variante getestet. Zum Vergleich wurden auch ein Protein-optimierter Antikörper, der analog zum derzeit klinisch getesteten Antikörper MOR208 die zweifache Aminosäure-substitution DE (S239D/I332E) enthielt, sowie dessen afucosylierte, glyko-optimierte Variante mitgeführt.

Die so erzielten Ergebnisse sollten weitere Informationen und Erkenntnisse über die Wirkungsweise therapeutischer Antikörper sowie neue Ansatzpunkte zur Optimierung der Antikörper durch Fc-Engineering erbringen. Darüber hinaus sollten so neue, potentielle therapeutische Antikörper für Leukämien- oder Lymphomformen, insbesondere für solche, die kein CD20 exprimieren und somit nicht für eine Therapie mit CD20-gerichteten Antikörpern wie Rituximab infrage kommen, identifiziert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
<sup>51</sup> Chrom	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Aqua dest.	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Biotinylated Aleuria Aurantia Lectin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CaptureSelect® IgG-C <sub>H</sub> 1 affinity matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) + 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol >99%	Merck KGaA, Darmstadt, D
Flow-Count™ Fluorospheres	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Geneticin	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Hank's salt solution (HBSS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hygromycin B	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
IVIg (Intratect®)	Biotest, Dreieich, D
Lepirudin (Refludan®)	Celgene, Summit, NJ, USA
Magermilchpulver (MMP)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
McCoy's 5A Medium (1x) + L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methotrexat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Minimum Essential Media Alpha Medium (MEM alpha) (1x) + GlutaMax™-I + Ribonucleosides + Deoxyribonucleosides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
NeutrAvidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Percoll	Biochrom AG, Berlin, D
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (1x) + GlutaMax™-I + 25 mM HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trypsin/EDTA	gibco by life technologies™, Darmstadt, D
Trypan Blau Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TWEEN 20	Merck KGaA, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.2 Kits

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Experion™ Pro260 Reagents and Supplies + Pro260 Chips	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
SuperSignal® West Dura Extended Duration Chemiluminescent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
VersaLyse™ lysing solution	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x Protein-Probenpuffer (reduzierend)	313 mM Tris, 10% w/v SDS, 0,05% Bromphenolblau, 50% v/v Glycerin, 0,5 M Dithiothreitol
5x Protein-Probenpuffer (nicht-reduzierend)	313 mM Tris, 10% w/v SDS, 0,05% Bromphenolblau, 50% v/v Glycerin
Bindepuffer (C <sub>H</sub> 1-affinity matrix)	1x PBS, pH 7,5
Blocking-Puffer (anti-human IgG-Blot)	TBS, 5% MMP
Elutionspuffer (C <sub>H</sub> 1-affinity matrix)	0,1 M Glycin, pH 3
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% w/v SDS, pH 8,3
PBA	1x PBS, 1% w/v BSA
Puffer A (Lektin-Blot)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 90 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 50 mg/ml BSA
Puffer B (Lektin-Blot)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 90 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,05% Tween20, 5 mg/ml BSA
TBS	150 mM NaCl, pH 7,5, 10 nM Tris
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% v/v Methanol, pH 8,3
Waschpuffer (anti-human IgG-Blot)	50 mM Tris-Cl pH 7,5 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% TritonX-100

## 2.1.4 Zelllinien

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Referenz
BHK-21 CD16a-158F	Nierenfibroblasten des syrischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für die FcεRI γ Kette und die humane FcγRIIIa-158F cDNA	-	(Glorius et al. 2013)
BHK-21 CD16a-158V	Nierenfibroblasten des syrischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für die FcεRI γ Kette und die humane FcγRIIIa-158V cDNA	-	(Glorius et al. 2013)
CHO-K1 4D5 DE	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-DE	-	M. Peipp, nicht publiziert
CHO-K1 4D5 EFTAE	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-EFTAE	-	M. Peipp, nicht publiziert
CHO-K1 4D5 wt	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-wt	-	M. Peipp, nicht publiziert
CHO-K1 CD19	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für CD19	-	M. Peipp, nicht publiziert
CHO-K1 CD19 DE	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-DE	-	M. Peipp, nicht publiziert

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Referenz
CHO-K1 CD19 EFTAE	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-EFTAE	-	M. Peipp, nicht publiziert
CHO-K1 CD19 wt	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-wt	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 4D5 DE	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-EFTAE	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 4D5 EFTAE	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-EFTAE	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 4D5 wt	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper HER2-wt	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 CD19 DE	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-DE	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 CD19 EFTAE	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-EFTAE	-	M. Peipp, nicht publiziert
Lec13 CD19 wt	CHO-Variante, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für den Antikörper CD19-wt	-	M. Peipp, nicht publiziert
Raji	Humane Burkitt-Lymphom Zellen	DSMZ	(Pulvertaft 1964)
Ramos	Humane Burkitt-Lymphom Zellen	DSMZ	(Klein et al. 1975)
SK-BR-3	Humane Brustkarzinom Zellen	DSMZ	(Trempe 1976)

## 2.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien

Zelllinien	Medium	Zusammensetzung
BHK-21 CD16a-158F, BHK-21 CD16a-158V	R10 <sup>++</sup>	RPMI 1640 + Glutamax-I + 25 mM HEPES 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin 10 µmol/l Methotrexat 500 µg/ml Geneticin
CHO-K1 stabil transfizierte Subklone	D10 <sup>+</sup>	DMEM + 4,5 g/l D-Glukose, L-Glutamine 10% fetales Kälberserum (dialysiert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Hygromycin
Lec13 stabil transfizierte Subklone	MEM alpha <sup>+</sup>	MEM alpha + Glutamax-I + Ribonukleoside + Desoxyribonukleoside 10% fetales Kälberserum (dialysiert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% Hygromycin
Raji, Ramos	R10 <sup>+</sup>	RPMI 1640 + Glutamax-I + 25 mM HEPES 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin
SK-BR-3	McCoy's 5A <sup>+</sup>	McCoy's 5A + L-Glutamine 10% fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin



## 2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten konjugierten Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
CD3-Krome Orange	muriner IgG1, Klon UCHT1, Krome Orange-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD14-FITC	muriner IgG2a, Klon RMO52, FITC-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD15-FITC	muriner IgM, Klon 80H5, FITC-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD19-FITC	muriner IgG1, Klon J3-119, FITC-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD20-FITC	muriner IgG2a, Klon B9E9, FITC- gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CD56-PC7	muriner IgG1, Klon N901, PC7- gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IgG1-FITC	muriner IgG1, Klon 679.1Mc7, FITC-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IgG1-Krome Orange	muriner IgG1, Klon 679.1Mc7, Krome Orange-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IgG1-PC7	muriner IgG1, Klon 679.1Mc7, PC7-gekoppelt	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Kaninchen anti-human C1q-Complement FITC	Kaninchen polyklonaler IgG, FITC-gekoppelt	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ziege anti-human IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment-FITC	Ziege F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, anti-human IgG Fcγ-Fragment spezifisch, polyklonal, FITC-gekoppelt	Jackson Immuno Research, Ely, UK
Ziege anti-human IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment-PE	Ziege F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, anti-human IgG Fcγ-Fragment spezifisch, polyklonal, PE-gekoppelt	Jackson Immuno Research, Ely, UK
Ziege anti-human IgG-HRP	Ziege, anti-human IgG Fc-Fragment spezifisch, polyklonal, HRP-gekoppelt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten unkonjugierten Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller/Referenz
Eculizumab (Soliris®)	humanisierter, monoklonaler Komplementfaktor C5 IgG2/4	Alexion Pharmaceuticals, New Heaven, CT, USA
Rituximab (MabThera®)	chimärer, monoklonaler CD20 IgG1	Roche, Basel, Schweiz
RTX-EFTAE	monoklonal, mutierter CD20 IgG1, S267E/H268F/S224T/G236A/I332E	M. Peipp, nicht publiziert
Trastuzumab (Herceptin®)	humanisierter, monoklonaler HER2 IgG1	Roche, Basel, Schweiz

### 2.1.7 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstände	Hersteller
Biosphere® Fil. Tip 10 farblos (2,5 µl /10µl/100µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Röhrchen (15ml/50ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikro-Schraubenröhre (1,5ml/2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96 Wells, Rundboden steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 9NC	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Hirudin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Z	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (2ml/10ml/25ml/50ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## 2.1.8 Geräte

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
AF 206 Eismaschine	Scotsman Ice, Vernon Hills, IL, USA
Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Bio Vortex V1	Lab4you GmbH, Wien, Österreich
ChemiDoc™ XRS + System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Eppendorf Reference® Pipette 0,1-2,5 µl/0,5-10 µl/100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Researche® plus Experion Pro260	Eppendorf AG, Hamburg, D Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Heracell 240 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 3S+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Navios™ Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, D
pH 211 Microprocessor pH Meter	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Serologische Pipetten 2 ml/5 ml/10 ml/25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

## 2.1.9 Software

Tabelle 11: Übersicht über die verwendete Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
1450 MicroBeta Workstation Software	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
CorelDRAW 2018	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Discovery Studio Visualizer	Biovia, San Diego, CA, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Kaluza Analysis-Software	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Mendeley Desktop	Mendeley Inc., New York, NY, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Quantity One	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zellkulturen wurden bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zelllinien in Suspension wurden zweimal pro Woche, adhärenente Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Die adhärenenten Zelllinien wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin/EDTA bzw. Accutase gelöst wurden. Anschließend wurden die suspendierten Zellen in frischen Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3 bis 1:20 ausgesät. Suspensionszelllinien wurden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:8 passagiert. Die einzelnen Zelllinien und entsprechenden Nährmedien sind in den Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Neubauer-Zählkammern. Dazu wurde die Zellsuspension zum Anfärben toter Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:20 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Zellkonzentration} \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 2.2.2 Expression und Reinigung der Antikörper

Zur Expression der verschiedenen Antikörperkonstrukte wurden jeweils stabil transfizierte CHO-K1 und Lec13 Zelllinien verwendet (Ripka et al. 1986). Diese enthielten entsprechende Expressionsvektoren, die für die leichte (LC) und schwere IgG-Kette (HC) kodierten. Die einzelnen Zelllinien wurden in den jeweiligen Nährmedien kultiviert und die Zellkulturüberstände gesammelt. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert, bevor sie bei 540 x g für 5 min zentrifugiert und steril filtriert wurden. Die weitere Aufreinigung der Antikörperkonstrukte erfolgte mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung von *CaptureSelect™ IgG-C<sub>H</sub>1 Affinity Matrix* (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurde die Affinitätsmatrix dem Zellüberstand hinzugefügt (1ml Matrix pro 1l Überstand) und über Nacht bei 4°C verrührt. Durch Zentrifugation wurde die Matrix gesammelt und auf *Poly-Prep® Chromatographie Säulen* (Bio-Rad) aufgetragen. Die folgenden Schritte der Aufreinigung erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Die Elution der Antikörperkonstrukte erfolgte in mehreren Fraktionen durch Zugabe des Elutionspuffers. Zuletzt wurden die Proteine 10.000-fach gegen 1x PBS dialysiert und eingeeengt.

### 2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) stellt eine Möglichkeit dar, Proteine anhand ihrer molekularen Masse aufzutrennen. Dazu wurden Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von 6% und 10% hergestellt (Tabelle 12). Zu den aufzutragenden Proteinproben wurde vor Verwendung reduzierender bzw. nicht-reduzierender 5x Probenpuffer hinzugefügt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 16060 x g zentrifugiert und jeweils 5 bis 10 µl in die Geltaschen aufgetragen. Als Proteinstandard wurden 5 µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standard verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte für 10 min mit einer Spannung von 100 V und für weitere 1-2 h mit 120 V. Im Anschluss wurden die Gele je nach Bedarf mit *Roti®-Blue* (Carl Roth GmbH) nach Herstellerangaben gefärbt (Coomassie-Blau Färbung) oder für Western Blot Versuche eingesetzt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung von hergestellten 6 bzw. 10%-igen SDS-Gelen, Ansatz für 2 Gele**

Lösung	Sammelgel	Trenngel 6%-ig	Trenngel 10%-ig
H <sub>2</sub> O	1,72 ml	5,3 ml	4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	0,5 ml	2 ml	3,3 ml
Tris 1,5 M	-	2,5 ml	2,5 ml
Tris 0,5 M	0,76 ml	-	-
SDS 10%	0,03 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS 10%	0,03 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,003 ml	0,008 ml	0,004 ml

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmung der Antikörper-Chargen

Die Bestimmung der Konzentration der einzelnen Antikörper-Chargen erfolgte mittels Kapillarelektrophorese unter Verwendung von *Experion™ Pro260 Chips* (Bio-Rad Laboratories, Inc) nach Angaben des Herstellers oder durch den Vergleich mit Standardkurven von Rituximab. Dazu wurden verschiedene, definierte Mengen von Rituximab mit den verschiedenen Antikörper-Fraktionen in SDS-PAGE Gelen und anschließender Färbung mit *Roti® -Blue* verglichen. Aufgetragen wurden dafür 0,1 µg bis 5 µg Rituximab und 0,5 µl bis 10 µl des zu analysierendem Antikörpers.

## 2.2.5 Proteintransfer und Immundetektion von Proteinen

Um verschiedene Anteile der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nachzuweisen, wurden die einzelnen Proteinbanden vom Gel auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid) Membran (Bio-Rad Laboratories, Inc.) übertragen. Die Übertragung erfolgte nach Herstellerangaben durch Anlegen eines elektrischen Feldes im *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h.

### 2.2.5.1 Anti-human IgG-Blot

Der Nachweis des humanen Fc-Teils der Antikörper erfolgte mittels Ziegen anti-human IgG-HRP (Sigma-Aldrich). Dazu wurde die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler mit dem Blocking-Puffer inkubiert und so freie Bindungsstellen gesättigt. Im nächsten Schritt wurde das Ziegen anti-human IgG-HRP Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000 hinzugegeben und für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für je 10 min mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor zur Auswertung *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) hinzugegeben wurde. Mit *ChemiDoc™ XRS+ System* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) wurde ein digitales Bild der PVDF-Membran erstellt.

### 2.2.5.2 Lektin-Blot

Zum Nachweis der  $\alpha$ 1,6-gebundenen Fucose des Fc-Teils wurde ein Lektin-Blot mit *Aleuria Aurantia Lectin* (Vector Laboratories) durchgeführt (Repp et al. 2011). Dazu wurde die PVDF-Membran mit dem Puffer A für 1 h bei 37 °C inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden 5  $\mu$ g/ml *Aleuria Aurantia Lectin* hinzugefügt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für jeweils 10 min mit Puffer B gewaschen und für weitere 30 min bei Raumtemperatur in Puffer A/0,05% Tween20 und 1  $\mu$ g/ml *NeutrAvidin-HRP* (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 10 Mal für jeweils 5 min mit Puffer B gewaschen. Zur Darstellung der Fraktionen wurde *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* verwendet und mit *ChemiDoc™ XRS+ System* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ein digitales Bild erstellt.

## 2.2.6 Durchflusszytometrische Methoden

Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) stellt ein Verfahren dar, durch das Zellen bezüglich ihrer Größe, Struktur und Fluoreszenz analysiert werden können. Dabei werden die Zellen einzeln in einem sehr hohen Tempo an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das Laser-Licht wird beim Auftreffen auf eine Zelle abhängig von deren Größe und Granularität charakteristisch gestreut und von Detektoren registriert. Dabei kann man zwischen Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC), dessen Intensität vor allem abhängig von der Zellgröße ist, und dem Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC), dessen

Intensität hauptsächlich von der zellulären Granularität abhängig ist, unterscheiden (Rothe, 2007). Zudem können durch die Markierung der Zellen mit speziellen Farbstoff-gekoppelten Antikörpern weitere Zell-Eigenschaften wie Oberflächenantigene untersucht werden.

Für die durchflusszytometrischen Analysen kam das *Navios™ flow cytometer* (Beckman Coulter, Brea) zum Einsatz. Durch das Einfügen entsprechender Analysefenster im FSC/SSC um die zu untersuchenden Zellen wurden tote Zellen und Zellkonjugate in der Auswertung nicht berücksichtigt.

#### **2.2.6.1 Analyse der Bindung der Antikörper**

Zur Analyse der Bindung wurden pro Ansatz jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen mit der entsprechenden primären Antikörper-Verdünnung für 30-40 min auf Eis inkubiert. Als negative Kontrolle wurde in einen Ansatz ausschließlich 50 µl PBA hinzugefügt. Die Ansätze wurden zweimal mit 1,5 ml kaltem PBA gewaschen und im Anschluss mit dem entsprechenden Sekundärintikörper (anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragment-PE oder anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragment-FITC) 30 min abgedunkelt auf Eis bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 1,5 ml PBA wurden die Zellen in 500 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Für die Analyse wurden pro Probe 10.000 Zellen gemessen.

Zur Analyse der spezifischen Bindung an das Zielantigen wurden CHO-K1 CD19 oder Ramos Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten für Leukämien und Lymphome nicht-relevante Antikörper (Trastuzumab und HER2-Antikörpervarianten) und die CD19-negative Zelllinie SK-BR-3. Weiterhin wurden zur Bestimmung der Bindung an FcγRIIIa BHK-21 CD16a-158V und BHK-21 CD16a-158F Zellen eingesetzt.

#### **2.2.6.2 Analyse der C1q-Bindung**

Zur Analyse der C1q-Bindung der verschiedenen Antikörperkonstrukte wurden  $0,3 \times 10^6$  Raji Zellen mit den entsprechenden primären Antikörpern (100 µg/ml) in 50 µl R10+ für 20 min auf Eis inkubiert. Für den Serum-Ansatz als Quelle der Komplementfaktoren wurde humanes Serum durch Zugabe von R10+ Medium auf eine Endkonzentration von 2% gebracht. Zur Neutralisation des Faktor C5 wurde Eculizumab (Alexion Pharma) in einer Konzentration von 200 µg/ml hinzugefügt und der Serum-Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden davon 50 µl zu den mit Antikörper beladenen Zellen gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal gewaschen und der Kaninchen anti-human C1q-Complement-FITC (Dako) Sekundärintikörper hinzugefügt. Nach abgedunkelter Inkubation für 1 h auf Eis und erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen in kaltem PBA resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen. Pro Probe wurden  $1 \times 10^5$  Zellen gemessen.



### 2.2.6.3 B-Zell-Depletion

Für diese Versuche wurde freiwilligen, gesunden Spendern nach der schriftlichen Einwilligung Blut entnommen (Hirudin-Röhrchen). Pro Ansatz wurden 200 µl Vollblut mit jeweils verschiedenen Antikörperkonzentrationen versetzt und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Per Durchflusszytometrie wurden die Proben auf Depletion von B-Zellen untersucht. Dazu wurden 100 µl einer Probe jeweils mit dem in Tabelle 13 aufgeführten Antikörper-Mix versetzt und 30 min im Dunkeln bei 4°C auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde zur Lyse der Erythrozyten 1 ml *VersaLyse™ lysing solution* (Beckman Coulter) hinzugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimalig mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und für 5 min mit 540 x g zentrifugiert. Zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen und 100 µl Flow Count hinzugefügt. Pro Probe wurden jeweils 1 x 10<sup>5</sup> Zellen gemessen. Der Anteil der verbleibenden B-Zellen (CD20<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) ergab sich aus folgender Berechnung mit der maximalen Anzahl verbleibender B-Zellen aus unbehandelten Kontrollen:

$$\text{Anteil verbleibender B - Zellen (\%)} = \frac{\text{Anzahl verbleibender B - Zellen}}{\text{Maximale B - Zell - Anzahl}} \times 100$$

Tabelle 13: Protokoll zum Nachweis von B-Zellen

Protokoll	Lösung	Inkubationszeit
Färbung	Antikörper-Mix: 10 µl CD20-FITC 10 µl CD3-Krome Orange 10 µl Intratect (1:5)	30 min im Dunkeln bei 4 °C auf Eis
Erythrozyten-Lyse	1 ml VersaLyse™ lysing solution	20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur
2 x Waschen	1 ml PBS	-

Zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der B-Zellen wurden bereits am Tag der Vollblut-Entnahme 100 µl Vollblut jeweils mit dem in Tabelle 13 aufgeführten Antikörper-Mix versetzt und 30 min im Dunkeln bei 4°C auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde wie bereits beschrieben weiter vorgegangen. Des Weiteren wurden die Ausgangskonzentration verschiedener Effektorzellpopulationen, wie NK-Zellen, Granulozyten und Monozyten bestimmt. Dazu wurden 100 µl Vollblut jeweils mit 10 µl CD3-Krome Orange, 10 µl Intratect (1:5) und 10 µl CD14-FITC (Monozyten) oder 10 µl CD15-FITC (Granulozyten) oder CD56-PC7 (NK-Zellen) versetzt. Der Ansatz wurde 30 min im Dunkeln bei 4°C auf Eis inkubiert und anschließend wie vorher beschrieben weiter verfahren.

### 2.2.7 Isolierung von Effektorzellen und Plasma aus peripherem Blut

Freiwilligen, gesunden Spendern wurde nach der schriftlichen Einwilligung Blut abgenommen. Zur Isolierung der Effektorzellen und Plasma wurden jeweils 5 ml peripheres Blut langsam zu 6 ml 63% Percoll/Hank's salt solution geben. Nach 20 min Zentrifugation bei 1340 x g ohne Bremse wurden Plasma und mononukleäre Zellen vorsichtig aus den entsprechenden Abschnitten isoliert. Das Plasma wurde je nach Bedarf direkt für einen <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungsversuch eingesetzt oder erneut 20 min bei 860 x g zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die aus dem Gradienten extrahierten Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Gegebenenfalls wurde eine hypotone Lyse der Erythrozyten mit 4 °C kaltem destilliertem Wasser für 30 Sekunden durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml R10+ aufgenommen und mittels Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die isolierten mononukleären Zellen (engl. *mononuclear cells*, MNC) wurden direkt für weitere Experimente eingesetzt.

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

Zur Analyse der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC) als auch der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) der verschiedenen Antikörper-Varianten wurden <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuche durchgeführt.

Dazu wurden jeweils 1,2 x 10<sup>6</sup> Zielzellen mit 100 µCi <sup>51</sup>Cr für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zielzellen wurden dreimal mit 7 ml R10+ und fünf minütiger Zentrifugation bei 540 x g gewaschen, um das nicht aufgenommene Chrom zu entfernen. Durch Zugabe von R10+ wurden die Zellen auf eine Endkonzentration von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt. Für jeden Ansatz wurden pro Bohrung einer 96 well Platte 50 µl Zielzellen, 50 µl mit 50 E/ml Lepirudin (Refludan®) versetztes Plasma oder 50 µl Effektorzellen und Antikörper in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Das Endvolumen von 200 µl pro Bohrung wurde mit R10+ Medium eingestellt. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen (E:T-Ratio) betrug 40:1. Pro Ansatz wurden Triplets angelegt. Nach Inkubation für 3 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zentrifugation beendet. Im Anschluss wurden 25 µl Probenüberstand und 125 µl *OptiPhase Supermix* (PerkinElmer) auf eine Reader-Platte (PerkinElmer) pipettiert und für 15 min auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Messung des freigesetzten Chrom-51 erfolgte in *counts per minute* (cpm) in einem *beta-Counter 1450 MicroBetaTriLux* (PerkinElmer). Die spezifischen Lyseraten wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle cpm} - \text{basale cpm})}{(\text{maximale cpm} - \text{basale cpm})} \times 100$$

Die experimentelle  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (experimentelle cpm) entsprach dem freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  im Probenüberstand des Ansatzes. Zur Ermittlung der maximalen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (maximale cpm) wurde 1% v/v Triton X-100 zu den Zielzellen hinzugefügt (50  $\mu\text{l}$  Zielzellen, 50  $\mu\text{l}$  RPMI, 100  $\mu\text{l}$  Triton X-100). Die basale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung (basale cpm) wurde anhand von Zielzellen in Kulturmedium ohne Antikörper und Effektoren bestimmt (50  $\mu\text{l}$  Zielzellen, 150  $\mu\text{l}$  RPMI).

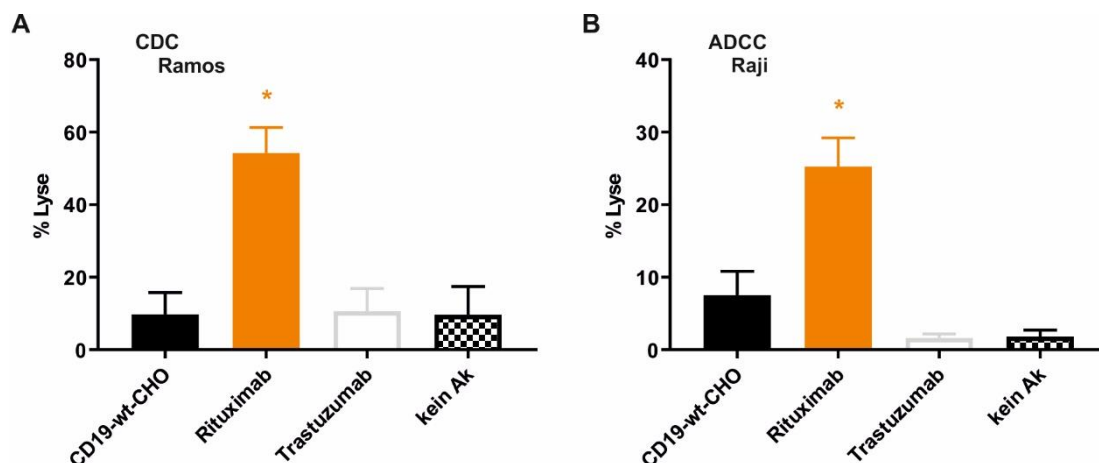
### **2.2.9 Statistische Analyse**

Die Daten wurden graphisch und statistisch mit der Software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.) ausgewertet. Dargestellt werden die Daten als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Unterschiede zwischen den Datensätzen wurden mittels ein- oder zweifaktorieller ANOVA mit Bonferoni Post-Test analysiert. Bei einem Wert  $p \leq 0,05$  wurden statistische Unterschiede als signifikant akzeptiert und sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Effektormechanismen von Wildtyp CD19-Antikörpern

In der Literatur wurde beschrieben, dass IgG1 Antikörper gerichtet gegen den B-Zelloberflächenmarker CD19 kaum zytotoxische Aktivität gegen Leukämie- oder Lymphomzellen vermitteln (Horton et al. 2008; Kellner et al. 2013). Diese Tatsache wurde zu Beginn der Arbeit in <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen bestätigt (Abbildung 8). Dabei wurden CD19-positive Ramos und Raji Burkitt-Lymphom Zellen als Zielzellen verwendet und entweder humanes Plasma oder mononukleäre Zellen als Quelle für Komplement bzw. Effektorzellen eingesetzt. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass der native CD19 IgG1 Antikörper (CD19-wt-CHO) nicht in der Lage war, effektiv CDC oder ADCC gegenüber den eingesetzten Zielzellen zu vermitteln. Zum Vergleich wurde bei dem therapeutisch eingesetzten CD20-Antikörper Rituximab sowohl eine hohe CDC- als auch ADCC-Aktivität beobachtet. Trastuzumab als Isotyp-Kontrolle war nicht in der Lage gegen die eingesetzten HER2-negativen Zielzellen Zytotoxizität zu vermitteln.



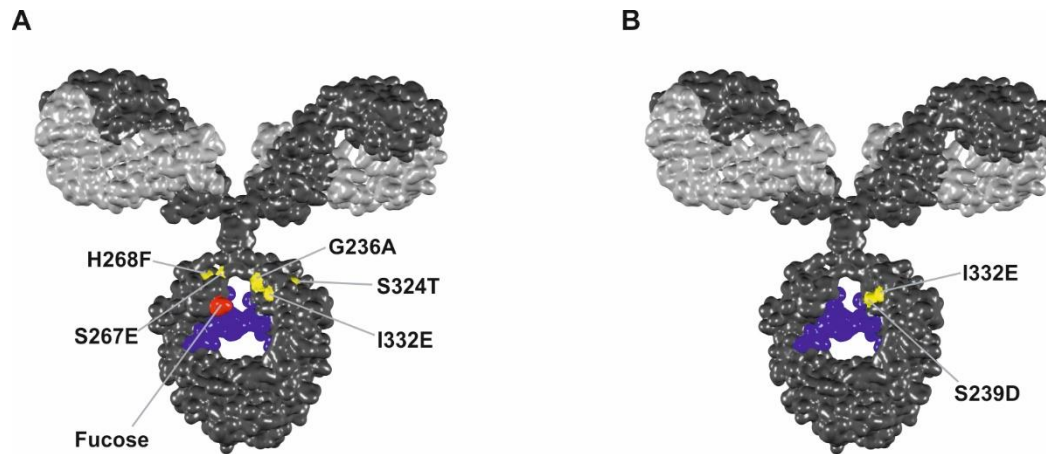
**Abbildung 8: CDC und ADCC des Wildtyp CD19-Antikörpers im Vergleich mit Rituximab.** (A) Zur Untersuchung der CDC-Aktivität wurden Ramos Zellen mit den angegebenen Antikörpern (Konzentration 10 µg/ml) und humanem Plasma (25%) inkubiert. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu Trastuzumab und ohne Antikörper sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Plasma von verschiedenen gesunden Spendern. (B) Raji Zellen wurden mit den angegebenen Antikörpern (Konzentration 2 µg/ml) und humanen mononukleären Zellen (E:T-Ratio 40:1) inkubiert und so die ADCC-Aktivität analysiert. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu Trastuzumab und ohne Antikörper sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern. Ak, Antikörper.

### 3.2 Eingesetzte Antikörpervarianten

Aufgrund der dargestellten geringen Zytotoxizität nativer CD19-Wildtyp Antikörpern wurden in Vorarbeiten unter Verwendung der variablen Domäne des Antikörpers MOR208 (Amersdorffer et al. 2012; Schewe et al. 2017) Expressionskonstrukte und stabil transfizierte Produktionslinien für verschiedene Fc-optimierte CD19-Antikörpervarianten generiert, um eine Verbesserung der ADCC- oder der CDC-Aktivität zu erreichen (M. Peipp, nicht publiziert). Im Folgenden sollten diese Varianten exprimiert, gereinigt, charakterisiert und auf ihre Effektor-mechanismen hin analysiert werden.

Verglichen wurden dabei sechs verschiedene CD19-Antikörperkonstrukte, unter anderem der native IgG1 CD19-Antikörper (CD19-wt-CHO). Bei den weiteren CD19-Antikörpern handelte es sich um unterschiedliche Fc-optimierte Konstrukte. Die Grundstruktur aller Varianten bestand jeweils aus einem humanem IgG1 Antikörper mit  $\kappa$ -Leichtketten. Eine der CD19-Antikörpervarianten enthielt dabei die EFTAE-Modifikation mit den Aminosäuresubstitutionen S267E/H268F/S324T/G236A/I332E in der C<sub>H</sub>2-Domäne (Abbildung 9A). Für diese Fc-Variante war gezeigt worden, dass sie bei unveränderter ADCC-Aktivität gesteigert CDC vermittelt (Moore et al. 2010). Um gleichzeitig auch die ADCC-Aktivität zu steigern, wurde der Antikörper mit der EFTAE-Mutation in Lec13 Zellen exprimiert, um so auch die Glykosylierung des Fc-Teils zu verändern. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine mutierte Variante der CHO-Zelllinie, die aufgrund eines inaktiven Enzyms nicht in der Lage sind, Fucose zu synthetisieren und so Antikörper mit einem niedrigen Fucosegehalt produzieren (Ripka *et al.*, 1986). Durch die Expression in dieser Zelllinie wurden Protein- und Glyko-Engineering kombiniert und damit ein afucosyliertes CD19-Antikörperkonstrukt mit der EFTAE-Substitution generiert. Indem der Antikörper mit der fünffachen Aminosäuresubstitution in CHO-K1 Zellen produziert wurde, enthielt dieser die reguläre, fucosylierte Kohlenhydratstruktur eines IgG1 Antikörpers. Auch die CD19-wt-Variante mit nicht-modifizierter Aminosäuresequenz wurde sowohl in CHO-K1 Zellen als auch in Lec13 Zellen exprimiert und so ein fucosylierter als auch ein afucosylierter Antikörper ohne die EFTAE-Mutation generiert (Abbildung 10).

Zudem wurde auch eine Antikörpervariante mit den Aminosäuresubstitutionen S239D/I332E (DE-Modifikation) im Fc-Teil hergestellt (Schewe et al. 2017). Diese Substitutionen im Fc-Teil trägt auch der sich momentan in klinischen Studien befindende CD19-Antikörper MOR208 (früher Xmab<sup>®</sup>5574) (Horton et al. 2008; Kellner et al. 2013). Die DE-Mutation führt zu einer deutlich gesteigerten Affinität zu Fc $\gamma$ II- und Fc $\gamma$ III-Rezeptoren und so bei unveränderter, bei CD19-Antikörpern typischerweise niedriger CDC-Aktivität zu erhöhter ADCC- sowie ADCP-Induktion. Diese Protein-optimierte Variante wurde ebenfalls in Lec13 Zellen exprimiert und so eine weitere doppelt optimierte Variante (CD19-DE-Lec13) generiert (Abbildung 9B).



**Abbildung 9: Strukturmodelle von zwei der eingesetzten Antikörpervarianten.** Die schwere Kette (HC) ist jeweils in Dunkelgrau, die leichte Kette (LC) in Hellgrau markiert. Die in der konstanten Region 2 der schweren Kette (C<sub>H</sub>) an Asparagin297 gebundene Oligosaccharidkette ist blau dargestellt. **(A)** Die Positionen der einzelnen Aminosäuresubstitutionen S267E/H268F/S324T/G236A/I332E (EFTAE-Modifikation) im Bereich der C<sub>H</sub>2-Region zur Steigerung der CDC-Aktivität sind gelb dargestellt. In Rot ist zudem die kritische Fucose markiert. Diese spielt eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit FcγIII-Rezeptoren. **(B)** Das Protein-Engineering ist in Form der zweifachen Aminosäuresubstitution S239D/I332E (DE-Modifikation, gelb) im Bereich der C<sub>H</sub>2-Region dargestellt. Das Fehlen der kritischen Fucose der Oligosaccharidkette (blau) illustriert das Glyko-Engineering. Das IgG-Strukturmodell basiert auf einer pdb-Datei, die freundlicherweise von Dr. Mike Clark bereitgestellt wurde (Clark 1997), und mittels Discovery Studio Visualizer (Biovia, San Diego, CA, USA) bearbeitet wurde.

So entstanden insgesamt sechs verschiedene CD19-Antikörpervarianten, die im Weiteren wie folgt bezeichnet werden: CD19-wt-CHO (unveränderte IgG1 Fc-Domäne), CD19-wt-Lec13 (glyko-optimierte Fc-Domäne für gesteigerte ADCC), CD19-EFTAE-CHO (Protein-optimierte Fc-Domäne für gesteigerte CDC), CD19-EFTAE-Lec13 (doppelt optimierte Fc-Domäne für gesteigerte CDC und ADCC), CD19-DE-CHO (Protein-optimierte Fc-Domäne für gesteigerte ADCC und ADCP) und CD19-DE-Lec13 (doppelt optimierte Fc-Domäne für gesteigerte ADCC und ADCP) (Abbildung 10).

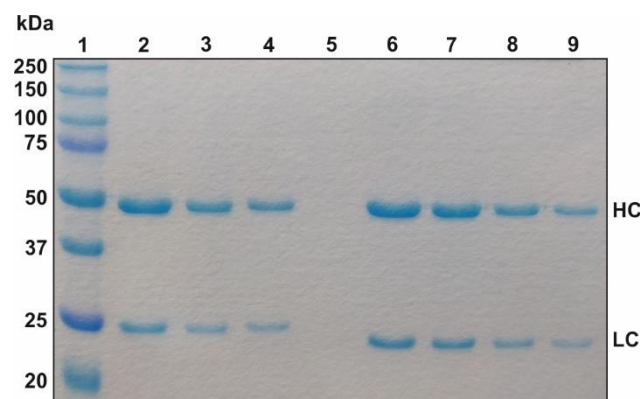
Fc-Domäne	Expressions-Zelllinie	Fucosylierung	Antikörper	erwartete Effektormechanismen	
				ADCC	CDC
nativer IgG1	⇒ CHO-K1 ⇒	+	CD19-wt-CHO	-/+	-
	⇒ Lec13 ⇒	-	CD19-wt-Lec13	++	-
EFTAE-Variante	⇒ CHO-K1 ⇒	+	CD19-EFTAE-CHO	-/+	++
	⇒ Lec13 ⇒	-	CD19-EFTAE-Lec13	++	++
DE-Variante	⇒ CHO-K1 ⇒	+	CD19-DE-CHO	++	-
	⇒ Lec13 ⇒	-	CD19-DE-Lec13	++	-

**Abbildung 10: Übersicht über die Expression der CD19-Antikörpervarianten und ihre erwarteten Effektormechanismen.** Es wurden CD19-Antikörperkonstrukte mit einem nativen Fc-Teil (nativer IgG1) oder mit zwei verschiedenen Aminosäuresubstitutionen eingesetzt. Dabei handelte es sich um die EFTAE-Substitution (EFAE-Variante) und die DE-Substitution (DE-Variante). Die verschiedenen Konstrukte wurden in CHO-K1 und Lec13 Zellen exprimiert und so jeweils fucosylierte Antikörper (CD19-wt-CHO, CD19-EFTAE-CHO, CD19-DE-CHO) und die entsprechenden afucosylierte Varianten (CD19-wt-Lec13, CD19-EFTAE-Lec13, CD19-DE-Lec13) generiert. Zudem sind die erwarteten Effektorfunktionen, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und komplementabhängige Zytotoxizität (CDC), der verschiedenen Antikörpervarianten angegeben. +, Fucose bzw. vermittelte Zytotoxizität; -, keine Fucose bzw. keine vermittelte Zytotoxizität.

Als Kontrollen wurden neben dem erworbenen Rituximab und Trastuzumab (Roche, Basel Schweiz), entsprechende Protein- und glyko-optimierte Konstrukte gegen HER2 eingesetzt. Im Einzelnen: HER2-wt-CHO, HER2-wt-Lec13, HER2-EFTAE-CHO, HER2-EFTAE-Lec13, HER2-DE-CHO, HER2-DE-Lec13. Zudem wurde bei einzelnen Versuchen eine Fc-optimierte Rituximab-Variante mit der Aminosäuresubstitution EFTAE (RTX-EFTAE) mit einbezogen.

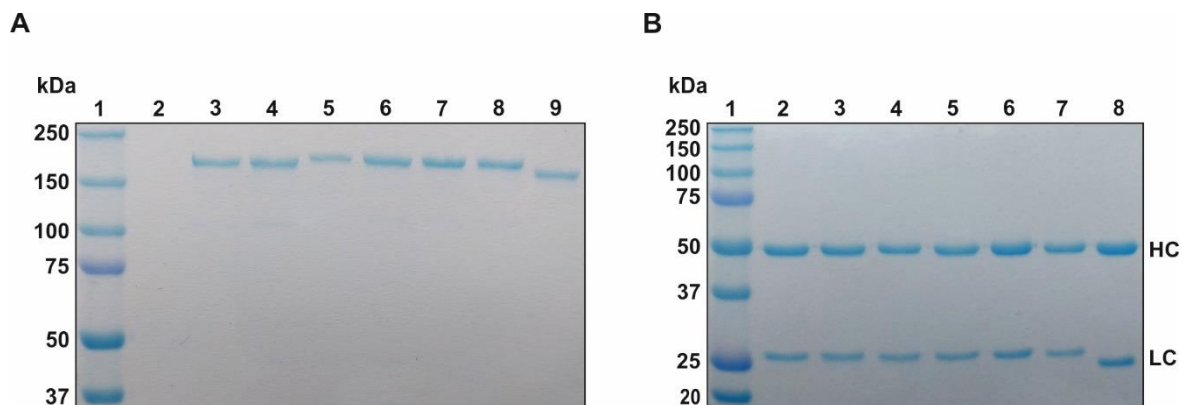
### 3.3 Produktion und Reinigung der Antikörperkonstrukte

Die Produktion aller Fc-optimierten und nicht erworbenen Antikörper erfolgte in stabil transfizierten CHO-K1 und Lec13 Zellen (M. Peipp, nicht publiziert). Nach Expression der Proteine wurden diese affinitätschromatographisch aus dem Zellkulturüberstand gereinigt, gegen PBS dialysiert und anschließend eingengt. Für eine erste Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine wurde ein Vergleich mit Standardkurven von Rituximab durchgeführt. Dazu wurden reduzierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und eine anschließende *Roti®-Blue* Färbung angewandt. Exemplarisch ist die Konzentrationsabschätzung für CD19-DE-CHO in Abbildung 11 dargestellt. Mit den anderen Antikörpervarianten wurden entsprechende Resultate erzielt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich erfolgte eine Konzentrationsermittlung mittels quantitativer Kapillarelektrophorese mit dem *Experion™ Pro260* Chip.



**Abbildung 11: Konzentrationsbestimmung von gereinigtem CD19-DE-CHO in Coomassie-Blau gefärbtem SDS-PAGE Gel.** Nach der Expression in stabil transfizierten Zelllinien und Proteinreinigung erfolgte die Bestimmung der Konzentration des gereinigten Antikörpers durch den Vergleich mit definierten Mengen von Rituximab unter reduzierten Bedingungen. In diesem Fall wurde die Konzentration auf ca. 2 mg/ml geschätzt. Belegung der Spuren: (1) *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*, (2) CD19-DE-CHO (Auftragsvolumen: 2 µl), (3) CD19-DE-CHO (1 µl), (4) CD19-DE-CHO (0,5 µl), (5) unbeladen, (6) Rituximab (Auftragsmenge: 4 µg), (7) Rituximab (3 µg), (8) Rituximab (2 µg), (9) Rituximab (1 µg). Die schweren Antikörperketten (HC) zeigten im Gel eine Mobilität entsprechend einer Größe von 50 kDa, die leichten Ketten (LC) von etwa 25 kDa. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Reinheit und Integrität der verschiedenen Antikörperkonstrukte wurde in reduzierter und nicht-reduzierter SDS-PAGE und anschließender *Roti®-Blue* Färbung überprüft. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigten die Antikörpervarianten wie erwartet eine Mobilität im Gel entsprechend einer Masse von ca. 160 kDa (Abbildung 12A), die einem typischen IgG1 Antikörper entspricht. Unter reduzierenden Bedingungen, unter welchen die Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins „aufgebrochen“ werden, wurden zwei Polypeptidketten detektiert, die eine Masse von ca. 50 kDa und 25 kDa aufwiesen (Abbildung 12B). Diese entsprachen den vorhergesagten, aus der Aminosäuresequenz berechneten Massen der schweren und leichten Antikörperketten. Entsprechende Resultate wurden mit den anderen verwendeten Antikörpervarianten erzielt (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen legten nahe, dass sich die schwere und leichte Ig-Kette der exprimierten CD19-Antikörper zu einem vollständigen IgG-Molekül zusammengelagert haben und über Disulfidbrücken verknüpft wurden. In den SDS-Page Gelen waren keinerlei detektierbaren Kontaminationen nachweisbar und die verschiedenen CD19-Antikörperkonstrukte lagen somit mit einer sehr hohen Reinheit vor.



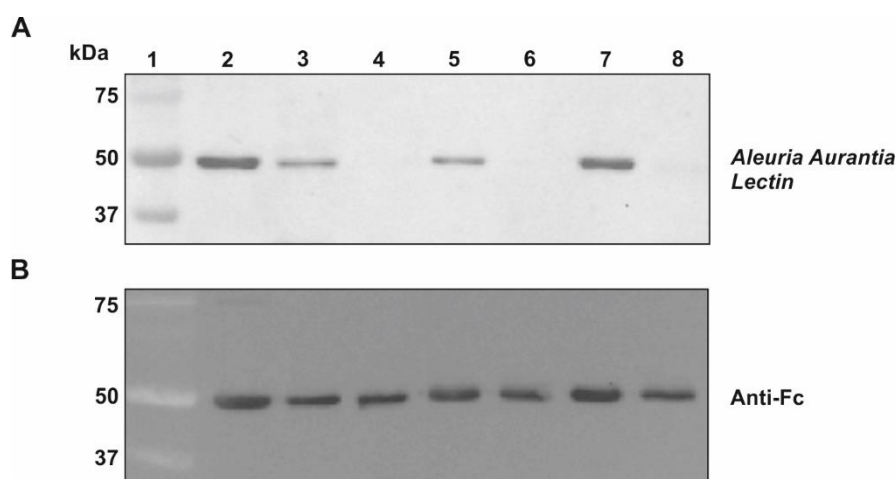
**Abbildung 12: Nachweis der verschiedenen Antikörpervarianten in reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung.** Zum Vergleich befand sich in der letzten Spur jeweils der therapeutisch eingesetzte Antikörper Rituximab. Von den entsprechenden Proteinen wurden je 10 µl mit einer Konzentration von 1500 µg/ml aufgetragen. **(A)** Unter nicht-reduzierenden Bedingungen stellten sich die verschiedenen Antikörpervarianten als jeweils eine intakte Polypeptidkette mit vergleichbaren Massen von ca. 160 kDa dar. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar (n = 3). Spurenbelegung: (1) *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*, (2) unbeladen, (3) CD19-wt-CHO, (4) CD19-wt-Lec13, (5) CD19-EFTAE-CHO, (6) CD19-EFTAE-Lec13, (7) CD19-DE-CHO, (8) CD19-DE-Lec13, (9) Rituximab. **(B)** Im reduzierten SDS-Gel wurden jeweils die Polypeptidketten der schweren (HC) und leichten Ketten (LC) der verschiedenen Antikörperkonstrukte sichtbar. Auch hier zeigten sich zwischen den einzelnen Varianten ebenfalls einheitliche molekulare Massen. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar (n = 3). Belegung der Spuren: (1) *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*, (2) CD19-wt-CHO, (3) CD19-wt-Lec13, (4) CD19-EFTAE-CHO, (5) CD19-EFTAE-Lec13, (6) CD19-DE-CHO, (7) CD19-DE-Lec13, (8) Rituximab.



### 3.4 Analyse des Fucosylierungsstatus der Fc-Domänen

Die einzelnen Antikörpervarianten wurden wie weiter oben beschrieben in zwei verschiedenen Zelllinien exprimiert. Dabei sollten durch die Expression in CHO Zellen fucosylierte Antikörper und durch die Expression in Lec13 Zellen afucosylierte, glyko-optimierte Antikörpervarianten hergestellt werden. Zum Nachweis, dass dadurch bei den einzelnen Antikörperkonstrukten Unterschiede im Gehalt an  $\alpha$ 1,6-Fucose als Teil der N297 gebundenen Oligosaccharidkette bestanden, wurde ein Lektin-Blot mit biotinyliertem *Aleuria Aurantia Lectin* (Vector Laboratories) durchgeführt. Bei Lektinen handelt es sich um Proteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden (Etzler 1985). In diesem Fall bindet das eingesetzte Lektin laut Herstellerangaben an Fucosereste, die über ( $\alpha$ -1,6) an *N*-Acetylglucosamine oder über ( $\alpha$ -1,3) an *N*-Acetyllactosamine verwandte Strukturen verknüpft sind.

In dem durchgeführten Lektin-Blot zeigte sich, dass die drei Antikörpervarianten, die in CHO-K1 Zellen exprimiert wurden (CD19-wt-CHO, CD19-EFTAE-CHO, CD19-DE-CHO), übereinstimmend mit der Literatur und dem Vergleich mit Rituximab fucosyliert waren (Abbildung 13) (Repp et al. 2011). Zudem wurde deutlich, dass Veränderungen einzelner Aminosäuren am Fc-Teil der Antikörper keinen signifikanten Einfluss auf die Fucosylierung in CHO-Zellen zu nehmen scheinen, da an sämtlichen Varianten unabhängig von den eingeführten Aminosäuresubstitutionen in der Fc-Domäne Fucose detektiert wurde. Gleichzeitig bestätigte sich bei den Konstrukten aus Lec13 Zellen (CD19-wt-Lec13, CD19-EFTAE-Lec13, CD19-DE-Lec13), dass diese keine signifikanten Mengen an Fucose im Bereich der schweren Kette aufwiesen.



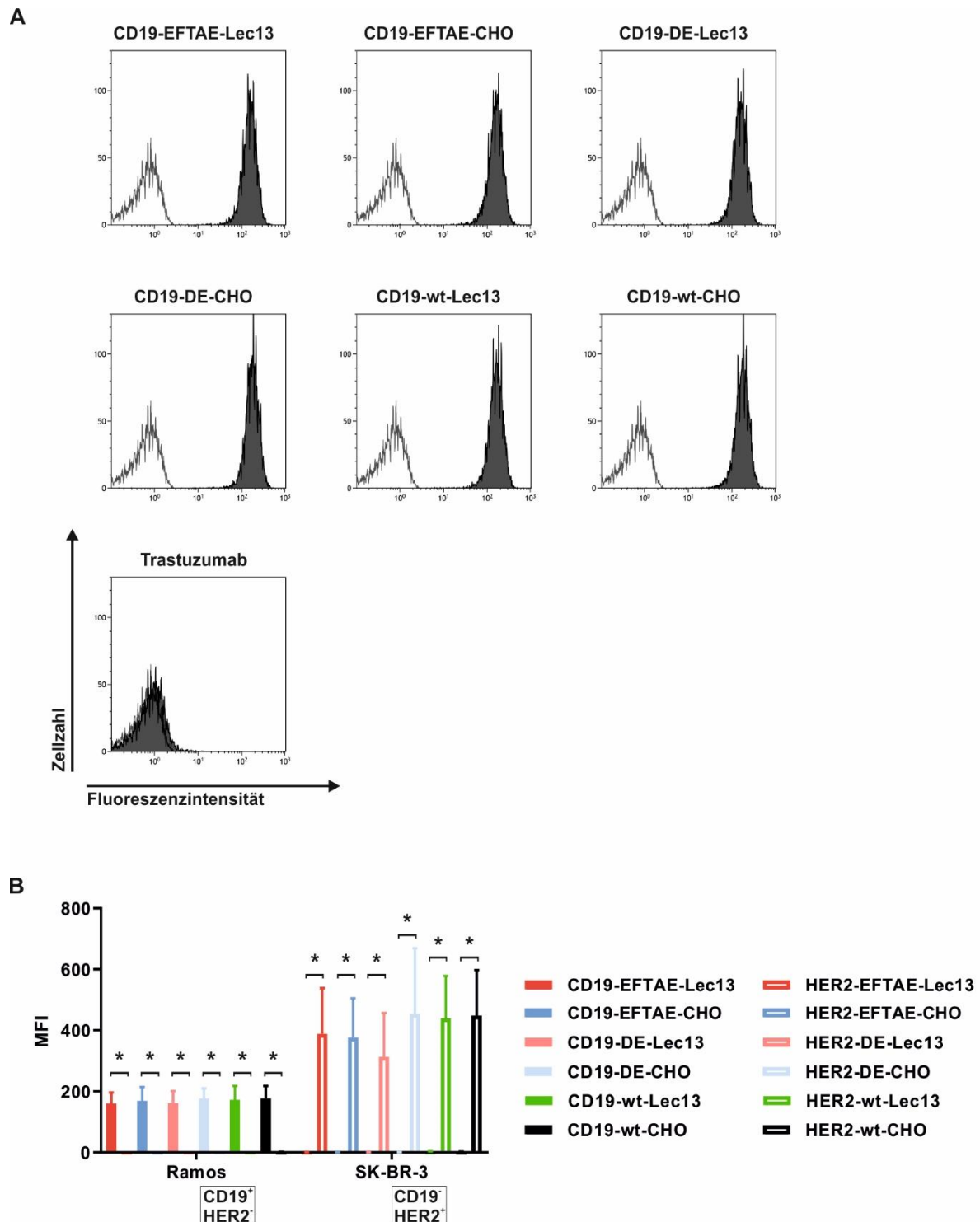
**Abbildung 13: Überprüfung des Fucose-Gehalts der Fc-Teile der verschiedenen CD19-Antikörpervarianten auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membranen. (A)** Der Nachweis der Fucose im Fc-gebundenen Oligosaccharid erfolgte in einem Lektin-Blot mit biotinyliertem *Aleuria Aurantia Lectin* und HRP-gekoppeltem *NeutrAvidin*. Bei den Antikörpern exprimiert in Lec13 Zellen (Spur 4, 6, 8) zeigte sich im Gegensatz zu Konstrukten produziert in CHO-K1 Zellen (Spur 3, 5, 7) ein Fehlen der Fucose in der Zuckerstruktur der Fc-Domäne. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar ( $n = 3$ ). **(B)** Zur Kontrolle erfolgte der Nachweis der schweren Kette mit einem HRP-konjugierten anti-human IgG Antikörper. In Spur 2 wurde zum Vergleich Rituximab als fucosylierter IgG1 Antikörper aufgetragen. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar ( $n = 3$ ). Spurenbelegung in (A) und (B): (1) *Precision Plus Protein™ Standard Dual Color*, (2) Rituximab, (3) CD19-wt-CHO, (4) CD19-wt-Lec13, (5) CD19-EFTAE-CHO, (6) CD19-EFTAE-Lec13, (7) CD19-DE-CHO, (8) CD19-DE-Lec13.

Zum Vergleich und als Ladungskontrolle erfolgte in einem Western Blot Experiment mit einem Fc-spezifischen Sekundärantikörper der selektive Nachweis der schweren Kette der Antikörper (Abbildung 13B).

### **3.5 Analyse der Bindungseigenschaften von Fc-optimierten CD19-Antikörpern**

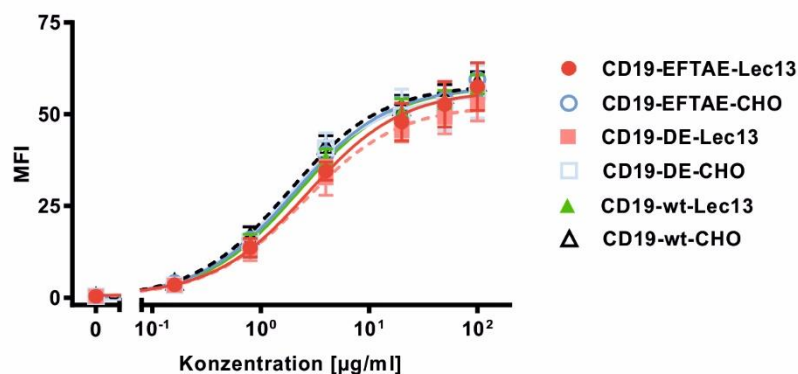
#### **3.5.1 CD19-Bindung**

Die selektive Bindung an das entsprechende Zielantigen stellt die Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper dar. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Reinigung der Proteine die spezifische Bindung der verschiedenen Antikörpervarianten an das Zielantigen CD19 überprüft. Der Nachweis der Bindungseigenschaften erfolgte mittels Durchflusszytometrie und unter Verwendung von CD19-positiven Ramos Zellen und mit CD19-transfizierten CHO Zellen. Als Kontrolle sowie zum Nachweis der Bindungsselektivität diente die CD19-negative, HER2-positive Zelllinie SK-BR-3. Zudem wurden die entsprechend modifizierten Antikörper gegen HER2 eingesetzt, die in nachfolgenden funktionellen Versuchen als Kontrollantikörper dienen sollten. Alle CD19-Konstrukte haben unabhängig von den Veränderungen am Fc-Teil sowie der Expression in verschiedenen Zelllinien spezifisch an CD19-positive Ramos Zellen gebunden (Abbildung 14A). Gleichzeitig war keine Bindung an CD19-negativen SK-BR-3 Zellen nachweisbar (Abbildung 14B). Die entsprechenden Antikörper gegen HER2 wiesen eine Bindung an HER2-positiven SK-BR-3 Zellen auf, gleichzeitig war keine Bindung an HER2-negative Ramos Zellen messbar (Abbildung 14B). Somit konnte für die verschiedenen Antikörpervarianten gegen CD19, als auch gegen HER2, eine Antigen-spezifische Bindung nachgewiesen werden.



**Abbildung 14: Analyse der spezifischen Antigenbindung mittels Durchflusszytometrie. (A)** CD19-positive Ramos Zellen wurden entweder nur in PBA-Puffer (weißer Peak) oder mit dem angegebenen Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml (dunkelgrauer Peak) inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte mit einem sekundären, PE-konjugierten anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragment und Durchflusszytometrie. Trastuzumab diente als Kontrollantikörper. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment dar (n=3). **(B)** Alle CD19-Antikörperkonstrukte (Konzentration 50 µg/ml) zeigten eine spezifische Bindung an CD19-positiven Ramos Zellen. Mit der CD19-negativen Zelllinie SK-BR-3 wurde keine Bindung detektiert. Als IgG1 Kontrollantikörper dienen die entsprechend modifizierte Antikörper gegen HER2 (Konzentration 50 µg/ml). Diese zeigten eine spezifische Bindung an HER2-positiv SK-BR-3 Zellen. An HER2-negativen Ramos Zellen wurde keine Bindung gemessen. Der Nachweis der Antigenbindung erfolgte mit PE-konjugierten anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Antikörper und Durchflusszytometrie. Statistisch signifikante Bindungsunterschiede mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zwischen den CD19-Antikörpervarianten und entsprechenden HER2-spezifischen Kontrollantikörpern sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten sind als Mittelwert +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

In weiteren Durchflusszytometrie-Versuchen wurde zudem die Dosis-abhängige Bindung der verschiedenen Antikörperkonstrukte an stabil mit CD19 cDNA transfizierten CHO-K1 CD19 Zellen untersucht (M. Peipp, nicht publiziert). Für diese Versuche wurden transfizierte CHO-K1 Zellen eingesetzt, da diese keine humanen Fcγ-Rezeptoren aufweisen. So konnte sichergestellt werden, dass ein Bindungssignal auf eine Bindung an CD19 beruht und keine andere Bindung der Antikörper wie beispielsweise an Fcγ-Rezeptoren vorlag. Der Vergleich der Bindungsdosiskurven der einzelnen Antikörper zeigte, dass sich die halbmaximalen Bindungen, EC<sub>50</sub>, für alle sechs Konstrukte bei Konzentrationen von 1,7 µg/ml (~11,3 nM) bis 2,5 µg/ml (~16,7 nM) befanden (Tabelle 14). Somit wiesen alle Konstrukte unabhängig von den durchgeführten Modifikationen am Fc-Teil eine vergleichbar hohe Affinität für das Zielantigen auf. Dies wurde auch durch den kongruenten Verlauf der Dosiskurven sowie fehlende statistisch signifikante Unterschiede bei der Auswertung zwischen den verschiedenen Varianten deutlich (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Analyse der Dosis-abhängigen CD19-Bindung.** CHO-K1 CD19 Zellen wurden mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen der verschiedenen Konstrukte inkubiert. Der Nachweis der Bindung an CD19 erfolgte mit dem PE-konjugiertem anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Antikörper und Durchflusszytometrie. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus vier unabhängigen Experimenten. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

**Tabelle 14: Übersicht über die EC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen CD19-Antikörper für die Bindung an CD19**

Antikörper	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)
CD19-EFTAE-Lec13	2,7	1,4 – 5,3
CD19-EFTAE-CHO	2,1	1,2 – 3,6
CD19-DE-Lec13	2,5	1,4 – 4,5
CD19-DE-CHO	1,7	0,8 – 3,8
CD19-wt-Lec13	2,2	1,5 – 3,2
CD19-wt-CHO	1,8	1,2 – 2,7

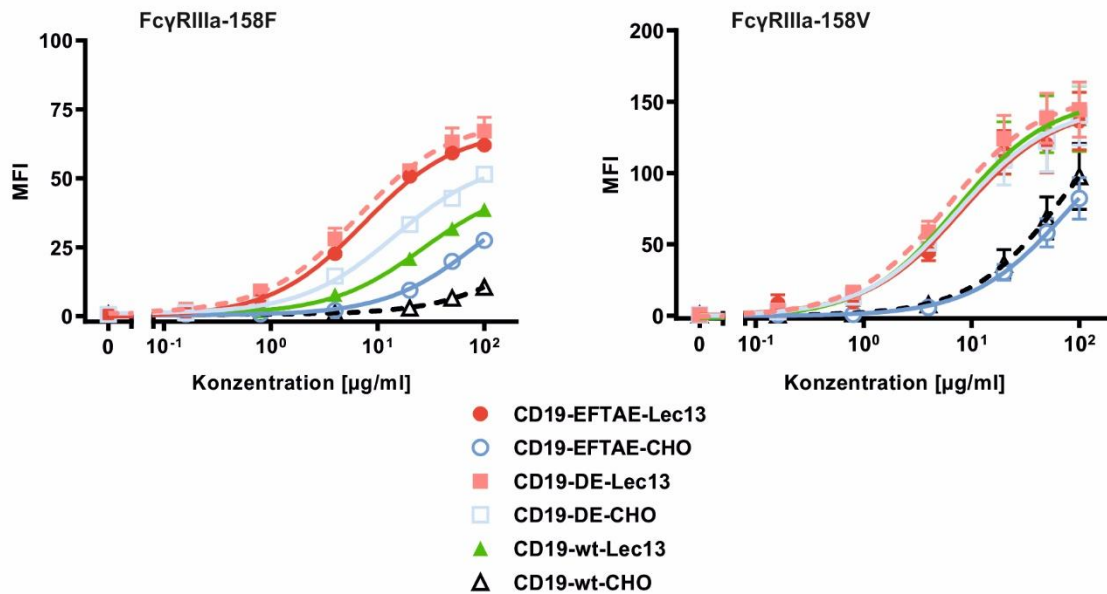
\* EC<sub>50</sub>, halbmaximale effektive Konzentration;

\*\* CI, Konfidenzintervall (engl. *confidence interval*).

### 3.5.2 FcγRIIIa-Bindung

Die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) stellt einen bedeutenden Wirkungsmechanismus vieler therapeutischer Antikörper dar. Für diese Wirkungsweise ist eine effiziente Bindung der Antikörper über ihren Fc-Teil an aktivierende Fcγ-Rezeptoren auf Effektorzellen essentiell. Für den aktivierenden FcγRIIIa, der sich unter anderem auf NK-Zellen befindet, wurde dabei in der Literatur beschrieben, dass der V/F-Polymorphismus der Aminosäure in Position 158 die Affinität zur Fc-Domänen beeinflusst und sich auch auf die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper auswirkt (Cartron et al. 2002; Weng und Levy 2003). Aus diesem Grund sollte die Affinität der Fc-Teile der verschiedenen optimierten CD19-Antikörper für die beiden Allel-Formen von FcγRIIIa untersucht werden. Dazu wurde die dosisabhängige Bindung an BHK-21 Zellen, die stabil mit Expressionskonstrukten für die FcεRI γ Kette und FcγRIIIa-158V oder FcγRIIIa-158F transfiziert waren (Glorius et al. 2013), mittels Durchflusszytometrie gemessen. Hier zeigte sich, dass die vier Fc-optimierten Antikörpervarianten mit fehlender Fucose oder der DE-Modifikation (CD19-wt-Lec13, CD19-EFTAE-Lec13, CD19-DE-CHO und CD19-DE-Lec13) im Vergleich zu CD19-wt-CHO und CD19-EFTAE-CHO eine gesteigerte Affinität zu beiden FcγRIIIa Allelen aufwiesen (Abbildung 16). Auffällig war hierbei, dass die Bindung an den hochaffinen FcγRIIIa-158V durch die verschiedenen Formen des Fc-Engineerings ähnlich stark gesteigert wurde. Die halbmaximale Bindung befand sich bei diesen vier Konstrukten zwischen Konzentrationen von 6,1 µg/ml (~40,7 nM) bis 8,1 µg/ml (~ 54 nM) (Tabelle 15). Gleichzeitig wurden für die Bindung an FcγRIIIa-158F unterschiedlich stark erhöhte Affinitäten festgestellt. Hierbei wiesen die beiden doppelt optimierten Varianten, CD19-EFTAE-Lec13 und CD19-DE-Lec13, mit einer EC<sub>50</sub> von 7,5 µg/ml (~50 nM) und 6,5 µg/ml (~43,3 nM) die höchste Affinität zu FcγRIIIa-158F auf. Die rein glyko-optimierte Variante, CD19-wt-Lec13, zeigte zu FcγRIIIa-158F im Vergleich mit CD19-wt-CHO eine gesteigerte Bindung. Diese war allerdings geringer als die der doppelt optimierten Varianten. Bei der Bindung an FcγRIIIa-158F wurde für die rein Protein-optimierte Variante CD19-EFTAE-CHO im Vergleich mit CD19-wt-CHO ebenfalls eine gering gesteigerte Bindung gemessen.

So stellte sich heraus, dass das Modifizieren der Fc-Teile vor allem bei der niederaffinen Allelvariante FcγRIIIa-158F zu einer deutlichen Steigerung der Affinität führte. Die Affinität des nativen CD19-Antikörpers, CD19-wt-CHO, zu dieser Allelform des Fcγ-Rezeptors war sehr gering und eine Bindung wurde erst ab sehr hohen Konzentrationen messbar. Zudem konnte anhand des Kurvenverlaufs aufgrund Aviditäts-bedingter niedriger Messwerte für diesen Antikörper keine halbmaximale effektive Konzentration bestimmt werden.



**Abbildung 16: Dosisabhängige Bindung der CD19-Antikörperkonstrukte an FcγRIIIa-158F und -158V.** BHK-21 Zellen transfiziert mit dem Expressionsvektor für die FcεRI γ Kette und dem human FcγRIIIa-158V (CD16a-158V) oder FcγRIIIa-158F (CD16a-158F) wurden mit steigenden Antikörperkonzentrationen inkubiert. Der Bindungsnachweis an FcγRIIIa erfolgte mit FITC-konjugiertem anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> Antikörper und Durchflusszytometrie. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus fünf unabhängigen Messungen. MFI, mittlere Fluoreszenzintensität.

**Tabelle 15: Übersicht über die FcγRIIIa-Bindung**

Antikörper	FcγRIIIa-158F		FcγRIIIa-158V	
	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)
CD19-EFTAE-Lec13	7,5	4,0 - 14,1	8,1	3,3 - 19,9
CD19-EFTAE-CHO	86,2	42,2 - 176,3	75	23,4 - 240,8
CD19-DE-Lec13	6,5	4,2 - 10,1	6,1	2,9 - 12,8
CD19-DE-CHO	14,5	9,1 - 23,1	7,5	3,1 - 18,6
CD19-wt-Lec13	26,7	13,3 - 53,8	7,3	3,0 - 17,8
CD19-wt-CHO	n.a.***	n.a.***	75,2	14,6 - 387,8

\* EC<sub>50</sub>, halbmaximale effektive Konzentration; \*\* CI, Konfidenzintervall (engl. *confidence interval*);

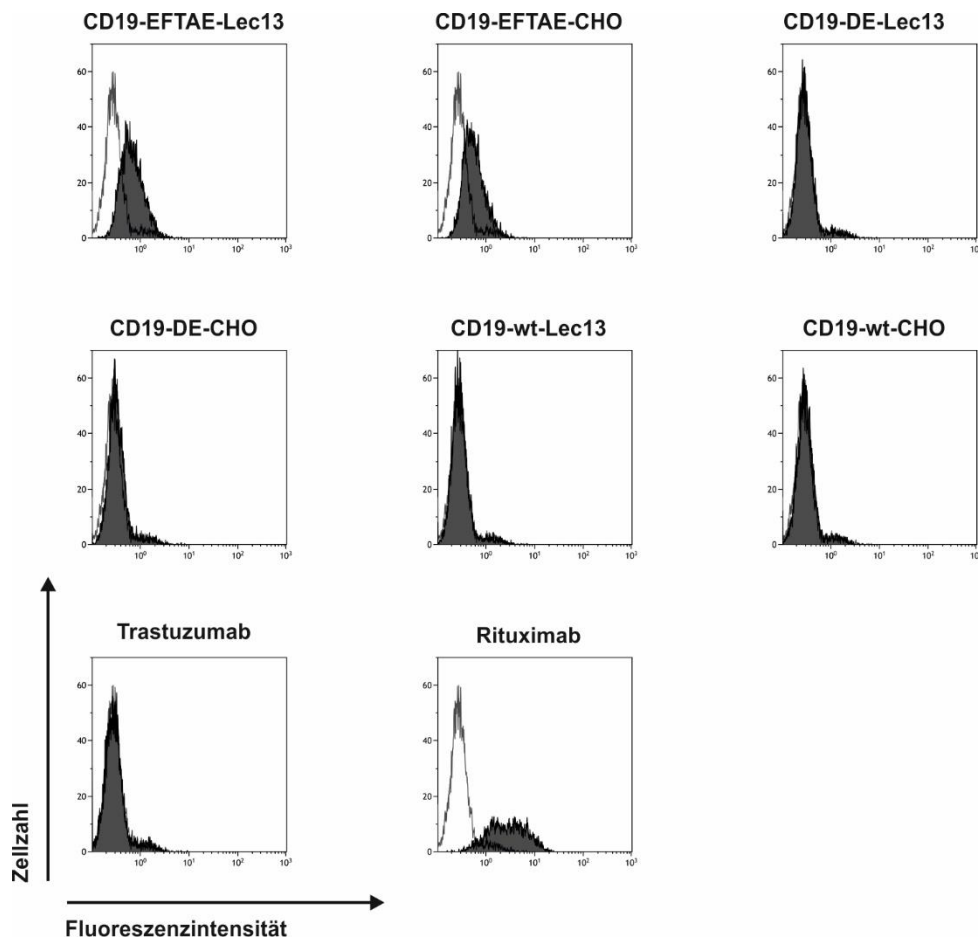
\*\*\* n.a., nicht auswertbar.

Insgesamt wurde deutlich, dass sowohl durch Glyko- als auch durch Protein-Engineering in Form der DE-Aminosäuresubstitution die Affinität zu FcγRIIIa gesteigert werden konnte. Bei FcγRIIIa-158V scheinen die beiden Technologien gleich effektiv zu wirken, bei FcγRIIIa-158F finden sich allerdings starke Unterschiede. Hier wiesen die afucosylierten Varianten eine höhere Affinität als die entsprechenden fucosylierten Varianten auf, unabhängig davon, ob zusätzliche Aminosäuresubstitutionen eingeführt worden waren. Dies zeigt, dass zumindest hinsichtlich der Bindung an FcγRIIIa-158F Protein- und Glyko-Engineering-Technologien miteinander kombiniert werden können, und dass dadurch Antikörper mit noch besserer Bindung an diesen Fcγ-Rezeptor hergestellt werden können.

### 3.5.3 C1q-Bindung

Neben der ADCC stellt die CDC eine weitere wichtige Wirkungsweise therapeutischer Antikörper dar (Scott et al. 2012). Für die Initiation der Komplementkaskade nach dem klassischen Aktivierungsweg spielt die Bindung des Komplementfaktors C1q an den Fc-Teil tumorzellgebundener Antikörper eine entscheidende Rolle (Meyer et al. 2014). Aus diesem Grund wurde vor der Analyse der CDC-Aktivität untersucht, ob die EFTAE-Modifikation auch im Hintergrund von CD19-Antikörpern zu einer gesteigerten Bindungsfähigkeit von C1q auf CD19-positiven Zellen führt. Dazu wurden für Messungen mittels Durchflusszytometrie CD19-positiv Raji Zellen mit den verschiedenen CD19-Antikörpervarianten inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde humanes Serum als Quelle für den Faktor C1q hinzugefügt. Dabei wurde durch Zugabe von Eculizumab der Komplementfaktor C5 neutralisiert und so CDC geblockt, um ein Absterben der Zielzellen im Versuchsverlauf zu verhindern. Es wurde deutlich, dass die Einführung der EFTAE-Substitution in den Fc-Teil der CD19-Antikörper zu einer erhöhten Bindung des Komplementfaktors C1q auf den Tumorzellen führte (Abbildung 17). Dies ist wahrscheinlich auf eine gesteigerte Affinität zu diesem Faktor auf Grund der Aminosäuresubstitutionen zurückzuführen. Beide für CDC optimierte Varianten, der Protein-optimierte CD19-EFTAE-CHO als auch der doppelt optimierte, afucosylierte CD19-EFTAE-Lec13 Antikörper, banden C1q in gleichem Maße. Beide Fc-optimierten CD19-Antikörper erreichten aber nicht die Effizienz von Rituximab, der, wie in Vorversuchen gezeigt worden war, C1q unter diesen Versuchsbedingungen auf Lymphomzellen binden konnte (Wirt et al. 2017) und als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Somit scheint die Einführung der EFTAE-Aminosäuresubstitutionen auch in afucosylierten Antikörper effektiv die Bindung an C1q zu verbessern. Bei den restlichen CD19-Antikörpervarianten sowie den Kontrollantikörpern gegen HER2 konnte keine Ablagerung von C1q auf Raji Zellen beobachtet werden.

Für die Zytotoxizitätsexperimente standen somit verschiedene Antikörper-Varianten mit einer verbesserten FcγRIIIa-Affinität und C1q-Bindung zur Verfügung. Für diese Experimente wurde der Focus auf die EFTAE- sowie glyko-optimierten Antikörpervarianten gelegt, da ein Ziel der Arbeit das Kombinieren dieser beiden Strategien innerhalb eines Moleküls darstellte, um so simultan CDC als auch ADCC zu verbessern.



**Abbildung 17: Analyse der Bindung des Komplementfaktors C1q durch CD19-Antikörpervarianten.** CD19-positive Raji Zellen wurden entweder nur in PBA-Puffer (weißer Peak) oder mit dem angegebenen Antikörper (dunkelgrauer Peak) in einer Konzentration von 50 µg/ml inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde als Quelle für den Komplementfaktor C1q humanes Serum (1%), das zum Blocken der CDC-Aktivität Eculizumab enthielt, hinzugefügt. Die Messung erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Kaninchen anti-human C1q Antikörper und Durchflusszytometrie. Als Positivkontrolle diente der CD20-Antikörper Rituximab, der HER2-spezifische Trastuzumab wurde als Isotyp-Kontrolle eingesetzt. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment von drei Durchführungen dar.

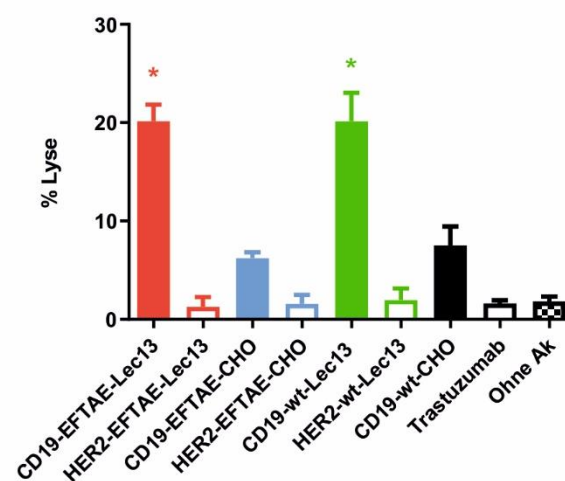
### 3.6 Zytotoxizitätsanalyse der Fc-optimierten CD19-Antikörper

#### 3.6.1 ADCC-Aktivität

In  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurde die ADCC-Aktivität der einzelnen Antikörpervarianten gegenüber verschiedenen Lymphom-Zelllinien untersucht. So sollte überprüft werden, ob die durch Optimierung der Fc-Teile erhöhte Affinität zu Fc $\gamma$ RIIIa auch eine Steigerung der ADCC-Aktivität bewirkte. Dazu wurden frisch isolierte, humane mononukleäre Zellen (engl. *mononuclear cells*, MNC) in einem E:T-Verhältnis von 40:1 als Effektorzellen eingesetzt. Zunächst wurden Experimente mit CD19-positiven Raji Burkitt-Lymphom Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die beiden afucosylierten Antikörpervarianten, CD19-wt-Lec13 und CD19-EFTAE-Lec13, eine deutliche Lyse der Zielzellen induzierten (Abbildung 18). Für den



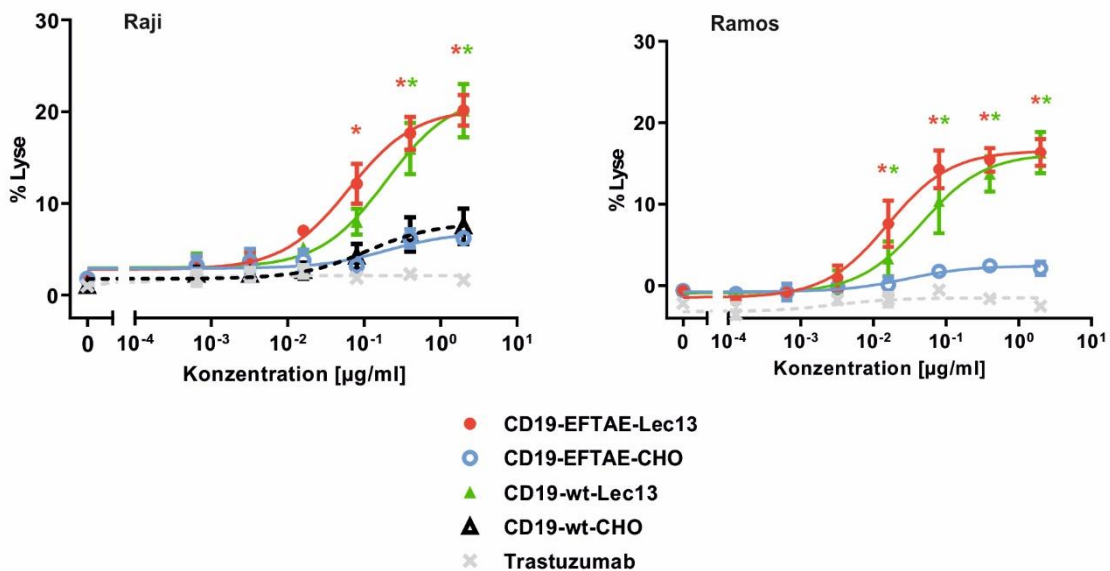
Wildtyp CD19-Antikörper, CD19-wt-CHO, sowie dem Protein-optimierten CD19-EFTAE-CHO wurden sehr geringe Tumorzelllysen gemessen. Die entsprechend optimierten Antikörperkonstrukte gegen HER2 induzierten keine Lyse der Zielzellen, was die Antigen-abhängigkeit der ADCC-Induktion bestätigte. Zudem wurde die Zytotoxizität der CD19-Antikörper durch Effektorzellen vermittelt, da sie abhängig von der Anwesenheit mononukleärer Zellen war und bei deren Fehlen nicht gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die gemessene Zytotoxizität konnte somit auf ADCC zurückgeführt werden und stellte keine direkte Induktion von Zelltod durch eine alleinige Bindung an das Zielantigen CD19 dar.



**Abbildung 18: ADCC der CD19-Antikörpervarianten und entsprechender HER2-spezifischer Kontrollantikörper.** In  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurden Raji Zellen als Zielzellen mit den jeweiligen Antikörpern (Konzentration 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und humanen mononukleären Zellen (E:T-Ratio 40:1) inkubiert. Statistisch signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO und zur Isotyp-Kontrolle sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern. Ak, Antikörper.

In weiteren  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurde die Dosis-abhängige ADCC-Aktivität gegenüber Raji und Ramos Zellen untersucht und so die Potenz der verschiedenen Antikörpervarianten verglichen. Gegen beide Zelllinien induzierten die afucosylierten Varianten, der rein glyko-optimierte CD19-wt-Lec13 und der doppelt optimierte CD19-EFTAE-Lec13, im Vergleich mit den fucosylierten Konstrukten gesteigert ADCC (Abbildung 19). Die gemessene Steigerung der Affinität zu Fc $\gamma$ RIIIa führte somit auch zu einer erhöhten ADCC-Induktion. Für beide Varianten zeigte sich eine Abhängigkeit der Höhe der Zielzelllyse von der eingesetzten Antikörperkonzentration und beide Antikörperkonstrukte erzielten bereits bei subnanomolaren Konzentrationen signifikante Lyseraten. Die doppelt optimierte Antikörpervariante, CD19-EFTAE-Lec13, wies gegenüber CD19-wt-Lec13 eine gering gesteigerte Effizienz in der ADCC-Induktion auf, die aber nicht statistisch signifikant war. Für CD19-EFTAE-Lec13 lag die Dosis der halbmaximalen Lyse bei Konzentrationen von 0,06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 0,4$  nM) bei Raji Zellen und bei 0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 0,1$  nM) bei Ramos Zellen (Tabelle 16). Die

alleinige EFTAE-Substitution war nicht in der Lage eine signifikante Steigerung der ADCC-Induktion zu erzielen. Zudem bestätigte sich, dass der Wildtyp CD19-Antikörper, CD19-wt-CHO kaum in der Lage war, eine Lyse der Tumorzellen zu erzielen.



**Abbildung 19: Dosisabhängige ADCC-Induktion gegenüber Raji und Ramos Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen.** Raji und Ramos Zellen wurden mit zunehmenden Antikörperkonzentrationen und mononukleären Zellen als Effektorzellen (E:T-Ratio 40:1) inkubiert. Für eine bessere Übersicht wurde nur Trastuzumab als Isotyp-Kontrolle in der Abbildung mitaufgeführt. Alle anderen entsprechenden Kontrollen gegen HER2 lagen bei ähnlichen Lyseraten. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO (bei Raji) bzw. Trastuzumab (bei Ramos) sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten stellen Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern dar.

**Tabelle 16: Übersicht über die ADCC-Aktivität**

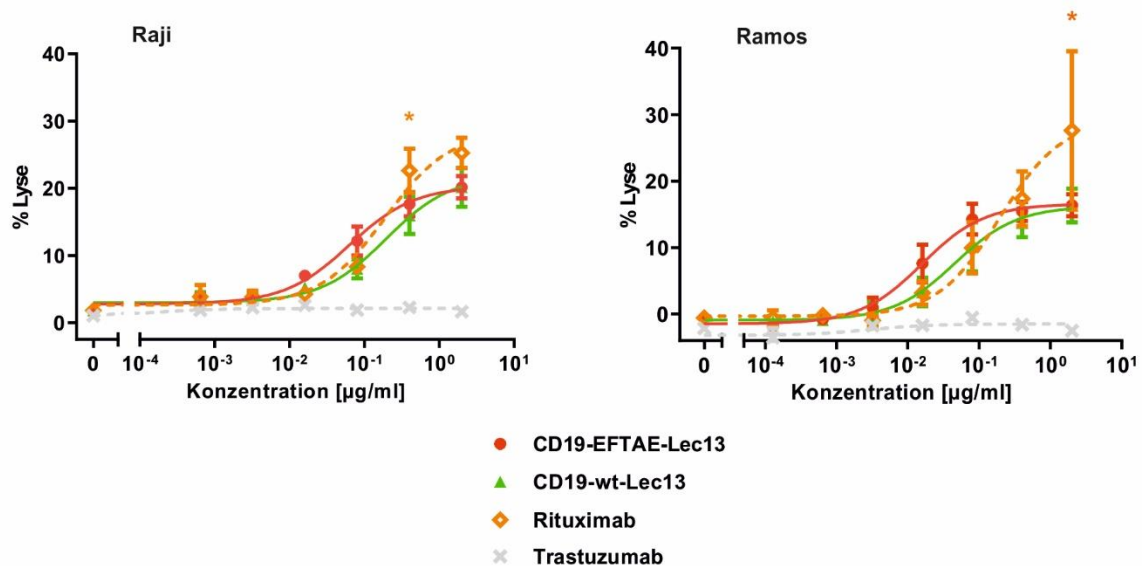
Antikörper	Raji			Ramos		
	Max. Lyseraten (%)	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)	Max. Lyseraten (%)	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)
CD19-EFTAE-Lec13	20,33	0,06	0,03 - 0,13	16,58	0,02	0,01 - 0,03
CD19-EFTAE-CHO	6,84	0,2	0,01 - 2,96	2,43	0,03	0,01 - 0,17
CD19-wt-Lec13	21,9	0,19	0,08 - 0,49	16,22	0,05	0,02 - 0,12
CD19-wt-CHO	7,85	0,11	0,02 - 0,76	n.b.***	n.b.***	n.b.***

\* EC<sub>50</sub>, halbmaximale effektive Konzentration; \*\* CI, Konfidenzintervall (engl. confidence interval);

\*\*\* n.b., nicht bestimmt.

Des Weiteren sollte die Effizienz der afucosylierten Antikörpervarianten, CD19-wt-Lec13 und CD19-EFTAE-Lec13, ADCC zu induzieren mit dem therapeutisch eingesetzten CD20-Antikörper Rituximab verglichen werden. Dazu wurde die Antikörperkonzentrationsabhängige Lyse von CD19- und CD20-positiven Burkitt Lymphom-Zelllinien, Ramos und Raji Zellen,

ermittelt. Für alle drei Antikörper konnte gegen beide Zielzelllinien eine ADCC-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 20). Die Antikörper wiesen allerdings Unterschiede in der Effizienz auf. Die CD19-Antikörperkonstrukte, insbesondere der doppelt optimierte CD19-EFTAE-Lec13, waren bei geringeren Konzentrationen zwischen 0,016–0,08 µg/ml wirksamer als der CD20-Antikörper. Die berechnete EC<sub>50</sub> für CD19-EFTAE-Lec13 lag bei Ramos Zellen mit einer Konzentration von 0,02 µg/ml (~0,1 nM) bei einem Neuntel der berechneten EC<sub>50</sub> für Rituximab mit ca. 0,19 µg/ml (~1,3 nM). Bei steigenden Antikörperkonzentrationen zeigte Rituximab ein statistisch signifikant höheres lytisches Potential als die beiden optimierten CD19-Antikörper, so dass in sättigender Konzentration der CD20-Antikörper den CD19-Antikörpern überlegen war. Mit Trastuzumab (Abbildung 20) und den entsprechend Fc-optimierten HER2-spezifischen Kontrollantikörpern (Daten nicht gezeigt) konnte keine Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden. Dieser Befund stellt eine weitere Bestätigung der antigenspezifischen Lyse der Zielzellen dar.



**Abbildung 20: Vergleich der afucosylierten CD19-Antikörpervarianten mit Rituximab in ADCC-Experimenten.** Raji und Ramos Zellen wurden mit zunehmenden Antikörperkonzentrationen und mononukleären Zellen als Effektorzellen (E:T-Ratio 40:1) inkubiert. In der Abbildung wurde für eine bessere Übersicht nur Trastuzumab als Isotyp-Kontrolle mitaufgeführt. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-Antikörpern sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern.

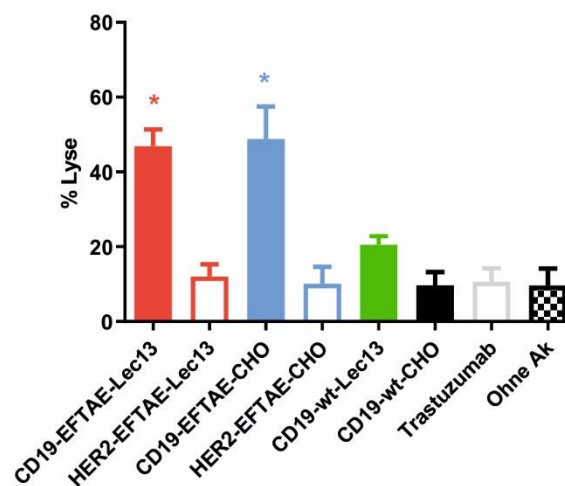
**Tabelle 17: Vergleich der ADCC-Aktivität mit Rituximab.**

Antikörper	Raji			Ramos		
	Max. Lyseraten (%)	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)	Max. Lyseraten (%)	EC <sub>50</sub> * (µg/ml)	95% CI** (µg/ml)
<b>CD19-EFTAE-Lec13</b>	20,33	0,06	0,03 - 0,13	16,58	0,02	0,01 - 0,03
<b>CD19-wt-Lec13</b>	21,9	0,19	0,08 - 0,49	16,22	0,05	0,02 - 0,12
<b>Rituximab</b>	28,58	0,19	0,09 - 0,4	29,2	0,19	0,04 - 0,9

\* EC<sub>50</sub>, halbmaximale effektive Konzentration; \*\* CI, Konfidenzintervall (engl. *confidence interval*).

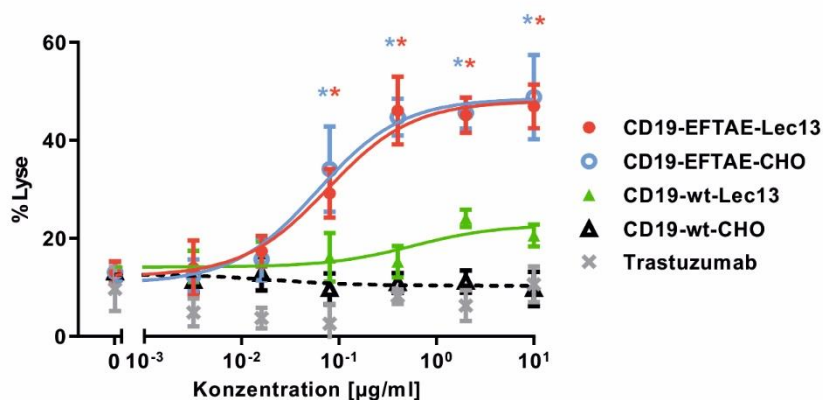
### 3.6.2 CDC-Aktivität

Im weiteren Verlauf wurde in <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen die Fähigkeit der einzelnen CD19-Antikörperkonstrukte, CDC gegenüber verschiedenen Lymphom-Zelllinien zu induzieren, untersucht. Im Rahmen dieser Experimente sollte überprüft werden, ob die ermittelte gesteigerte Bindung des Komplementfaktors C1q durch die EFTAE-Modifikation (Abbildung 17) in einer vermehrten Induktion von CDC resultiert und ob dies gegebenenfalls durch das Fehlen der Fucose beeinflusst wird. Dazu wurden <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuche mit Komplement-sensiblen Ramos Burkitt-Lymphom Zellen und humanem Plasma als Quelle für Komplementfaktoren durchgeführt. In den Versuchen bestätigte sich, dass das Fc-Engineering durch Einführen der EFTAE-Modifikation in einer signifikanten Steigerung der vermittelten CDC-Raten resultierte (Abbildung 21). Zwischen den beiden die EFTAE-Substitution tragenden Antikörpervarianten, CD19-EFTAE-CHO und CD19-EFTAE-Lec13, bestand unabhängig vom Fucose-Gehalt des Fc-Teils kein signifikanter Unterschied in den gemessenen Lyseraten. Zudem bestätigte sich, wie in anderen Studien bereits gezeigt, dass der CD19-wt-CHO Antikörper nicht in der Lage war, CDC gegen die Zielzellen zu vermitteln. Auch der glyko-optimierte Antikörper, CD19-wt-Lec13, zeigte geringe Lyseraten gegen die Zielzellen und es wurde keine statistisch signifikante CDC in den Versuchen beobachtet. Bei entsprechenden Kontrollantikörpern gegen HER2 wurde ebenfalls keine Zytotoxizität beobachtet, was auch in diesen Versuchen verdeutlicht, dass die Fc-optimierten Antikörper Antigenbindung benötigen, um Zielzelllyse zu induzieren. Sämtliche beobachteten Zielzelllysen waren abhängig von der Anwesenheit von humanem Plasma und konnten ohne Zugabe von Plasma nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 21: Analyse der komplementabhängigen Zytotoxizität der CD19-Antikörpervarianten und entsprechender HER2-spezifischer Kontrollantikörper.** In <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen wurden Ramos Zellen als Zielzellen mit den jeweiligen Antikörpern (Konzentration 10 µg/ml) und humanem Plasma (25%) inkubiert. Statistisch signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO und zur Isotyp-Kontrolle sind mit einem Stern (\*) markiert. Aufgrund der niedrigen Expressionsraten der in Lec13 produzierten Antikörper wurde als Kontrolle nur der doppelt optimierte HER2-EFTAE-Lec13, nicht aber der HER2-wt-Lec13 mitgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Plasma von verschiedenen gesunden Spendern. Ak, Antikörper.

In weiteren  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurde die Dosisabhängigkeit der vermittelten CDC-Aktivität durch die verschiedenen CD19-Antikörperkonstrukte untersucht. Dazu wurden Ramos Zellen mit den Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen und humanem Plasma inkubiert. CD19-EFTAE-CHO und CD19-EFTAE-Lec13 zeigten im Vergleich mit dem ineffektiven CD19-wt-CHO und CD19-wt-Lec13 eine signifikant gesteigerte CDC-Induktion gegenüber den Zielzellen (Abbildung 22). Beide Varianten mit der fünffachen Aminosäuresubstitution führten bereits bei subnanomolaren Konzentrationen zur Lyse der Tumorzellen, eine Sättigung wurde ab einer Konzentration von ca. 0,4  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 2,7$  nM) beobachtet. Für CD19-EFTAE-CHO wurde ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 0,06  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 0,4$  nM), für CD19-EFTAE-Lec13 von 0,08  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 0,5$  nM) berechnet (Tabelle 18). Somit zeigten beide Varianten ähnliche Aktivität in der Induktion von CDC gegenüber Ramos Zellen, was ebenfalls durch die kongruent verlaufenden Dosiskurven deutlich wurde. Der Antikörper CD19-wt-Lec13 zeigte im Vergleich mit CD19-wt-CHO eine gering gesteigerte, aber statistisch nicht signifikante CDC-Aktivität gegenüber den Zielzellen. Für die entsprechend optimierten Antikörpervarianten gegen HER2 konnte keine Zytotoxizität beobachtet werden (in Abbildung 22 nur zum Teil dargestellt).



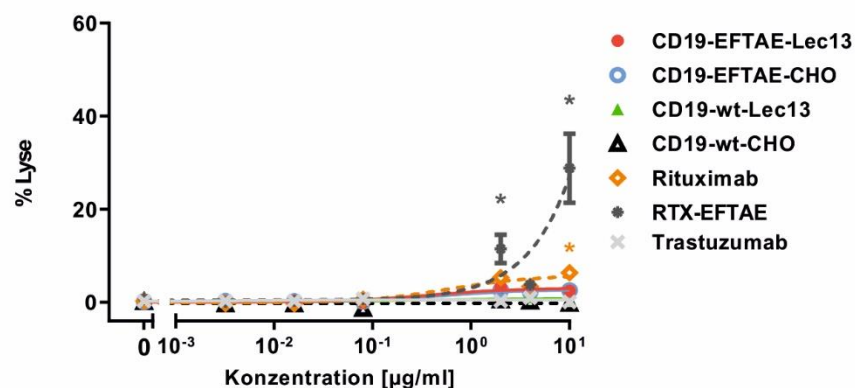
**Abbildung 22: Dosisabhängige CDC-Lyseraten von Ramos Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen.** Ramos Zellen wurden mit zunehmenden Antikörperkonzentrationen und humanem Plasma (25%) als Komplementquelle inkubiert. Für eine bessere Übersicht wurde nur Trastuzumab als Isotyp-Kontrolle in der Abbildung mitaufgeführt. Alle anderen entsprechenden Kontrollen gegen HER2 lagen bei ähnlichen Lyseraten. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Plasma von verschiedenen gesunden Spendern.

**Tabelle 18: Übersicht über die CDC-Aktivität**

Antikörper	Max. Lyseraten (%)	$\text{EC}_{50}$ * ( $\mu\text{g/ml}$ )	95% CI** ( $\mu\text{g/ml}$ )
CD19-EFTAE-Lec13	48,04	0,08	0,03 - 0,23
CD19-EFTAE-CHO	48,55	0,06	0,02 - 0,21
CD19-wt-Lec13	22,77	0,57	0,01 - 23,2
CD19-wt-CHO	n.a.***	n.a.***	n.a.***

\*  $\text{EC}_{50}$ , halbmaximale effektive Konzentration; \*\* CI, Konfidenzintervall (engl. *confidence interval*); \*\*\* n.a., nicht auswertbar.

In weiteren  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurden Raji Burkitt-Lymphom Zellen mit den verschiedenen CD19-Antikörpern und humanem Plasma inkubiert. Da diese Zelllinie unter den gewählten Versuchsbedingungen weniger sensitiv für die Lyse durch CDC ist (Mamidi et al. 2015), wurden für diese Versuche zusätzlich der therapeutisch eingesetzte CD20-Antikörper Rituximab, sowie eine Rituximab-Variante mit der EFTAE-Substitution (RTX-EFTAE) verwendet (Wirt et al. 2017). Hier zeigte sich, dass sämtliche Antikörpervarianten gegen CD19 nicht in der Lage waren, effektiv CDC gegen diese Tumorzelllinie zu induzieren (Abbildung 23). Auch die durch Einführung der EFTAE-Modifikation optimierten Antikörper, CD19-EFTAE-CHO und CD19-EFTAE-Lec13, wiesen gegenüber der Kontrolle Trastuzumab nur eine sehr geringe, nicht signifikant gesteigerte CDC-Induktion auf. Der klinisch eingesetzte Antikörper Rituximab vermittelte gegen diese Zielzelllinie ebenfalls nur geringe CDC-Aktivität. Durch die Einführung der EFTAE-Substitution in den Fc-Teil von Rituximab, RTX-EFTAE, wurden gesteigerte Lyseraten der Tumorzellen beobachtet. Diese traten allerdings erst bei relativ hohen Antikörperkonzentrationen auf. Die entsprechenden Isotyp-Kontrollen gegen HER2 zeigten keine Induktion von CDC. Diese Daten machen deutlich, dass das Fc-Engineering gleichzeitig auch eine gewisse Limitation besitzt und durch tumorzell- und antigenspezifische Faktoren beeinflusst und in seiner Wirksamkeit begrenzt wird. Um welche Faktoren es sich im Einzelnen genau handelt, muss in weiteren Versuchen im Detail analysiert werden.



**Abbildung 23: Dosisabhängige CDC-Lyseraten von Raji Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen.** Raji Zellen wurden mit zunehmenden Antikörperkonzentrationen und humanem Plasma (25%) als Komplementquelle inkubiert. Für eine bessere Übersicht wurde nur Trastuzumab als Isotyp-Kontrolle in der Abbildung mitaufgeführt. Alle anderen entsprechenden Kontrollen gegen HER2 lagen bei ähnlichen Lyseraten. Signifikante Lyseraten mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO sind mit einem Stern (\*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Plasma von verschiedenen gesunden Spendern.

### 3.6.3 B-Zell-Depletion

In verschiedenen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen wurde das zytotoxische Potential der einzelnen optimierten CD19-Antikörpervarianten vermittelt durch Komplement oder mononukleäre Zellen jeweils separat nachgewiesen. Nun sollte in einem weiteren Versuchsansatz überprüft werden, welche zytotoxische Aktivität von den einzelnen Konstrukten ausgeht, wenn gleichzeitig die Komponenten für beide Effektorfunktionen (ADCC und CDC) vorhanden und beide Abtötungsmechanismen möglich sind. Dazu wurden B-Zell-Depletionsanalysen mit humanem Vollblut durchgeführt. Dieser Versuchsansatz ermöglichte Versuchsbedingungen, die den physiologischen Voraussetzungen im Patienten am ehesten entsprechen, da so zeitgleich verschiedene Populationen an Effektorzellen und Komplementfaktoren zur Vermittlung der Zytotoxizität vorhanden sind. Zudem wurde durch diesen Ansatz untersucht, in welchem Ausmaß die Antikörpervarianten durch Aktivieren von Komponenten des Immunsystems in der Lage sind, die Lyse von autologen B-Zellen und nicht wie in den vorherigen Versuchen von allogenen Tumorzelllinien zu induzieren. Die verschiedenen Antikörper wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zu humanem Vollblut gesunder Spender hinzugefügt und die Ansätze für 24 h im Brutschrank inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil an verbleibenden B-Zellen ( $\text{CD}20^+/\text{CD}3^-$ ) ermittelt. Nach 24-stündiger Inkubation zeigten die afucosylierten CD19-Antikörpervarianten, CD19-EFTAE-Lec13 und CD19-wt-Lec13, eine gesteigerte Depletion der B-Zellen (Abbildung 24A). Für diese Antikörpervarianten konnten Werte von 1,17% und 1,2%, entsprechend  $0,053 \times 10^6$  Zellen/ml und  $0,055 \times 10^6$  Zellen/ml, an verbleibenden B-Zellen ermittelt werden. Die prozentuale Angabe bezieht sich hierbei auf die Gesamtheit der gemessenen Zellen in den einzelnen Proben im Analysefenster, bestehend aus Leukozyten sowie Thrombozyten und residuellen Erythrozyten. Parallel dazu konnten in unbehandelten Kontrollen 2,8% an verbleibenden B-Zellen, entsprechend  $0,135 \times 10^6$  Zellen/ml, und als Ausgangskonzentration an B-Zellen bei Versuchsbeginn ein Wert von  $0,15 \times 10^6$  Zellen/ml gemessen werden. Für eine genauere Analyse der B-Zell-Depletion wurde ihre Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration ermittelt. Hier zeigten die beiden Antikörper mit nachgewiesener gesteigerter ADCC-Aktivität, CD19-wt-Lec13 und CD19-EFTAE-Lec13, im Vergleich mit dem Wildtypantikörper, CD19-wt-CHO, eine signifikant gesteigerte Aktivität in der Lyse autologer B-Zellen (Abbildung 24B). Mit zunehmender Antikörperkonzentration erzielten beide Konstrukte gesteigerte B-Zell-Depletion bis zu einem Plateau, das mit einer Antikörperkonzentration von ca.  $0,1 \mu\text{g/ml}$  erreicht wurde. Im Bereich der maximalen Depletionsraten wurden durch diese beiden Antikörpervarianten spenderabhängig jeweils ungefähr 40-60% der B-Zellen beseitigt. Zwischen den beiden afucosylierten Varianten konnten nur geringe Unterschiede ermittelt werden. So erreichte der doppelt optimierte CD19-EFTAE-Lec13 bereits bei einer Konzentration von  $0,01 \mu\text{g/ml}$  geringfügig höhere B-Zell-Depletion als CD19-wt-Lec13. Gleichzeitig lagen die maximal

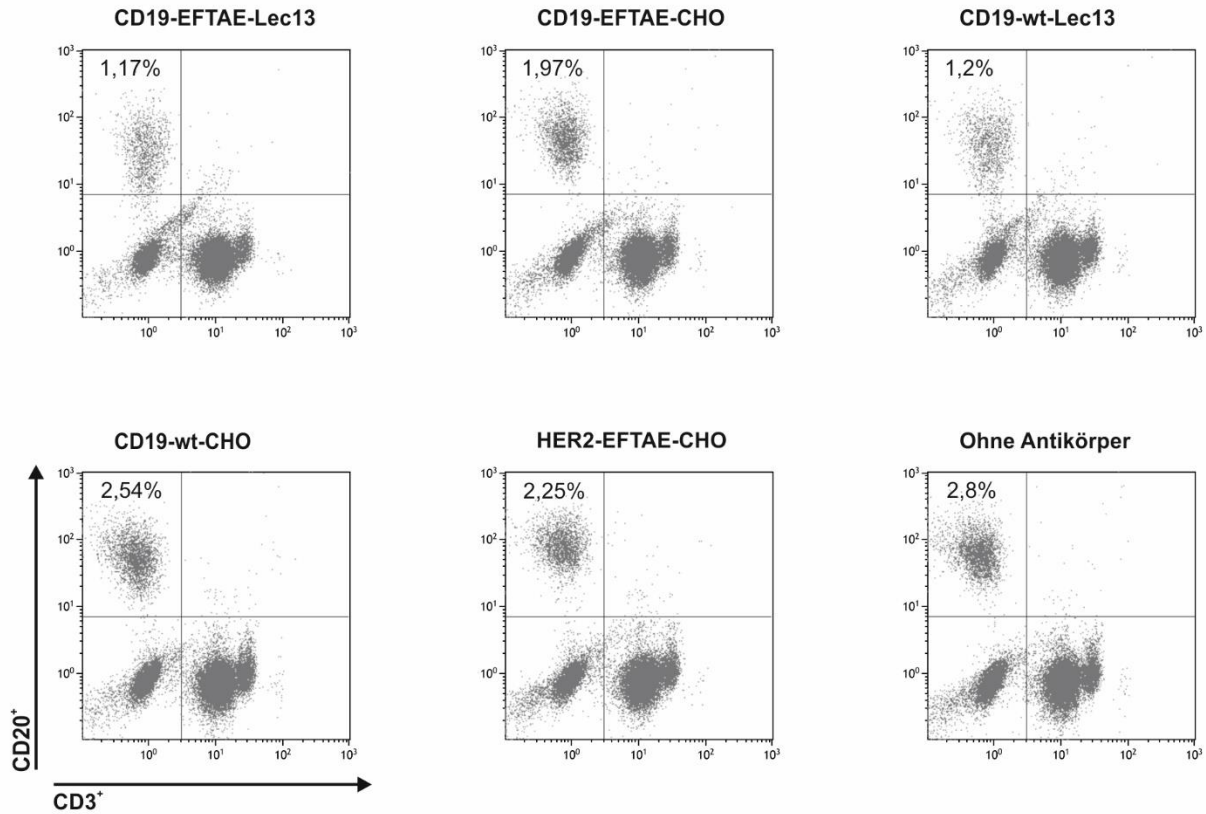


erreichten Lysewerte durch CD19-EFTAE-Lec13 etwas unterhalb der von CD19-wt-Lec13. Die rein Protein-optimierte Variante, CD19-EFTAE-CHO, für die im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuch eine erhöhte CDC-Aktivität beobachtet wurde (Abbildung 22), vermittelte im Vergleich zu CD19-wt-CHO eine geringe, nicht signifikant gesteigerte Depletion der B-Zellen. Durch CD19-wt-CHO wurde, wie anhand der Daten aus den  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsexperimenten zu erwarten war, eine nur sehr geringe Aktivität in der Depletion von B-Zellen erzielt. Die entsprechenden Kontrollantikörper gegen HER2 zeigten keine Aktivität. Um eine Information bezüglich der Anzahl an vorhandenen Effektorzellen in diesem Versuchsansatz zu erhalten, wurde zusätzlich die Zellkonzentration der verschiedenen Effektorzellpopulationen bestimmt. Übereinstimmend mit Konzentrationsangaben in der Literatur (Baum 2013; Renz und Gierten 2013) konnten für die einzelnen Populationen folgende durchschnittliche Werte ermittelt werden: Granulozyten ( $\text{CD}15^+$ )  $3,5 \times 10^6$  Zellen/ml, Monozyten ( $\text{CD}14^+$ )  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml und NK-Zellen ( $\text{CD}56^+/\text{CD}3^-$ )  $0,24 \times 10^6$  Zellen/ml in Relation zu einer B-Zell-Konzentration ( $\text{CD}20^+/\text{CD}3^-$ ) von  $0,16 \times 10^6$  Zellen/ml.

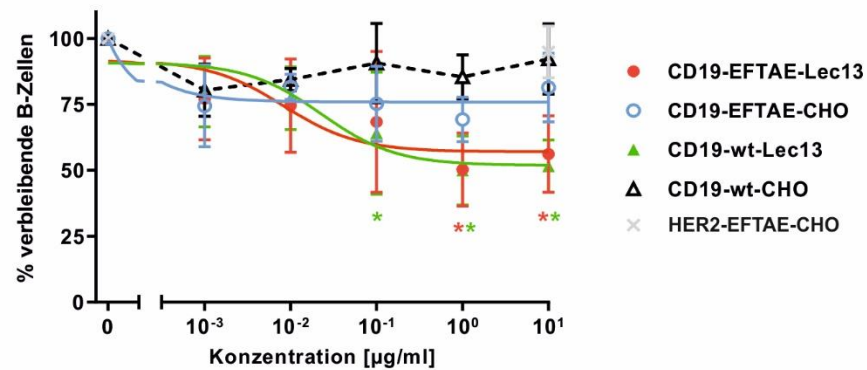
Somit lässt sich insgesamt zusammenfassen, dass unter verhältnismäßig physiologischen Bedingungen, wie sie in diesem Versuchsansatz gegeben waren, *in vitro* kein Vorteil des zweifachen Fc-Engineerings gegenüber der nur für ADCC optimierten Variante beobachtet werden konnte.



**A**



**B**



**Abbildung 24: Autologe B-Zell-Depletion im Vollblut durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten. (A)** Die Analyse der B-Zell-Depletion durch Antikörperkonstrukte gegen CD19 (10 µg/ml) im Vollblut erfolgte durch Messung der verbleibenden B-Zellen mit CD20-FITC, CD3-Krome Orange und Durchflusszytometrie. Als Isotyp-Kontrolle wurde für eine bessere Übersicht nur HER2-EFTAE-CHO mitaufgeführt. Dargestellt in Punktediagrammen sind jeweils im oberen linken Quadranten die verbleibenden B-Zellen (CD20<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) mit prozentualer Angabe. Die Daten stellen ein repräsentatives Experiment von drei Durchführungen dar. **(B)** Zur Analyse der Dosis-abhängigen B-Zell-Depletion wurden steigende Antikörperkonzentrationen mit humanem Vollblut inkubiert. Signifikante Unterschiede in der B-Zell-Depletion mit einem Wert  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD19-wt-CHO sind mit einem Stern (\*) markiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde für eine bessere Übersicht nur HER2-EFTAE-CHO mitaufgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Vollblut von verschiedenen gesunden Spendern.

### 3.7 Überblick über die verschiedenen Fc-optimierten CD19-Antikörper

In diesem Kapitel soll zusammenfassend ein Überblick über die verschiedenen Fc-optimierten CD19-Antikörpervarianten und ihrer Bindungsfähigkeit und zytotoxischer Aktivität, resultierend aus den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, gegeben werden (Tabelle 19). Die Darstellung beruht auf dem Vergleich der verschiedenen Antikörpervarianten mit dem nativen CD19-Antikörper, CD19-wt-CHO. Dabei wird deutlich, dass der native CD19-Antikörper eine Bindung an das Zielantigen CD19 sowie an eine der beiden Allelvarianten des FcγRIIIa-Rezeptors (FcγRIIIa-158V) aufwies und geringe ADCC-Aktivität zeigte (Tabelle 19). Allerdings war dieser Antikörper weder in der Lage C1q oder FcγRIIIa-158F zu binden noch CDC oder eine B-Zell-Depletion zu vermitteln. Im Vergleich dazu war bei den verschiedenen Fc-optimierten Antikörpern, CD19-wt-Lec13, CD19-EFTAE-CHO, CD19-EFTAE-Lec13, CD19-DE-CHO und CD19-DE-Lec13, entsprechend der Veränderung in der Fc-Domäne jeweils eine Steigerung der C1q-Bindung mit gesteigerter CDC-Aktivität oder eine erhöhte Affinität für FcγRIIIa resultierend in einer höheren ADCC-Induktion erkennbar. Der doppelt optimierte Antikörper, CD19-EFTAE-Lec13, wies sowohl eine höhere ADCC- als CDC-Aktivität auf.

**Tabelle 19: Übersicht über die verschiedenen CD19-Antikörpervarianten mit ihrem Bindungsverhalten und vermittelter Zytotoxizität**

Antikörper	CD19-Bindung	FcγRIIIa-Bindung		C1q-Bindung	ADCC	CDC	B-Zell-Depletion
		FcγRIIIa-158F	FcγRIIIa-158V				
CD19-wt-CHO	+*	-**	+	-	+	-	-
CD19-wt-Lec13	+	+++***	++	-	+++****	+	+++
CD19-EFTAE-CHO	+	+	+	++	+	+++	+
CD19-EFTAE-Lec13	+	+++	++	++	+++	+++	+++
CD19-DE-CHO	+	++	++	-	n. b.*****	n. b.	n. b.
CD19-DE-Lec13	+	+++	++	-	n. b.	n. b.	n. b.

\* +, Bindung bzw. vermittelte Zytotoxizität; \*\* -, keine Bindung bzw. keine vermittelte Zytotoxizität; \*\*\* ++, gesteigerte Bindung bzw. gesteigerte vermittelte Zytotoxizität; \*\*\*\* +++, deutlich gesteigerte Bindung bzw. deutlich gesteigerte vermittelte Zytotoxizität; \*\*\*\*\* n.b., nicht bestimmt.

## 4 DISKUSSION

Der mittlerweile weit verbreitete Einsatz von therapeutischen Antikörpern in der Therapie maligner Erkrankungen zeigt große klinische Erfolge und hat so die Prognose vieler Patienten deutlich verbessert (Scott et al. 2012; Hafeez et al. 2018). Ein großer Vorteil dieser Therapieform ist die Selektivität therapeutischer Antikörper für eine spezielle Zielstruktur, wodurch einzelne Zellpopulationen gezielt angegriffen werden. Dies hat zur Folge, dass diese Therapie häufig mit weniger Nebenwirkungen als eine konventionelle Chemotherapie einhergeht und von Patienten in der Regel gut toleriert wird (Hansel et al. 2010). Allerdings ist auch diese Therapieform nicht ganz ohne Nebenwirkungen und so wurde im Rahmen dieser Therapie in einigen Fällen unter anderem von infusionsbedingten Nebenwirkungen wie Übelkeit und Fieber oder Thrombozytopenien berichtet (Haider und Cahill 2004; Norin et al. 2015). Darüber hinaus weist die Therapie mit konventionellen monoklonalen Antikörpern auch eine gewisse Limitation auf. So zeigen beispielsweise klassische, gegen das B-lymphoide Zielantigen CD19 gerichtete IgG1 Antikörper keine zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen, weshalb sie in dieser Form für einen klinischen Einsatz nicht in Frage kommen. Deshalb wird durch verschiedene Strategien wie dem Fc-Engineering versucht, die Effizienz therapeutischer Antikörper weiter zu verbessern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humanisierte Fc-optimierte CD19-Antikörper charakterisiert und funktionell verglichen. Die verschiedenen Varianten wiesen durch Protein-Engineering, in Form der EFTAE- oder der DE-Modifikation, und Glyko-Engineering durch Afucosylierung der Fc-Domäne gesteigerte Affinität für den Komplementfaktor C1q oder den aktivierenden FcγRIIIa auf. Die CD19-Antikörpervariante, CD19-EFTAE-Lec13, zeigte durch Kombinieren beider Fc-Engineering-Strategien eine gesteigerte Affinität zu beiden Effektoren. In den verschiedenen *in vitro* Zytotoxizitätsexperimenten mit Lymphom-Zelllinien wiesen die einzelnen Konstrukte abhängig vom Aufbau ihrer Fc-Domäne im Vergleich mit einem IgG1 CD19-Antikörper (CD19-wt-CHO) gesteigerte CDC- oder ADCC-Aktivität auf. Der doppelt optimierte CD19-EFTAE-Lec13 zeigte sowohl gesteigerte CDC- als auch ADCC-Induktion. Unter annähernd physiologischen Bedingungen wurde jedoch in ersten *in vitro* B-Zelldepletionsstudien kein Vorteil der doppelt optimierten CD19-Antikörper beobachtet.

## 4.1 Fc-Engineering zur Optimierung monoklonaler Antikörper

Zur Optimierung der Effizienz therapeutisch genutzter Antikörper stellt das Fc-Engineering eine weit verbreitete und zunehmend erfolgreich angewandte Strategie dar (Kellner et al. 2017). Für CDC optimierte Antikörper wurden noch nicht im klinischen Rahmen getestet. Im Gegensatz dazu sind bereits zwei glyko-optimierte Antikörper (Obinutuzumab und Mogamulizumab) für den klinischen Einsatz zugelassen. Beide Antikörper weisen einen geringeren Fucose-Gehalt auf und vermitteln potent ADCC (Ishii et al. 2010; Mössner et al. 2010). Allerdings ist fraglich, ob das Fc-Engineering tatsächlich zu einer gesteigerten Effizienz im Patienten führt, da vergleichende Studien zwischen den optimierten Antikörpern und ihren unveränderten IgG1-Isotypen im Patient schwer umsetzbar sind und diese Daten somit weitgehend nicht verfügbar sind (Kellner et al. 2017).

### 4.1.1 Fc-optimierte CD19-Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im präklinischen Setting deutlich, dass bereits etablierte Fc-Engineering-Strategien, wie die fünffache Aminosäuresubstitution EFTAE, die zweifache Aminosäuresubstitution DE sowie das Afucosylieren, auch im Hintergrund eines CD19-Antikörpers im direkten Vergleich mit dem Wildtyp IgG1 CD19-Antikörper, zu gesteigerter Affinität zum Komplementfaktor C1q oder zu FcγRIIIa führten. Die Bindung an das Zielantigen CD19 wurde durch die Veränderungen an der Fc-Domäne nicht beeinflusst und so wiesen die verschiedenen CD19-Antikörpervarianten eine vergleichbar hohe Affinität für das Zielantigen wie der Wildtyp Antikörper auf (Abbildung 15). Diese Ergebnisse decken sich mit Daten von anderen Fc-optimierten Antikörpern. So weisen der Protein-optimierte CD19-Antikörper MOR208 sowie eine glyko-optimierte Variante von Trastuzumab für ihr entsprechendes Zielantigen ebenfalls eine ähnliche Affinität wie der jeweilige Isotyp IgG1 Antikörper auf (Horton et al. 2008; Suzuki et al. 2007).

Zusätzlich wurde untersucht, wie sich der FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus, ein Einzel-nukleotid-Polymorphismus im *FCGR3A* Gen, auf die Affinität der verschiedenen optimierten Antikörpervarianten auswirkt. In der Literatur wird an verschiedenen Stellen beschrieben, dass IgG1 Antikörper *in vitro* eine höhere Affinität für FcγRIIIa-158V als für FcγRIIIa-158F zeigen (Bruhns et al. 2009; Koene et al. 1997). Dieser Befund bestätigte sich mit dem IgG1 CD19-Antikörper, CD19-wt-CHO. Dieser wies, erkennbar an den deutlich höheren Werten für die mittlere Fluoreszenzintensität bei gleicher Antikörperkonzentration, im Vergleich der beiden Allelfomen von FcγRIIIa eine gesteigerte Bindung an FcγRIIIa-158V auf (Abbildung 16). Weiterhin wurde deutlich, dass das Fc-Engineering im Vergleich mit CD19-wt-CHO vor allem für FcγRIIIa-158F zu einer deutlichen Affinitätssteigerung führte. Diese Tatsache ist auch von klinischem Interesse, da der FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit von klinisch etablierten Antikörpern wie Trastuzumab, Rituximab und Cetuximab

hat (Magnes et al. 2018; Musolino et al. 2008; Persky et al. 2012). Bei Patienten mit dem hochaffinen FcγRIIIa-158V/V-Genotyp wurde einhergehend mit längeren Überlebensraten ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit therapeutischen Antikörpern festgestellt (Musolino et al. 2008). Da allerdings der F-Polymorphismus mit einer Verteilung von ca. 50% V/F, 40% F/F und 10% V/V den dominierenden innerhalb der Bevölkerung darstellt (Magnes et al. 2018; Persky et al. 2012), ist es für einen Großteil der Patienten bedeutsam, dass der Einfluss des FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus auf die therapeutische Wirksamkeit von Antikörper verringert wird. Dass die Affinitätsunterschiede durch Fc-Engineering reduziert werden können, wird zum einen in den Daten dieser Arbeit (Tabelle 15) sowie in einer Phase-1-Studie mit einem glyko-optimierten Antikörper gegen EGFR deutlich (Paz-Ares et al. 2011). Bei 27 der 75 in die Studie eingeschlossenen Probanden mit soliden Tumoren konnte unabhängig von ihrem FcγRIIIa-158V/F-Polymorphismus eine Stabilisierung der Krankheit nachgewiesen werden. Somit könnte eine Minimierung der Affinitätsunterschiede zwischen FcγRIIIa-158F und FcγRIIIa-158V durch Fc-Engineering für viele Patienten von Vorteil sein.

Eine CD19-Antikörpervariante, die im Rahmen dieser Arbeit initial charakterisiert wurde, enthielt die zweifach Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E), wie sie ebenfalls Teil der Fc-Domäne des CD19-Antikörpers MOR208 ist, der derzeit im fortgeschrittenen klinischen Entwicklungsstadium ist (Horton et al. 2008). Diese CD19-DE-CHO Variante wurde in einem Teil der durchgeführten Versuche initial charakterisiert und so Grundlagen für eine *in vivo* Studie gelegt, in der die Aktivität des CD19-DE-CHO Antikörpers bei pädiatrischer B-Vorläufer-ALL in Xenograft Modellen in Zusammenarbeit mit der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I des Universitätsklinikum Schleswig-Holsteins getestet wurde (Schewe et al. 2017). In einem experimentellen MRD-Setting führte CD19-DE-CHO zu einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse sowie zu einer deutlichen Reduktion der Blasten im peripheren Blut wie auch im Knochenmark. In einem Modell akuter ALL, definiert als >1% humane Blasten im peripheren Blut, führte CD19-DE-CHO insbesondere in der Kombination mit Chemotherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zur jeweiligen Monotherapie zu signifikant längeren Überlebensraten. Aufgrund dieser Ergebnisse stellen entsprechend modifizierte CD19-Antikörper eine potentielle, vielversprechende Therapiealternative für die Behandlung pädiatrischer Patienten mit ALL dar, die auf Chemotherapie allein ein schlechtes Ansprechen zeigen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde mit CD19-DE-CHO und dem glyko-optimierten CD19-wt-Lec13 *in vitro* ein autologer B-Zell-Depletionsversuch durchgeführt (Daten nicht veröffentlicht). Hier zeigte der für ADCC optimierte CD19-wt-Lec13 vergleichbar hohe B-Zell-Depletionswerte wie CD19-DE-CHO. Somit ist die glyko-optimierte CD19-Variante möglicherweise *in vivo* ebenso effektiv wie CD19-DE-CHO. Diese initiale Beobachtung muss in weiteren *in vitro* Versuchen bestätigt werden, bevor in weiterführenden *in vivo* Studien die therapeutische Aktivität der beiden Antikörper im Mausmodell verglichen werden soll.

Die drei anderen Fc-optimierten Varianten neben CD19-DE-CHO (CD19-wt-Lec13, CD19-EFTAE-CHO, CD19-EFTAE-Lec13) wiesen in den verschiedenen Zytotoxizitätsexperimenten im Vergleich zu CD19-wt-CHO entsprechend ihrer optimierten Fc-Domänen jeweils gesteigerte Zytotoxizität auf. So zeigten die afucosylierten Varianten mit erhöhter Affinität für FcγRIIIa, CD19-wt-Lec13 und CD19-EFTAE-Lec13, gesteigerte ADCC-Aktivität, während die Varianten mit der EFTAE-Substitution, CD19-EFTAE-CHO und CD19-EFTAE-Lec13, mit höherer Bindung von C1q gesteigerte CDC-Induktion aufwiesen. Gleichzeitig wurde in den Zytotoxizitätsversuchen zur Analyse der CDC-Aktivität eine gewisse Limitierung des Fc-Engineerings deutlich. So waren die für CDC optimierten Varianten, CD19-EFTAE-CHO und CD19-EFTAE-Lec13, im Gegensatz zu den Versuchen mit Ramos Zellen (Abbildung 22) nicht in der Lage, CDC gegenüber Raji Zellen zu vermitteln (Abbildung 23). Eine mögliche Erklärung für diese gewisse Resistenz gegenüber CDC kann die hohe Expression von membranständigen komplementregulatorischen Proteinen (engl. *membrane-bound complement regulatory proteins*, mCRPs), wie CD46, CD55 sowie CD59, auf der Zelloberfläche von Raji Zellen sein (Mamidi et al. 2015). In diesem Fall scheint die Fc-Optimierung durch Protein-Engineering nicht auszureichen, um den inhibitorischen Effekt zu überwinden. Da Leukämie- oder Lymphomzellen diese inhibitorischen Proteine in der Regel exprimieren (Guc et al. 2000), kann es sinnvoll sein, den Einsatz von CDC optimierten CD19-Antikörpern mit der Gabe von neutralisierenden Antikörpern beispielsweise gegen CD59 zu kombinieren oder die mCRP-Expression durch RNA Interferenz unter Verwendung spezifischer siRNA-Moleküle (engl. *small interfering RNA*) herunterzuregulieren, um so die inhibitorische Wirkung zu überwinden (Mamidi et al. 2015). In den Versuchen zur CDC-Aktivität gegenüber Raji Zellen wurde ebenfalls eine für CDC optimierte Variante von Rituximab, RTX-EFTAE, eingesetzt. Diese war in der Lage, CDC gegenüber Raji Zellen zu induzieren. Somit scheint es auch einen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Antigen und der CDC-Induktion zu geben. Für Raji Zellen wurde eine etwas höhere CD20- als CD19-Expression gemessen (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wurde an verschiedenen Stellen ein deutlicher Zusammenhang zwischen Antigenexpressionsniveau und CDC-Aktivität beschrieben (Golay et al. 2001; Rösner et al. 2013). Dies kann somit eine mögliche Begründung der unterschiedlichen CDC-Aktivität des optimierten CD20-Antikörpers gegenüber dem entsprechenden CD19-Antikörper sein. Insgesamt wird die Bedeutung von CDC als Effektormechanismus für die Effizienz von therapeutischen Antikörpern noch kontrovers diskutiert. Insbesondere die diversen *in vivo* Studien zur Rolle des Komplements kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. In einigen Studien wurde dabei CDC als der überwiegende Wirkmechanismus von therapeutischen Antikörpern identifiziert (Cragg und Glennie 2004; Golay et al. 2006). Andererseits wurde in zahlreichen Studien die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper vor allem auf Rekrutierung von Effektorzellen via Fc-Rezeptoren zurückgeführt (Clynes et al. 2000;

de Hajj et al. 2010). Im Patienten beeinflussen darüber hinaus möglicherweise noch viele weitere Faktoren, welcher Wirkmechanismus eines Antikörpers letztendlich dominiert. So können sich Eigenschaften des Tumors wie Antigenexpressionslevel oder Expression von inhibitorischen Molekülen wie mCRPs darauf auswirken, ob ein Antikörper vermehrt via CDC oder ADCC wirkt. In weiteren *in vivo* Studien konnte zudem eine Bedeutung der Tumorlast auf die vorherrschenden Effektormechanismen gezeigt werden (Boross et al. 2011). Im Rahmen dieser Studie wurde deutlich, dass bei geringer Tumorlast CDC für die Elimination der Tumorzellen verantwortlich war, während bei hoher Tumorlast sowohl Komplement als auch aktivierende FcγR in die Wirkung therapeutische Antikörper involviert waren. Auch das Mikroumfeld und die anatomische Lokalisation des Tumors scheinen Auswirkungen auf Effektormechanismen therapeutischer Antikörper zu haben (Gong et al. 2005). Da in verschiedenen Situationen jeweils ein anderer Wirkmechanismus der führende zu sein scheint, kann ein therapeutischer Antikörper mit sowohl gesteigerter ADCC und CDC gegebenenfalls mit einem größeren therapeutischen Nutzen gegenüber nativen Antikörpern oder Antikörpern, die nur für einen der Wirkmechanismen optimiert wurden, einhergehen.

#### **4.1.2 Simultane Steigerung der ADCC- und CDC-Aktivität**

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass es durch Kombinieren verschiedener Fc-Engineering-Strategien gelungen ist, einen CD19-Antikörper zu generieren, der sowohl gesteigerte CDC- als auch ADCC-Aktivität aufwies. Bisher wurden nur wenige Ansätze beschrieben, in denen durch Veränderungen der Antikörperstruktur beide Effektormechanismen simultan gesteigert werden konnten. Die meisten beschriebenen Ansätze sind auf einen der beiden Wirkmechanismen fokussiert (Horton et al. 2008; Matlawska-Wasowska et al. 2013). Durch alleiniges Protein-Engineering in Form von einzelnen Aminosäuresubstitutionen ist es schwierig, eine gleichzeitige Steigerung beider Effektormechanismen zu erzielen. Grund dafür sind möglicherweise die Bindungsstellen für C1q und FcγRIIIa, die in überlappenden Bereichen der Fc-Domäne liegen (Vidarsson et al. 2014). Dadurch gehen einige der beschriebenen Ansätze, wie beispielsweise die dreifache Aminosäuresubstitution EFT (S267E/H268F/S324T), bei denen die Substitution einzelner Aminosäuren zu einer gesteigerten Affinität zu C1q oder FcγRIIIa führt, gleichzeitig mit einem Affinitätsverlust für den jeweils anderen Faktor einher (Lazar et al. 2006; Moore et al. 2010). Natsume und Kollegen ist es mit einem afucosylierten IgG1/IgG3 Mixed-Isotyp gelungen, ein Antikörperderivat gegen CD20 zu generieren, das im Vergleich mit den nativen IgG1 bzw. IgG3 Antikörpern sowohl gesteigert CDC- als auch ADCC vermittelt (Natsume et al. 2008).

Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine IgG1 Antikörpervariante gegen CD19 erzeugt, die durch Kombinieren von Protein-Engineering in Form der fünffachen Aminosäuresubstitution EFTAE in der C<sub>H</sub>2-Domäne und Glyko-Engineering durch einen reduzierten Fucose-Gehalt gesteigert CDC als auch ADCC vermittelte. Diese Variante wies im Vergleich

zum Wildtyp IgG1 CD19-Antikörper, CD19-wt-CHO, eine höhere Affinität zum Fc $\gamma$ RIIIa und zu C1q auf und führte in den verschiedenen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen mit Lymphomzellen zu gesteigerter CDC- als auch ADCC-Aktivität. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es möglich ist, Strategien des Protein- als auch des Glyko-Engineerings simultan innerhalb eines Moleküls anzuwenden und so Antikörper zu generieren, die gesteigerte CDC- als auch ADCC-Aktivität zeigen.

In den jeweiligen CDC-Versuchen wiesen die doppelt optimierte Variante, CD19-EFTAE-Lec13, und die rein Protein-optimierte Variante, CD19-EFTAE-CHO, jeweils vergleichbare Effizienz auf (Abbildung 22). Somit scheint im Hinblick auf die CDC-Aktivität das Fehlen der Fucose innerhalb CD19-EFTAE-Lec13 kaum Einfluss auf die Interaktion zwischen der Fc-Domäne und dem Komplementfaktor C1q zu nehmen. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen für andere CDC optimierte und afucosylierte Antikörper überein (Natsume et al. 2008). Im Hinblick auf die ADCC-Aktivität zeigten sich zwischen der rein für ADCC optimierten Variante, CD19-wt-Lec13, und der doppelt optimierten Variante, CD19-EFTAE-Lec13, geringe Unterschiede in der ADCC-Aktivität. CD19-EFTAE-Lec13 wies im Vergleich mit der einfach optimierten Variante eine gering gesteigerte Effizienz in der Induktion von ADCC auf (Tabelle 16). Diese Unterschiede in der ADCC-Induktion sind möglicherweise auf die beobachteten verschiedenen Affinitäten der beiden Antikörpervarianten für den Fc $\gamma$ RIIIa-158V/F-Polymorphismus zurückzuführen (Tabelle 15). CD19-EFTAE-Lec13 wies insbesondere für Fc $\gamma$ RIIIa-158F eine deutlich höhere Affinität als CD19-wt-Lec13 auf, was zu gesteigerter ADCC-Aktivität führen kann. So führten verschiedene Fc-optimierte Antikörper proportional zur Affinitätssteigerung für Fc $\gamma$ RIIIa zu gesteigerten ADCC-Raten (Lazar et al. 2006). Da die Polymorphismen der verschiedenen Spender nicht bestimmt wurden, bleibt unklar, ob die beobachteten Unterschiede darauf zurückgeführt werden können. Da der F-Polymorphismus, wie bereits vorher erwähnt, den prozentual dominierende innerhalb der Bevölkerung darstellt (Magnes et al. 2018; Persky et al. 2012), ist dies als Erklärung der beobachteten Unterschiede in der ADCC-Aktivität gut denkbar. Die in den ADCC-Versuchen beobachtete Zytotoxizität mit MNCs als Effektorzellen innerhalb der kurzen Versuchszeit von drei Stunden ist vor allem durch die Aktivierung von NK-Zellen zu begründen (Herter et al. 2014). Innerhalb der MNC-Population sind mit Monozyten und  $\gamma\delta$  T Zellen weitere potentielle Effektorzellen für therapeutische Antikörper enthalten (Capietto et al. 2011; Weiskopf und Weissman 2015). Es bleibt zu klären, ob die hier untersuchte Form des zweifachen Fc-Engineerings ebenfalls zu einer ausgeprägteren Induktion von ADCC durch diese Zellpopulationen führt. Auch einen möglichen verstärkenden Effekt dieser Aminosäuresubstitution hinsichtlich ADCC durch Makrophagen ist bislang noch nicht untersucht worden. Denn für die EFTAE-Substitution wurde neben der gesteigerten Affinität zu C1q auch eine Affinitätssteigerung für den aktivierenden Fc $\gamma$ RIIa und den inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb beschrieben (Moore et al. 2010). Diese



werden auf Monozyten und Makrophagen, nicht aber auf NK-Zellen exprimiert (Nimmerjahn und Ravetch 2008). Da Monozyten und Makrophagen wie NK-Zellen auch den aktivierenden FcγRIIIa exprimieren, für den durch Afucosylierung die Affinität gesteigert wird, muss im Detail geklärt werden, ob durch die zusätzliche Aminosäuresubstitution EFTAE in der Fc-Domäne eine weitere Aktivitätssteigerung erreicht werden kann oder ob sich in diesem Fall eine höhere Affinität zu FcγRIIb eher inhibierend auswirkt.

In den Versuchen zur autologen B-Zell-Depletion durch die verschiedenen Antikörpervarianten war eine Ausgangssituation gegeben, bei der gleichzeitig verschiedene Effektorquellen vorhanden waren und die so den physiologischen Bedingungen sehr nahe kommt. Im Versuchsaufbau standen durch die Zugaben von Vollblut gesunder Spender sowohl Komplement, NK-Zellen als auch weitere myeloische Zellen einschließlich Granulozyten als Effektoren zur Verfügung. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich keine Überlegenheit der doppelt optimierten Variante, CD19-EFTAE-Lec13, gegenüber der nur für ADCC optimierten Variante, CD19-wt-Lec13. So wiesen beide Antikörper vergleichbar hohe Werte an verbleibenden B-Zellen auf (Abbildung 24). Dies legt den Schluss nahe, dass in diesem hier durchgeführten Versuchssetting die Vermittlung der beobachteten B-Zell-Depletion überwiegend durch die Aktivierung von NK-Zellen über FcγRIIIa erfolgte und weniger über CDC. Der Vergleich dieser Beobachtung mit Daten aus der Literatur zu anderen Antikörpern mit gesteigerter CDC und ADCC stellt sich allerdings als schwierig dar. So wurde ein humanisierter, afucosylierter IgG1/IgG3 Mixed-Isotyp gegen *Folate Receptor 1* (FOLR1) generiert (Ando et al. 2017). Dieser zeigte in den jeweiligen Einzelversuchen zu ADCC und CDC gesteigerte Aktivität im Vergleich zu einem klinisch evaluierten FOLR1-Antikörper. Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings keine zur vorliegenden Arbeit vergleichbare Versuche durchgeführt, in denen sowohl Komplement als auch Effektorzellen zeitgleich zur Verfügung standen bzw. fehlen Daten aus dem *in vivo* Mausmodell zum Vergleich einer einfach für CDC bzw. ADCC optimierten Variante zur doppelt optimierten Variante. Auch im Rahmen der Evaluierung einer zweifach optimierten CD20-Antikörpervariante, die in den Einzelexperimenten jeweils gesteigerte CDC- als auch ADCC-Aktivität aufwies, gibt es keine Daten zur Effizienz bei gleichzeitigem Vorliegen verschiedener Effektoren (Wirt et al. 2017). Somit sind weitere Untersuchungen nötig, ob gegebenenfalls im Hintergrund anderer Antikörper als gegen CD19 oder durch andere experimentelle Bedingungen als die hier gewählten, das kombinierte Verbessern beider Effektormechanismen in Situationen, in denen verschiedene Effektoren gleichzeitig zur Verfügung stehen, zu einer weiteren Effizienzsteigerung führt. Aber auch für Situationen oder anatomische Kompartimente, in denen vor allem einer der beiden Wirkmechanismen der dominierenden zu sein scheint, kann ein Antikörper, der sowohl über ADCC als auch CDC wirken kann, von Vorteil sein. So konnten Gong und Kollegen im Mausmodell zeigen, dass beispielsweise die Depletion von zirkulierenden oder follikulären B-

Zellen in der Milz überwiegend Effektorzell-vermittelt ist, während die Depletion von B-Zellen in der Marginalzone vor allem von Komplement abhängig ist (Gong et al. 2005). Somit kann ein Antikörper, der sowohl für CDC als auch für ADCC optimiert wurde, je nach Lokalisation der malignen Zellen mit einer größeren therapeutischen Wirksamkeit verbunden sein.

Ein weiterer Aspekt, der in dem hier gewählten Versuchsaufbau zur B-Zell-Depletion die physiologische Situation gut abbildet, ist das Vorhandensein vieler endogener Immunglobuline im humanen Vollblut. Diese konkurrieren mit therapeutisch eingesetzten Antikörpern um die Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Effektorzellen. Für Trastuzumab konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere die ADCC-Aktivität durch endogenes IgG inhibiert werden kann (Preithner et al. 2006). Zudem handelt es sich hier bei den CD19-positiven Zielzellen um gesunde B-Zellen und nicht um Leukämie- oder Lymphomzellen, wie sie in den diversen <sup>51</sup>Cr-Freisetzungsversuchen zum Einsatz kamen. Tumorzellen zeichnen sich in vielen Fällen durch die Expression sogenannter *Danger*-Signale wie Liganden des Rezeptors *natural-killer group 2 member D* (NKG2D) auf der Zelloberfläche aus (Inagaki et al. 2009). Diese führen durch Bindung an den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen zu deren Aktivierung und so zur Induktion der zytotoxischen Funktion der NK-Zellen. Die Expression solcher NKG2D-Liganden hat auch unmittelbare Auswirkung auf ADCC. So wurde gezeigt, dass Lymphomzellen, die diese Liganden exprimieren sensibler für durch Rituximab vermittelte ADCC sind (Inagaki et al. 2009). Auf gesunden B-Zellen wird in der Regel nur eine sehr geringe Expression dieser Liganden gefunden. Gleichzeitig exprimieren diese Zellen protektive HLA-Klasse-II-Moleküle (Nowbakht et al. 2005), sodass diese zusätzlichen, aktivierenden Signale auf NK-Zellen in einem Versuchsansatz mit gesunden B-Zellen weniger vorhanden sind. Hinsichtlich möglicher inhibierender Signale auf die CDC-Aktivität der CD19-Antikörper in Form von Expression membranständiger komplementregulatorischer Proteine (mCRPs) auf den Zielzellen konnte im Vergleich von gesunden mit malignen B-Zellen kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. So exprimieren sowohl gesunde als auch maligne B-Zellen mCRPs, lediglich die Expressionstärke der einzelnen mCRPs unterscheiden sich (Golay et al. 2001; Guc et al. 2000). Somit war im Rahmen dieses Versuchsaufbaus mit gesunden B-Zellen ebenfalls die Expression von mCRPs gegeben und damit auch inhibierende Signale auf die Antikörperwirkung, wie sie auch bei Tumorzellen vorhanden sein können.

In dem hier durchgeführten Versuchsrahmen zur autologen B-Zell-Depletion standen neben NK-Zellen auch myeloische Zellen wie beispielsweise neutrophile Granulozyten als Effektoren zur Verfügung. Diese wurden in der Literatur an verschiedenen Stellen als weitere Effektorzellen für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper beschrieben (Albanesi et al. 2013; Siders et al. 2010). Für diese Effektoren wurde beschrieben, dass ihre ADCC-Aktivität durch einen verringerten Fucose-Gehalt therapeutischer Antikörper negativ beeinflusst wird (Peipp et al. 2008). Ursächlich dafür ist vermutlich, dass eine gesteigerte Affinität zu Fc $\gamma$ R11a

durch einen geringen Fucosegehalt auf Neutrophilen zu einer Bindung an die sehr homologe Isoform FcγRIIIb führt (Gessner et al. 1995). Dieser ist über eine Glykosylphosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran fixiert und besitzt keine eigene Signalisierungsdomäne (van Sorge et al. 2003). Das tatsächliche zytotoxische Potential und die Funktion dieses Rezeptors sind noch nicht eindeutig geklärt (van Sorge et al. 2003; Derer et al. 2014). Durch eine gleichzeitig gesteigerte Affinität von Antikörpern zu FcγRIIa konnte, die durch Neutrophile vermittelte Zytotoxizität wiederhergestellt werden (Derer et al. 2014). Somit muss im Weiteren geklärt werden, ob der afucosylierte CD19-EFTAE-Lec13 durch die enthaltene Aminosäuresubstitution EFTAE, für die eine gesteigerte Affinität zu FcγRIIa gezeigt wurde, im Einzelnen zu einer Aktivierung von Neutrophilen in der Lage ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, einen Antikörper mit gleichzeitig gesteigerter CDC- als auch ADCC-Aktivität zu generieren. Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, wie sich Komplement- und Fcγ-vermittelte Effekte als Effektormechanismus gegenseitig beeinflussen. Einerseits konnte für Komplementaktivierung durch therapeutische Antikörper eine negative Beeinflussung der NK-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden (Wang et al. 2008; Wang et al. 2009; Pievani et al. 2011). Somit ist fraglich, ob eine simultane Optimierung eines Antikörpers für CDC und ADCC überhaupt von Vorteil ist. Auf der anderen Seite wurde für Komplementaktivierung durch Antikörper auch ein verstärkender Effekt von Effektorzell-vermittelter Lyse der Tumorzellen gefunden (Elvington et al. 2012; Lee et al. 2017; Mamidi et al. 2015). So kommt es bei Aktivierung der Komplementkaskade durch Antikörper im Verlauf an der Zelloberfläche der Zielzelle zur Bildung von C3b oder C4b. Diese Opsonine werden von Komplementrezeptoren auf Effektorzellen gebunden und führen zu deren Aktivierung sowie zur Induktion von CDCC oder CDCP (Dunkelberger und Song 2010; Lee et al. 2017). Darüber hinaus kann die Bindung des Komplementrezeptor einer Effektorzelle an tumorzellassoziertes C3b zu einer stärkeren Interaktion des Fcγ-Rezeptors an einen Antikörper gebunden an diese Tumorzelle führen und so ADCC verstärken (Gelderman et al. 2004). Auf diese Art kann ein Antikörper, der auch in der Lage ist das Komplementsystem zu aktivieren, zu einer ausgeprägteren Aktivierung von Effektorzellen und so möglicherweise zu höherer zytotoxischer Aktivität führen. Aus den hier gewonnenen Ergebnissen kann der Optimierung des CD19-Antikörpers für CDC im Rahmen der durchgeführten Versuche zur autologen B-Zell-Depletion weder ein störender, noch ein verstärkender Effekt zugeschrieben werden, da sich die doppelt optimierte Variante sowie die für ADCC optimierte Variante in ihrer Effizienz kaum unterscheiden. Somit ist nach diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass eine gesteigerte Affinität zu C1q in diesem Rahmen die Aktivierung von Effektorzellen weder positiv noch negativ beeinflusst.

## 4.2 CD19 als Zielstruktur für Fc-optimierte Antikörper

Bei CD19 handelt es sich aufgrund seiner eingangs beschriebene Eigenschaften um ein sehr attraktives Zielantigen zur Therapie von Neoplasien, die aus B-Lymphozyten hervorgehen. Die im Moment sicherlich vielversprechendste Therapie mit CD19 als Zielstruktur stellt die T-Zell-basierte Immuntherapie in Form von BiTE-Molekülen wie Blinatumomab oder CAR T-Zellen dar. Diese beiden Therapieformen wurden in der letzten Zeit mit großem klinischem Erfolg zur Therapie von Leukämien und Lymphomen eingesetzt (Martinelli et al. 2017; Schuster et al. 2017). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass diese Therapieformen durch die Rekrutierung von T-Zellen gleichzeitig mit einigen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind. So wurde im Rahmen der Therapie mit Blinatumomab und insbesondere mit CAR T-Zellen das Auftreten von teilweise lebensbedrohlichen Zytokin-Freisetzungssyndromen und Enzephalopathien beschrieben (Lee et al. 2015; Maude et al. 2014; Topp et al. 2015). Darüber hinaus kann die dauerhafte, unkontrollierte Persistenz von CAR T-Zellen im Patienten möglicherweise zu einer anhaltenden B-Zell Aplasie und so zu einer Suppression des Immunsystems führen (Maude und Barrett 2016). Grund dafür ist die Unfähigkeit der genetisch veränderten Zellen, zwischen gesunden B-Zellen und Tumorzellen zu differenzieren. Zudem besitzt Blinatumomab wegen der geringen Molekülmasse von 54 kDa eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit von ca. zwei Stunden (Zhu et al. 2016). Dies macht eine für den Patienten belastende Gabe als Dauerinfusion über mehrere Wochen notwendig. Dagegen weisen komplette, Fc-optimierte IgG1 Antikörper, wie sie im Rahmen dieser Arbeit evaluiert wurden, einige Vorteile auf. Aufgrund ihrer Masse von ca. 160 kDa zeigen sie eine deutlich längere Plasmahalbwertszeit und sind dadurch vergleichsweise einfach in der Applikation. Zudem sind sie je nach den gegebenen Bedingungen in der Lage, verschiedene Effektoren zu aktivieren und so eine effiziente Elimination der Tumorzellen zu erreichen. Insgesamt weisen Fc-optimierte Antikörper eine gute Verträglichkeit auf und so wurde im Rahmen verschiedener klinischer Studien mit Fc-optimierten CD19-Antikörpern von wenigen, eher milden Nebenwirkungen berichtet (Seidel et al. 2016; Woyach et al. 2014). Daher stellen Fc-optimierte CD19-Antikörper eine potentielle und vielversprechende Alternative zu BiTEs oder CAR T-Zellen dar. Ob sie ähnliche klinische Effizienz zeigen und ob damit eine vergleichbar langfristige Tumorkontrolle wie mit Blinatumomab oder CAR T-Zellen erreicht werden kann, muss noch ermittelt werden. Im Rahmen der Therapie mit Blinatumomab und CAR T-Zellen wurde des Weiteren von einem CD19-Antigenverlust und daraus resultierendem Therapieversagen in Patienten mit B-ALL berichtet (Braig et al. 2017; Maude et al. 2014). Zu dieser mangelnden Antigenexpression kommt es durch Herunterregulierung der CD19-Expression, Verlust des CD19-Epitops oder durch Heranwachsen CD19-negativer Tumorsubklone. Inwieweit dies auch bei der Therapie mit Fc-optimierten Antikörpern auftritt, muss noch im Detail geklärt werden. Für einen Fc-optimierten CD19-Antikörper mit gesteigerter ADCC-Aktivität konnte *in vitro* eine Modulation

der CD19-Expression auf leukämischen Blasten gezeigt werden (Seidel et al. 2016). Eine Möglichkeit um diese Therapielimitierung durch den Verlust der Expression des Zielantigens zu umgehen, könnte die kombinierte oder sequentielle Gabe von zwei Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität sein. So kann die Therapie mit Fc-optimierten CD19-Antikörpern mit der Gabe von Antikörpern gegen andere Zielstrukturen auf B-Lymphozyten wie CD22, CD38 oder CD52 kombiniert werden. Denkbar ist somit beispielsweise eine zusätzliche Gabe von Epratuzumab, einem Antikörper gegen CD22, oder von dem CD52-gerichteten Antikörper, Alemtuzumab (Farhadfar und Litzow 2016).

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Fc-optimierte CD19-Antikörper generiert und in *in vitro* Studien vergleichend charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von etablierten Strategien des Fc-Engineering auch bei Antikörpern wie dem nativen CD19 IgG1 Antikörper mit ursprünglich sehr geringer Zytotoxizität zu einer Steigerung der ADCC- und CDC-Aktivität führt. Zudem wurde ein Antikörper generiert, der durch Kombinieren von Protein- und Glyko-Engineering in einem Molekül simultan gesteigerte ADCC- als auch CDC-Induktion gegenüber Tumorzellen aufweist. Dies kann für einen potentiellen klinischen Einsatz von großem Interesse sein und soll in weiteren *in vivo* Experimenten genauer untersucht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Für Fc-vermittelte Effektormechanismen, wie die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), konnte mit Daten aus zahlreichen Tiermodellen sowie klinische Studien die große Bedeutung für die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper gezeigt werden. Um die Wirksamkeit dieser klinisch eingesetzten Antikörper weiter zu optimieren, wird durch Modifizieren der Fc-Domäne versucht, die Bindung an Fc-Rezeptoren und Komplementfaktoren zu verbessern, um so die ADCC- und CDC-Aktivität der Antikörper zu erhöhen. Zur Steigerung der Zytotoxizität kann sowohl die Aminosäuresequenz (sog. Protein-Engineering) als auch die Glykosylierung (sog. Glyko-Engineering) der Fc-Domäne eines Antikörpers verändert werden. Bisher wurden in der Regel Fc-optimierte Antikörper beschrieben, die entweder eine gesteigerte CDC- oder ADCC-Aktivität aufwiesen, nicht jedoch eine simultane Optimierung beider Wirkmechanismen. Insbesondere für Antikörper mit Spezifität für das B-Lymphozyten spezifische CD19, eine attraktive Zielstruktur für die Therapie von akuter lymphatischer Leukämie, stellt das Fc-Engineering eine attraktive Möglichkeit dar, da der native IgG1 CD19-Antikörper kaum ADCC oder CDC gegenüber Tumorzellen vermittelt.

So wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Fc-optimierte CD19-Antikörper und ein IgG1 CD19-Antikörper charakterisiert und hinsichtlich ihrer *in vitro* Zytotoxizität vergleichend analysiert. Dazu wurde neben einem Antikörper mit der Fünffach-Aminosäuresubstitution EFTAE (S267E/H268F/S324T/G236A/I332E) zur Steigerung der CDC (CD19-EFTAE-CHO), eine afucosylierte Variante des IgG1 CD19-Antikörpers zur Steigerung der ADCC verwendet (CD19-wt-Lec13). In dem Versuch einen Antikörper mit simultan gesteigerter ADCC und CDC zu erzeugen, wurde weiterhin eine afucosylierte Variante des Antikörpers mit der EFTAE-Substitution generiert (CD19-EFTAE-Lec13). Ferner wurde ein weiterer Protein-optimierter Antikörper mit der zweifachen Aminosäuresubstitution DE (S239D/I332E) zur Steigerung der Bindung an FcγRIII (CD19-DE-CHO) und dessen afucosylierte, glyko-optimierte Variante (CD19-DE-Lec13) hergestellt. Fucosylierte Antikörper wurden in CHO-K1 Zellen und die entsprechenden afucosylierten Varianten in Lec13 Zellen exprimiert. Über Lektin-Blots wurde der unterschiedliche Fucose-Gehalt der verschiedenen Antikörper nachgewiesen. Die verschiedenen Fc-optimierten CD19-Antikörper wiesen alle eine spezifische Bindung mit identischer Affinität für das Zielantigen CD19 auf. In Zytotoxizitätsexperimenten mit humanem Plasma oder mononukleären Zellen als Effektorquelle war der IgG1 CD19-Antikörper nicht in der Lage, effektiv CDC oder ADCC gegenüber Tumorzellen zu vermitteln. Im Vergleich dazu zeigten afucosylierte CD19-Antikörper eine gesteigerte Bindung an FcγRIII, resultierend in einer deutlich höheren ADCC-Aktivität. Des Weiteren konnte durch die Einführung der EFTAE-Substitution unabhängig vom Fucose-Gehalt der Antikörper durch eine gesteigerte Affinität für

den Komplementfaktor C1q eine Lyse mittels CDC beobachtet werden. Die doppelt optimierte CD19-Antikörpervariante ohne Fucose und mit der EFTAE-Substitution (CD19-EFTAE-Lec13) wies sowohl gesteigerte ADCC- als auch CDC-Aktivität gegenüber verschiedenen Lymphom-Zelllinien auf. In einem Versuchsansatz zur autologen B-Zell-Depletion mit humanem Vollblut, in dem gleichzeitig sowohl Komplementfaktoren als auch verschiedene Effektorzellen vorhanden waren, zeigte sich sowohl für die doppelt optimierte (CD19-EFTAE-Lec13), als auch für die rein glyko-optimierte, afucosylierten Antikörpervariante (CD19-wt-Lec13) im Vergleich zum IgG1 CD19-Antikörper und zum rein Protein-optimierten Antikörper eine deutlich gesteigerte Depletion an B-Zellen. So wiesen der glyko-optimierte Antikörper mit gesteigerter ADCC-Aktivität und der doppelt optimierte Antikörper in diesem Versuchsaufbau B-Zell-Depletionsraten zwischen 40-60% auf.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit deutlich, dass Antikörper mit ursprünglich sehr geringer Zytotoxizität wie der IgG1 CD19-Antikörper durch die Anwendung etablierter Fc-Engineering-Strategien in der Lage sind, ADCC und CDC zu vermitteln. Zudem ist es durch das Kombinieren von Protein- und Glyko-Engineering möglich, Antikörper mit gleichzeitig gesteigerter ADCC- als auch CDC-Aktivität zu generieren. Dieser Ansatz stellt eine attraktive Strategie dar, Antikörper mit optimierten Wirkmechanismen zu entwickeln und so die Behandlung von Lymphomen und Leukämien mit therapeutischen Antikörpern weiter zu verbessern.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Albanesi, M., Mancardi, D. A., Jönsson, F., Iannascoli, B., Fiette, L., Di Santo, J. P., Lowell, C. A., Bruhns, P. (2013): Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood*, 122, 3160–3164.

Aldoss, I., Bargou, R. C., Nagorsen, D., Friberg, G. R., Baeuerle, P. A., Forman, S. J. (2017): Redirecting T cells to eradicate B-cell acute lymphoblastic leukemia: bispecific T-cell engagers and chimeric antigen receptors. *Leukemia*, 31, 777–787.

Amersdorffer, J., Steidl, S., Winderlich, M., Krohn, S., Rojkjaer, L. (2012): Combination therapy with an anti-CD19 antibody and a purine analog. US patent 20140227277 A1. 14. August 2012.

Ando, M., Nagata, K., Nihira, K., Suzuki, Y., Kanda, Y., Adachi, M., Kubota, T., Kameyama, N., Nakano, M., Ando, H., Yamano, K., Ishii, T., Nakai, R., Nakamura, K. (2017): Potent therapeutic activity against peritoneal dissemination and malignant ascites by the novel anti-folate receptor alpha antibody KHK2805. *Transl. Oncol.*, 10, 707–718.

Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., Dwek, R. A. (2007): The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 21-50.

Baum, H. (2013): Differentialblutbild. In: Gressner, A. M., Arndt, T. (Hrsg.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 2. Auflage, S. 400, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Boross, P., Jansen, J. H. M., de Haij, S., Beurskens, F. J., van der Poel, C. E., Bevaart, L., Nederend, M., Golay, J., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Leusen, J. H. W. (2011): The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica*, 96, 1822–1830.

Bradbury, L. E., Kansas, G. S., Levy, S., Evans, R. L., Tedder, T. F. (1992): The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J. Immunol.*, 149, 2841–2850.

Braig, F., Brandt, A., Goebeler, M., Tony, H.-P., Kurze, A.-K., Nollau, P., Bumm, T., Böttcher, S., Bargou, R. C., Binder, M. (2017): Resistance to anti-CD19/CD3 BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking. *Blood*, 129, 100–104.

Brinkmann, U., Kontermann, R. E. (2017): The making of bispecific antibodies. *mAbs*, 9, 182–212.

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

Capietto, A.-H., Martinet, L., Fournié, J.-J. (2011): Stimulated γδ T cells increase the in vivo efficacy of Trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J. Immunol.*, 187, 1031–1038.

Carol, H., Szymanska, B., Evans, K., Boehm, I., Houghton, P. J., Smith, M. A., Lock, R. B. (2013): The anti-CD19 antibody-drug conjugate SAR3419 prevents hematolymphoid relapse postinduction therapy in preclinical models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 19, 1795–1805.



- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H. (2002): Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99, 754–758.
- Cheson, B. D. (2006): Monoclonal antibody therapy for B-cell malignancies. *Semin. Oncol.*, 33 (Suppl 5), 2–14.
- Ciardiello, F., Tortora, G. (2008): EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.*, 358, 1160–1174.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Winter, G. (1991): Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352, 624–628.
- Clark, M. R. (1997): IgG effector mechanisms. *Chem. Immunol.*, 65, 88–110.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6, 443–446.
- Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D. J. (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.*, 17, 2639–2648.
- Cragg, M. S., Glennie, M. J. (2004): Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*, 103, 2738–2743.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Piantaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., Thibault, G. (2004): Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: Influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.*, 64, 4664–4669.
- Davis, T. A., Czerwinski, D. K., Levy, R. (1999): Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin. Cancer Res.*, 5, 611–615.
- Derer, S., Glorius, P., Schlaeth, M., Lohse, S., Klausz, K., Muchhal, U., Desjarlais, J. R., Humpe, A., Valerius, T., Peipp, M. (2014): Increasing FcγRIIIa affinity of an FcγRIII-optimized anti-EGFR antibody restores neutrophil-mediated cytotoxicity. *mAbs*, 6, 409–421.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., Golay, J. (2003): Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.*, 171, 1581–1587.
- Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B., Brenner, M. K. (2014): Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol. Rev.*, 257, 107–126.
- Dunkelberger, J. R., Song, W.-C. (2010): Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.*, 20, 34–50.
- Edelman, G. M. (1973): Antibody structure and molecular immunology. *Science*, 180, 830–840.
- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., Waxdal, M. J. (1969): The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 78–85.

- Ehrlich, P. (1900): Croonian lecture: On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond.*, 66, 424–448.
- Elvington, M., Huang, Y., Morgan, B. P., Qiao, F., van Rooijen, N., Atkinson, C., Tomlinson, S. (2012): A targeted complement-dependent strategy to improve the outcome of mAb therapy, and characterization in a murine model of metastatic cancer. *Blood*, 119, 6043–6051.
- Etzler, M. E. (1985): Plant lectins: Molecular and biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36, 209–234.
- Farhadfar, N., Litzow, M. R. (2016): New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 49, 13-21.
- Fathi, A. T., Borate, U., DeAngelo, D. J., O'Brien, M. M., Trippett, T., Shah, B. D., Hale, G. A., Foran, J. M., Silverman, L. B., Tibes, R., Cramer, S., Pauly, M., Kim, S., Kostic, A., Huang, X., Pan, Y., Chen, R. (2015): A phase 1 study of Denintuzumab Mafodotin (SGN-CD19A) in adults with relapsed or refractory B-lineage acute leukemia (B-ALL) and highly aggressive lymphoma. *Blood*, 126, 1328.
- Feige, M. J., Nath, S., Catharino, S. R., Weinfurtner, D., Steinbacher, S., Buchner, J. (2009): Structure of the murine unglycosylated IgG1 Fc fragment. *J. Mol. Biol.*, 391, 599–608.
- Ferrara, C., Grau, S., Jäger, C., Sondermann, P., Brünker, P., Waldhauer, I., Hennig, M., Ruf, A., Rufer, A. C., Stihle, M., Umaña, P., Benz, J. (2011): Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 12669–12674.
- Forero-Torres, A., Hamadani, M., Fanale, M. A., Bello, C. M., Kipps, T. J., Offner, F., Verhoef G, Federico M, Gregory, S. A., Sonet, A., Assouline, S., de Oteyza, J. P., Tomas, J. F., Cuneo, A., Elgeiوشي, N., Goswami, T., Ibrahim, R., Herbst, R., Cheson, B. D. (2013): Safety profile and clinical response to MEDI-551, a humanized monoclonal anti-CD19, in a Phase 1/2 study in adults with relapsed or refractory advanced B-cell malignancies. *Blood*, 122, 1810.
- Gelderman, K. A., Tomlinson, S., Ross, G. D., Gorter, A. (2004): Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.*, 25, 158–164.
- Gessner, J. E., Grussenmeyer, T., Kolanus, W., Schmidt, R. E. (1995): The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and III-B genes. Molecular characterization of the promoter regions. *J. Biol. Chem.*, 270, 1350–1361.
- Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S., Taylor, R. P. (2007): Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 44, 3823–3837.
- 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)<sub>2</sub>×CD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. *Leukemia*, 27, 190–201.
- Gökbuget, N. (2015): Aktuelle Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Internist*, 56, 344–353.
- Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Vago, L., Introna, M. (2006): The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica*, 91, 176–183.

- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., Introna, M. (2001): CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: Further regulation by CD55 and CD59. *Blood*, 98, 3383–3389.
- Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W. P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W. Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., Wu, Y., Meng, Y. G., Gribling, P., Lin, Z., Nguyen, K., Tran, T., Zhang, Y., Rosen, H., Martin, F., Chan, A. C. (2005): Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J. Immunol.*, 174, 817–826.
- Greaves, M. (2016): Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment. *Nat. Rev. Cancer*, 16, 163–172.
- Guc, D., Canpinar, H., Kucukaksu, C., Kansu, E. (2000): Expression of complement regulatory proteins CR1, DAF, MCP and CD59 in haematological malignancies. *Eur. J. Haematol.*, 64, 3–9.
- Haas, K. M., Tedder, T. F. (2005): Role of the CD19 and CD21/35 receptor complex in innate immunity, host defense and autoimmunity. In: Gupta, S., Paul, W. E., Steinman, R. (Hrsg.) *Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation X. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Bd. 560, S. 125–139, Springer, Boston, MA.
- Hafeez, U., Gan, H. K., Scott, A. M. (2018): Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 41, 114–121.
- Haider, I., Cahill, M. (2004): Fatal thrombocytopenia temporally related to the administration of alemtuzumab (MabCampath) for refractory CLL despite early discontinuation of therapy. *Hematology*, 9, 409–411.
- de Haij, S., Jansen, J. H. M., Boross, P., Beurskens, F. J., Bakema, J. E., Bos, D. L., Martens, A., Verbeek, J. S., Parren, P. W. H. I., van De Winkel, J. G. J., Leusen, J. H. W. (2010): In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res.*, 70, 3209–3217.
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., George, A. J. T. (2010): The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9, 325–338.
- Herter, S., Birk, M. C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., Bacac, M. (2014): Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J. Immunol.*, 192, 2252–2260.
- Horton, H. M., Bennett, 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. *Cancer Res.*, 68, 8049–8057.
- Hunger, S. P., Mullighan, C. G. (2015): Acute lymphoblastic leukemia in children. *N. Engl. J. Med.*, 373, 1541–1552.
- 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. *J. Immunol.*, 166, 2571–2575.

- Inagaki, A., Ishida, T., Yano, H., Ishii, T., Kusumoto, S., Ito, A., Ri, M., Mori, F., Ding, J., Komatsu, H., Iida, S., Ueda, R. (2009): Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int. J. Cancer*, 125, 212–221.
- Ishii, T., Ishida, T., Utsunomiya, A., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Imada, K., Uchiyama, T., Akinaga, S., Shitara, K., Ueda, R. (2010): Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 16, 1520–1531.
- Jeha, S., Behm, F., Pei, D., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Razzouk, B. I., Rubnitz, J. E., Hijjiya, N., Howard, S. C., Cheng, C., Pui, C. H. (2006): Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 108, 3302–3304.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G. (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 522–525.
- Kantarjian, H. M., Lioure, B., Kim, S. K., Atallah, E., Leguay, T., Kelly, K., Marolleau, J.-P., Escoffre-Barbe, M., Thomas, X. G., Cortes, J., Jabbour, E., O'Brien, S., Bories, P., Oprea, C., Hatteville, L., Dombret, H. (2016): A phase II study of coltuximab ravtansine (SAR3419) monotherapy in patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, 16, 139–145.
- Kaplon, H., Reichert, J. M. (2019): Antibodies to watch in 2019. *mAbs*, 11, 219–238.
- Kellner, C., Peipp, M. (2013): Engineered antibody derivatives in preclinical and clinical development. In: Nimmerjahn, F. (Hrsg.) *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity*, S. 251–284, Springer, New York, NY.
- Kellner, C., Derer, S., Valerius, T., Peipp, M. (2014): Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods*, 65, 105–113.
- Kellner, C., Otte, A., Cappuzzello, E., Klausz, K., Peipp, M. (2017): Modulating cytotoxic effector functions by Fc engineering to improve cancer therapy. *Transfus. Med. Hemother.*, 44, 327–336.
- 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. *Leukemia*, 27, 1595–1598.
- Kelton, W., Mehta, N., Charab, W., Lee, J., Lee, C.-H., 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. *Chem. Biol.*, 21, 1603–1609.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. S., Mumford, D. (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*, 5, 319–334.
- Klepfish, A., Gilles, L., Ioannis, K., Eliezer, R., Ami, S. (2009): Enhancing the action of rituximab in chronic lymphocytic leukemia by adding fresh frozen plasma: Complement/rituximab interactions & clinical results in refractory CLL. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1173, 865–873.

- Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A. E. G. Kr., de Haas, M. (1997): FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*, 90, 1109–1114.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495–497.
- Kontermann, R. E., Brinkmann, U. (2015): Bispecific antibodies. *Drug Discov. Today*, 20, 838–847.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E. L., Schlossman, S. F. (1979): Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, 206, 347–349.
- Lamb, Y. N. (2017): Inotuzumab Ozogamicin: First Global Approval. *Drugs*, 77, 1603–1610.
- Lang, P., Barbin, K., Feuchtinger, T., Greil, J., Peipp, M., Zunino, S. J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Niethammer, D., Fey, G. H. (2004): Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood*, 103, 3982–3985.
- Lanzavecchia, A., Corti, D., Sallusto, F. (2007): Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 523–528.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 4005–4010.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., Allison, J. P. (1996): Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734–1736.
- Lee, C.-H., Romain, G., Yan, W., Watanabe, M., Charab, W., Todorova, B., Lee, J., Triplett, K., Donkor, M., Lungu, O. I., Lux, A., Marshall, N., Lindorfer, M. A., Goff, O. R.-L., Balbino, B., Kang, T. H., Tanno, H., Delidakis, G., Alford, C., Taylor, R. P., Nimmerjahn, F., Varadarajan, N., Bruhns, P., Zhang, Y. J., Georgiou, G. (2017): IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions. *Nat. Immunol.*, 18, 889–898.
- Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., Fry, T. J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N. N., Steinberg, S. M., Stroncek, D., Tschernia, N., Yuan, C., Zhang, H., Zhang, L., Rosenberg, S. A., Wayne, A. S., Mackall, C. L. (2015): T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 385, 517–528.
- Lee, H.-Z., Miller, B. W., Kwitkowski, V. E., Ricci, S., Del Valle, P., Saber, H., Grillo, J., Bullock, J., Florian, J., Mehrotra, N., Ko, C.-W., Nie, L., Shapiro, M., 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. *Clin. Cancer Res.*, 20, 3902–3907.
- Lonberg, N. (2005): Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.*, 23, 1117–1125.
- Magnes, T., Melchardt, T., Hufnagl, C., Weiss, L., Mittermair, C., Neureiter, D., Klieser, E., Rinnerthaler, G., Roesch, S., Gaggl, A., Greil, R., Egle, A. (2018): The influence of FCGR2A

and FCGR3A polymorphisms on the survival of patients with recurrent or metastatic squamous cell head and neck cancer treated with cetuximab. *Pharmacogenomics J.*, 18, 474–479.

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's lymphoma. *Blood*, 90, 2188–2195.

Mamidi, S., Höne, S., Teufel, C., Sellner, L., Zenz, T., Kirschfink, M. (2015): Neutralization of membrane complement regulators improves complement-dependent effector functions of therapeutic anticancer antibodies targeting leukemic cells. *Oncoimmunology*, 43, e979688-1–12.

Martinelli, G., Boissel, N., Chevallier, P., Ottmann, O., Gökbuget, N., Topp, M. S., Fielding, A. K., Rambaldi, A., Ritchie, E. K., Papayannidis, C., Sterling, L. R., Benjamin, J., Stein, A. (2017): Complete hematologic and molecular response in adult patients with relapsed/refractory Philadelphia Chromosome–positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia following treatment with Blinatumomab: Results from a phase II, single-arm, multicenter study. *J. Clin. Oncol.*, 35, 1795–1802.

Masir, N., Marafioti, T., Jones, M., Natkunam, Y., Rüdiger, T., Hansmann, M.-L., Mason, D. Y. (2006): Loss of CD19 expression in B-cell neoplasms. *Histopathology*, 48, 239–246.

Matlawska-Wasowska, K., Ward, E., Stevens, S., Wang, Y., Herbst, R., Winter, S. S., Wilson, B. S. (2013): Macrophage and NK-mediated killing of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells targeted with a-fucosylated anti-CD19 humanized antibodies. *Leukemia*, 27, 1263–1274.

Maude, S. L., Barrett, D. M. (2016): Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br. J. Haematol.*, 172, 11–22.

Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., Grupp, S. A. (2014): Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 371, 1507–1517.

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

Meyer, S., Leusen, J. H. W., Boross, P. (2014): Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *mAbs*, 6, 1133–1144.

Moore, G. L., Chen, H., Karki, S., Lazar, G. A. (2010): Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs*, 2, 181–189.

Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., Oi, V. T. (1984): Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 6851–6855.

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., Dabbagh, 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. *Blood*, 115, 4393–4402.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M., Ardizzoni, A. (2008): Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 26, 1789–1796.
- Nadler, L. M., Anderson, K. C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J. F., Schlossman, S. F. (1983): B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.*, 131, 244–250.
- Naso, M. F., Tam, S. H., Scallon, B. J., Raju, T. S. (2010): Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *mAbs*, 2, 519–527.
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., Niwa, R. (2008): Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res.*, 68, 3863–3872.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J. V. (2005): Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310, 1510–1512.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J. V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 34–47.
- Norin, S., Björkstrand, B., Rommel, F., Timberg, L., Andersson, P.-O., Häggström, J., Aldrin, A., Hansson, L. (2015): Severe infusion-related reactions are uncommon in rituximab-treated CLL patients in clinical practice: Results from a Swedish national observational study. *Leuk. Res.*, 39, 33–37.
- Nowbakht, P., Ionescu, M.-C. S., Rohner, A., Kalberer, C. P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G., Wodnar-Filipowicz, A. (2005): Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*, 105, 3612–3622.
- O’Leary, M. C., Lu, X., Huang, Y., Lin, X., Mahmood, I., Przepiorka, D., Gavin, D., Lee, S., Liu, K., George, B., Bryan, W., Theoret, M. R., Pazdur R. (2019): FDA approval summary: Tisagenlecleucel for treatment of patients with relapsed or refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 25, 1142–1146.
- Padlan, E. A. (1994): Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.*, 31, 169–217.
- Park, C. Y., Tseng, D., Weissman, I. L. (2009): Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol. Ther.*, 17, 219–230.
- Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D. J., Kang, X. (2009): Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int. J. Oncol.*, 34, 25–32.
- Paz-Ares, L. G., Gomez-Roca, C., Delord, J. P., Cervantes, A., Markman, B., Corral, J., Soria, J.-C., Bergé, Y., Roda, D., Russell-Yarde, F., Hollingsworth, S., Baselga, J., Umana, P., Manenti, L., Tabernero, J. (2011): Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 29, 3783–3790.

- Peipp, M., Lammerts van Bueren, J. J., Schneider-Merck, T., Bleeker, W. W. K., Dechant, M., Beyer, T., Repp, R., van Berkel, P. H. C., Vink, T., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Valerius, T. (2008): Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*, 112, 2390–2399.
- Persky, D. O., Dornan, D., Goldman, B. H., Braziel, R. M., Fisher, R. I., LeBlanc, M., Maloney, D. G., Press, O. W., Miller, T. P., Rimsza, L. M. (2012): Fc gamma receptor 3a genotype predicts overall survival in follicular lymphoma patients treated on SWOG trials with combined monoclonal antibody plus chemotherapy but not chemotherapy alone. *Haematologica*, 97, 937–942.
- Pievani, A., Belussi, C., Klein, C., Rambaldi, A., Golay, J., Introna, M. (2011): Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies. *Blood*, 117, 510–518.
- Porter, R. R. (1973): Structural studies of immunoglobulins. *Science*, 180, 713–716.
- Preithner, S., Elm, S., Lippold, S., Locher, M., Wolf, A., da Silva, A. J., Baeuerle, P. A., Prang, N. S. (2006): High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol. Immunol.*, 43, 1183–1193.
- Press, O. W., Farr, A. G., Borroz, K. I., Anderson, S. K., Martin, P. J. (1989): Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res.*, 49, 4906–4912.
- Pulte, E. D., Vallejo, J., Przepiorcka, D., Nie, L., Farrell, A. T., Goldberg, K. B., McKee, A. E., Pazdur, R. (2018): FDA supplemental approval: Blinatumomab for treatment of relapsed and refractory precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncologist*, 23, 1366–1371.
- Pulvertaft, R. J. V. (1964): Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*, 283, 238–240.
- Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Tackenberg, B., Wang, L.-X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M. C., Lünemann, J. D. (2015): Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J. Clin. Invest.*, 125, 4160–4170.
- Ramos, C. A., Savoldo, B., Dotti, G. (2014): CD19-CAR trials. *Cancer J.*, 20, 112–118.
- Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., Anderson, D. R. (1994): Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83, 435–445.
- Renz, H., Gierten, B. (2013): CD16/56. In: Gressner, A. M., Arndt, T. (Hrsg.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 2. Auflage, S. 310–311, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Repp, R., Kellner, C., Muskulus, A., Staudinger, M., Mohseni Nodehi, S., Glorius, P., Akramiene, D., Dechant, M., Fey, G. H., van Berkel, P. H. C., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Valerius, T., Gramatzki, M., Peipp, M. (2011): Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *J. Immunol. Methods*, 373, 67–78.
- Ripka, J., Adamany, A., Stanley, P. (1986): Two chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Arch. Biochem. Biophys.*, 249, 533–545.



- Rösner, T., Derer, S., Kellner, C., Dechant, M., Lohse, S., Vidarsson, G., Peipp, M., Valerius, T. (2013): An IgG3 switch variant of rituximab mediates enhanced complement-dependent cytotoxicity against tumour cells with low CD20 expression levels. *Br. J. Haematol.*, 161, 282–286.
- Rothe, G. (2007): Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (Hrsg.) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, S. 27–70, Karger, Basel.
- Rothe, G., Schmitz, G. (1996): Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working group on flow cytometry and image analysis. *Leukemia*, 10, 877–895.
- Sato, S., Steeber, D. A., Jansen, P. J., Tedder, T. F. (1997): CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: Human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J. Immunol.*, 158, 4662–4669.
- Scheuermann, R. H., Racila, E. (1995): CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk. Lymphoma*, 18, 385–397.
- 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. *Blood*, 130, 1543–1552.
- Schrappe, M., Valsecchi, M. G., Bartram, C. R., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Moricke, A., Parasole, R., Zimmermann, M., Dworzak, M., Buldini, B., Reiter, A., Basso, G., Klingebiel, T., Messina, C., Ratei, R., Cazzaniga, G., Koehler, R., Locatelli, F., Schäfer, B. W., Aricò, M., Welte, K., van Dongen, J. J. M., Gadner, H., Biondi, A., Conter, V. (2011): Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*, 118, 2077–2084.
- Schriever, F., Freedman, A. S., Freeman, G., Messner, E., Lee, G., Daley, J., Nadler, L. M. (1989): Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J. Exp. Med.*, 169, 2043–2058.
- Schroeder, H. W., Cavacini, L., (2010): Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125, 41–52.
- Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, Ö., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., June, C. H. (2017): Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.*, 377, 2545–2554.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., Old, L. J. (2012): Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 278–287.
- Scott, L. J. (2017): Brentuximab Vedotin: A review in CD30-positive Hodgkin lymphoma. *Drugs*, 77, 435–445.
- Seidel, U. J. E., Schlegel, P., Grosse-Hovest, L., Hofmann, M., Aulwurm, S., Pyz, E., Schuster, F. R., Meisel, R., Ebinger, M., Feuchtinger, T., Teltschik, H.-M., Witte, K.-E., Schwarze, C.-P., Rammensee, H.-G., Handgretinger, R., Jung, G., Lang, P. (2016): Reduction of minimal residual disease in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia by an Fc-optimized CD19 antibody. *Mol. Ther.*, 24, 1634–1643.

- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., Staudt, L. M. (2002): Lymphoid malignancies: The dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 920–932.
- Shan, D., Ledbetter, J. A., Press, O. W. (1998): Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*, 91, 1644–1652.
- Shawler, D. L., Bartholomew, R. M., Smith, L. M., Dillman, R. O. (1985): Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J. Immunol.*, 135, 1530-1535.
- 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 FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277, 26733–26740.
- Siders, W. M., Shields, J., Garron, C., Hu, Y., Boutin, P., Shankara, S., Weber, W., Roberts, B., Kaplan, J. M. (2010): Involvement of neutrophils and natural killer cells in the anti-tumor activity of alemtuzumab in xenograft tumor models. *Leuk. Lymphoma*, 51, 1293–1304.
- Smith, S. L. (1996): Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J. Transpl. Coord.*, 6, 109–119.
- Strebhardt, K., Ullrich, A. (2008): Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer*, 8, 473–480.
- Strohl, W. R. (2018): Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell*, 9, 86–120.
- Strohl, W. R. (2009): Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20, 685–691.
- Suzuki, E., Niwa, R., Saji, S., Muta, M., Hirose, M., Iida, S., Shiotsu, Y., Satoh, M., Shitara, K., Kondo, M., Toi, M. (2007): A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 13, 1875–1882.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th Edition, International Agency for Research of Cancer, Lyon.
- Tao, M.-H., Morrison, S. L. (1989): Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.*, 143, 2595–2601.
- Tedder, T. F., Isaacs, C. M. (1989): Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.*, 143, 712–717.
- Tedder, T. F., Zhou, L.-J., Engel, P. (1994): The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol. Today*, 15, 437–442.
- Thomann, M., Reckermann, K., Reusch, D., Prasser, J., Tejada, M. L. (2016): Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Mol. Immunol.*, 73, 69–75.
- Thomas, A., Teicher, B. A., Hassan, R. (2016): Antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol.*, 17, e254–e262.

- Tiacci, E., Liso, A., Piris, M., Falini, B. (2006): Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 437–448.
- Topp, M. S., Gökbuget, N., Stein, A. S., Zugmaier, G., O'Brien, S., Bargou, R. C., Dombret, H., Fielding, A. K., Heffner, L., Larson, R. A., Neumann, S., Foà, R., Litzow, M., Ribera, J. M., Rambaldi, A., Schiller, G., Brüggemann, M., Horst, H. A., Holland, C., Jia, C., Maniar, T., Huber, B., Nagorsen, D., Forman, S. J., Kantarjian, H. M. (2015): Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: A multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.*, 16, 57–66.
- Trempe, G. L. (1976): Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res.*, 57, 33–41.
- Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J. A., Ravetch, J. V., Poe, J. C., Haas, K. M., Tedder, T. F. (2004): The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor–dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 199, 1659–1669.
- Uckun, F. M., Jaszcz, W., Ambrus, J. L., Fauci, A. S., Gajl-Peczalska, K., Song, C. W., Wick, M. R., Myers, D. E., Waddick, K., Ledbetter, J. A. (1988): Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood*, 71, 13–29.
- van der Heijden, J., Breunis, W. B., Geissler, J., de Boer, M., van den Berg, T. K., Kuijpers, T. W. (2012): Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J. Immunol.*, 188, 1318–1324.
- van Sorge, N. M., van der Pol, W.-L., van de Winkel, J. G. J. (2003): FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue antigens*, 61, 189–202.
- Velasquez, M. P., Bonifant, C. L., Gottschalk, S. (2018): Redirecting T cells to hematological malignancies with bispecific antibodies. *Blood*, 131, 30–38.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T. (2014): IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.*, 5, 520.
- Wang, K., Wei, G., Liu, D. (2012): CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp. Hematol. Oncol.*, 1, 36.
- Wang, S.-Y., Racila, E., Taylor, R. P., Weiner, G. J. (2008): NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*, 111, 1456–1463.
- Wang, S.-Y., Veeramani, S., Racila, E., Cagley, J., Fritzing, D. C., Vogel, C. W., St John, W., Weiner, G. J. (2009): Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood*, 114, 5322–5330.
- Weiner, G. J. (2015): Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Cancer*, 15, 361–370.
- Weiskopf, K., Weissman, I. L. (2015): Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *mAbs*, 7, 303–310.

- Weng, W.-K., Levy, R. (2003): Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 21, 3940–3947.
- Wirt, T., Roskopf, S., Rösner, 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. *Transfus. Med. Hemother.*, 44, 292–300.
- Woof, J. M., Burton, D. R. (2004): Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 89-99.
- Woyach, J. A., Awan, F., Flinn, I. W., Berdeja, J. G., Wiley, E., Mansoor, S., Huang, Y., Lozanski, G., Foster, P. A., Byrd, J. C. (2014): A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL. *Blood*, 124, 3553–3560.
- Xu, W., Miao, K.-R., Zhu, D.-X., Fang, C., Zhu, H.-Y., Dong, H.-J., Wang, D.-M., Wu, Y.-J., Qiao, C., Li, J.-Y. (2011): Enhancing the action of rituximab by adding fresh frozen plasma for the treatment of fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer*, 128, 2192–2201.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.*, 87, 614–622.
- Yu, X., Marshall, M. J. E., Cragg, M. S., Crispin, M. (2017): Improving antibody-based cancer therapeutics through glycan engineering. *BioDrugs*, 31, 151–166.
- Yuraszeck, T., Kasichayanula, S., Benjamin, J. E. (2017): Translation and clinical development of bispecific T-cell engaging antibodies for cancer treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 101, 634–645
- Zafir-Lavie, I., Michaeli, Y., Reiter, Y. (2007): Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*, 26, 3714–3733.
- Zalevsky, J., Leung, I. W. L., Karki, S., Chu, S. Y., Zhukovsky, E. A., Desjarlais, J. R., Carmichael, D. F., Lawrence, C. E. (2009): The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood*, 113, 3735–3743.
- Zhong, H., Fazanbaker, C., Chen, C., Breen, S., Huang, J., Yao, X., Ren, P., Yao, Y., Herbst, R., Hollingsworth, R. E. (2017): Overproduction of IGF-2 drives a subset of colorectal cancer cells, which specifically respond to an anti-IGF therapeutic antibody and combination therapies. *Oncogene*, 36, 797-806.
- Zhu, M., Wu, B., Brandl, C., Johnson, J., Wolf, A., Chow, A., Doshi, S. (2016): Blinatumomab, a bispecific T-cell engager (BiTE®) for CD-19 targeted cancer immunotherapy: Clinical pharmacology and its implications. *Clin. Pharmacokinet.*, 55, 1271–1288.

## 7 WEITERE INFORMATIONSMQUELLEN

### Internetseiten:

Datenbank klinischer Studien

<https://clinicaltrials.gov/>

## 8 ANHANG

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die zeitliche Entwicklung der Antikörper-Technologien und Zulassung entsprechender Antikörper.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers.....	3
Abbildung 3: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.....	5
Abbildung 4: Indirekte, immunvermittelte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper.....	7
Abbildung 5: Darstellung des an Asparagin <sub>297</sub> gebundenen Glykans.....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung und daraus hervorgehender B-Zell-Malignome.....	13
Abbildung 7: Stadien-spezifisches Expressionsmuster von Differenzierungsantigenen während der B-Zell-Entwicklung.....	15
Abbildung 8: CDC und ADCC des Wildtyp CD19-Antikörpers im Vergleich mit Rituximab....	37
Abbildung 9: Strukturmodelle von zwei der eingesetzten Antikörpervarianten.....	39
Abbildung 10: Übersicht über die Expression der CD19-Antikörpervarianten und ihre erwarteten Effektormechanismen.....	39
Abbildung 11: Konzentrationsbestimmung von gereinigtem CD19-DE-CHO in Coomassie-Blau gefärbtem SDS-PAGE Gel.....	40
Abbildung 12: Nachweis der verschiedenen Antikörpervarianten in reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung.....	41
Abbildung 13: Überprüfung des Fucose-Gehalts der Fc-Teile der verschiedenen CD19-Antikörpervarianten auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membranen.....	42
Abbildung 14: Analyse der spezifischen Antigenbindung mittels Durchflusszytometrie.....	44
Abbildung 15: Analyse der Dosis-abhängigen CD19-Bindung.....	45
Abbildung 16: Dosisabhängige Bindung der CD19-Antikörperkonstrukte an FcγRIIIa-158F und -158V.....	47
Abbildung 17: Analyse der Bindung des Komplementfaktors C1q durch CD19-Antikörpervarianten.....	49
Abbildung 18: ADCC der CD19-Antikörpervarianten und entsprechender HER2-spezifischer Kontrollantikörper.....	50
Abbildung 19: Dosisabhängige ADCC-Induktion gegenüber Raji und Ramos Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in <sup>51</sup> Cr-Freisetzungsversuchen.....	51
Abbildung 20: Vergleich der afucosylierten CD19-Antikörpervarianten mit Rituximab in ADCC-Experimenten.....	52
Abbildung 21: Analyse der komplementabhängigen Zytotoxizität der CD19-Antikörpervarianten und entsprechender HER2-spezifischer Kontrollantikörper.....	53

---

Abbildung 22: Dosisabhängige CDC-Lyseraten von Ramos Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen.....	54
Abbildung 23: Dosisabhängige CDC-Lyseraten von Raji Zellen durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten in $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungsversuchen.....	55
Abbildung 24: Autologe B-Zell-Depletion im Vollblut durch verschiedene CD19-Antikörpervarianten.....	58

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren.....	8
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits.....	21
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.....	23
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien.....	25
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten konjugierten Antikörper.....	26
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten unkonjugierten Antikörper.....	27
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsgegenstände.....	27
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Gegenstände.....	28
Tabelle 11: Übersicht über die verwendete Software.....	29
Tabelle 12: Zusammensetzung von hergestellten 6 bzw. 10%-igen SDS-Gelen, Ansatz für 2 Gele.....	31
Tabelle 13: Protokoll zum Nachweis von B-Zellen.....	34
Tabelle 14: Übersicht über die EC <sub>50</sub> -Werte der verschiedenen CD19-Antikörper für die Bindung an CD19.....	45
Tabelle 15: Übersicht über die Fc $\gamma$ RIIIa-Bindung.....	47
Tabelle 16: Übersicht über die ADCC-Aktivität.....	51
Tabelle 17: Vergleich der ADCC-Aktivität mit Rituximab.....	52
Tabelle 18: Übersicht über die CDC-Aktivität.....	54
Tabelle 19: Übersicht über die verschiedenen CD19-Antikörpervarianten mit ihrem Bindungsverhalten und vermittelter Zytotoxizität.....	59



## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Christian Kellner für die Überlassung dieses interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ihm und Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp möchte ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung, die stets freundliche Unterstützung sowie das Einführen in das wissenschaftliche Arbeiten danken. Für das Bereitstellen verschiedener Zelllinien bin ich Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp sehr dankbar.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem ganzen Team im Mildred Scheel Haus, insbesondere bei Dr. Anna Otte, Sebastian Lutz, Dr. Anna Kretschmar, Dr. Thies Rösner, Dr. Katja Klausz und Dr. Matthias Staudinger für die freundliche Atmosphäre und ihren Rat bei wissenschaftlichen Fragen herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei Anja Muskulus und Britta von Below für ihre technische Assistenz, die Einführung in wissenschaftliche Laborarbeit und Hilfestellungen bei der Durchführung der zahlreichen Experimente.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Julia Balzer, Sophie Peters und Yara Burmeister, mit denen das gemeinsame Arbeiten im Labor mir immer große Freude und Abwechslung bereitet hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich stets bedingungslos unterstützt haben und mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

## 10 PUBLIKATIONEN

### Zitierfähige Abstracts:

Roßkopf, S., Wirth, T., Lutz, S., Gramatzki, M., Kellner, C., Peipp, M. (2016): Dual Fc-optimization of therapeutic antibodies for improved lymphoma therapy - enhanced complement-dependent and cell-mediated cytotoxicity by combined glyco- and protein-engineering. *Oncol. Res. Treat.*, 39 (suppl. 3), 207.

Kellner, C., Alsadeq, A., Cario, G., Vieth, S., Roßkopf, S., Burmeister, Y., Klausz, K., Valerius, T., Schrappe, M., Gramatzki, M., Peipp, M., Schewe, D. M. (2016): An Fc-engineered CD19 antibody engages NK cells and macrophages and is effective in xenograft models of acute lymphoblastic leukemia. *Oncol. Res. Treat.*, 39 (suppl. 3), 202.

### Originalarbeiten:

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. *Blood*, 2017, 130, 1543–1552.

Wirt, T., Roskopf, S., Rösner, 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. *Transfus. Med. Hemother*, 44, 292–300.

### Buchkapitel:

Kellner, C., Derer, S., Klausz, K., Roskopf, S., Wirt, T., Rösner, T., Otte, A., Cappuzzello, E., Peipp, M. (2018): Fc glyco- and Fc protein-engineering: Design of antibody variants with improved ADCC and CDC activity. In: Nevoltris, D., Chames, P. (Hrsg.) *Antibody Engineering*, S. 381-397, Humana Press, New York.