

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktorin: Prof. Dr. med. Claudia 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

**HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
CHIMÄRISIERTEN VARIANTEN DER
MONOKLONALEN ANTIKÖRPER EBU-65 UND
EBU-141 FÜR DIE THERAPEUTISCHE ANWENDUNG
BEI REIFEN B-ZELL-NEOPLASIEN**

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

vorgelegt von
MALENA KRISTIN BUCK
aus Bremen

Kiel 2020

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp, Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
2. Berichterstatter*in: Priv.-Doz. Dr. Eva Maria Murga Penas, Institut für
Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.11.2020

gez. Prof. Dr. Franziska Theilig
(Vorsitzende des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNISIV

1 EINLEITUNG 1

1.1 Antikörpertherapie 1

1.1.1 Aufbau von Antikörpern 1

1.1.2 Nutzung von Antikörpern für die Tumorthherapie 3

1.1.2.1 Antikörper-vermittelte Effektormechanismen..... 3

1.2 Merkmale von Zielantigenen in der Antikörpertherapie..... 5

1.2.1 Zielstrukturen auf B-Zell-Neoplasien 5

1.2.2 CDw75/CD75s 6

1.2.3 EBU-65 und EBU-141 6

1.3 Multiples Myelom..... 7

1.3.1 Pathogenese 7

1.3.2 Diagnosestellung 9

1.3.3 Therapie..... 9

1.4 Burkitt-Lymphom 11

1.4.1 Pathogenese 11

1.4.2 Diagnosestellung 12

1.4.3 Therapie..... 13

1.5 Zielsetzung der Arbeit..... 13

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 Materialien 15

2.1.1 Puffer und Lösungen 15

2.1.2 Bakterien 16

2.1.3 Vektoren 16

2.1.4 Zelllinien und Zellkultur 17

2.1.5 Antikörper 18

2.2 Methoden..... 19

2.2.1 Reinigung der murinen IgM-Antikörper aus Hybridomüberständen 19

2.2.1.1	Bestimmung des Isotyps von EBU-65 und EBU-141	19
2.2.2	Herstellung des chimären Antikörpers chEBU-141	19
2.2.2.1	Isolierung und Klonierung der variablen Regionen von EBU-141	19
2.2.2.2	Expression von chEBU-141 in HEK-293T-Zellen durch Ca_2PO_4 -Transfektion ..	22
2.2.2.3	Reinigung von chEBU-141	23
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.2.3.1	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.....	23
2.2.3.2	Bradford- und BCA-Assay	24
2.2.4	Durchflusszytometrie	24
2.2.5	Proliferationsinhibition und Induktion des Zelltods.....	25
2.2.5.1	Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Assay	25
2.2.5.2	Induktion des Zelltods durch Kreuzvernetzung	26
2.2.6	Zytotoxizitätsversuche.....	26
2.2.6.1	Isolation humanen Serums und humaner Effektorzellen aus Blut	26
2.2.6.2	Komplement-abhängige Zytotoxizität.....	27
2.2.6.3	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität	28
2.2.7	Statistische Analyse.....	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Charakterisierung von EBU-65 und EBU-141	29
3.1.1	Reinigung der murinen IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141	29
3.1.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens	30
3.1.3	Direkte Effektormechanismen.....	31
3.1.4	Indirekte Effektormechanismen	32
3.2	Charakterisierung von chEBU-141	34
3.2.1	Herstellung und Reinigung von chEBU-141.....	34
3.2.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens	36
3.2.3	Direkte Effektormechanismen.....	38
3.2.4	Indirekte Effektormechanismen	39
4	DISKUSSION	43
5	ZUSAMMENFASSUNG	50

6	LITERATURVERZEICHNIS	52
7	ANHANG	60
7.1	Geräte und Labormaterialien	60
7.2	Zusätzliche Abbildungen	62
7.3	Ethikvotum.....	63
8	PUBLIKATIONEN.....	65
9	ERKLÄRUNG.....	66
10	DANKSAGUNG.....	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ASCT	<i>autologous stem cell transplantation</i>
BBE	<i>bovine brain extract</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BR	<i>basal release</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
CH	konstante Region der schweren Kette eines Antikörpers
CL	konstante Region der leichten Kette eines Antikörpers
cpm	<i>counts per minute</i>
CR	<i>complement-resistant</i>
CS	<i>complement-sensitive</i>
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM	<i>endothelial cell basal medium</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC ₅₀	<i>half maximal effective concentration</i>
<i>EcoRI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
ETA	<i>Pseudomonas-Exotoxin A</i>

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS/FCS	<i>fetal bovine/calf serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FLC	<i>free light chain</i>
g	Gramm
GA	Gentamicin/Amphotericin B
ggf.	gegebenenfalls
GnT-III	β 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase
GvHD	<i>Graft-versus-Host disease</i>
h	<i>hour</i>
HACA	humane anti-chimäre Antikörper
HAHA	humane anti-humanisierte Antikörper
HAMA	humane anti-Maus Antikörper
HBS	<i>hepes buffered saline</i>
hEGF	<i>human endothelial growth factor</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<i>HindIII</i>	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSA	<i>human serum albumin</i>
HUVEC	<i>human umbilical endothelial cells</i>
IL-6	Interleukin-6
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IMGT	<i>The International Immunogenetics Information System</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
KOZAK-Sequenz	eine nach der US-amerikanischen Biochemikerin Marylin Kozak benannte Nukleinbasen-Sequenz in der mRNA eukaryotischer Lebewesen
l	Liter
LRC	<i>Lycocyte Reduction Chamber</i>
M	Molar
MDE	<i>Myeloma defining event</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MGUS	<i>monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MR	<i>maximal release</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>

MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
<i>NheI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PET	Positronenemissionstomographie
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
<i>PpuMI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Pseudomonas putida</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SMM	<i>smouldering multiple myeloma</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
V	Volt
VH	variable Region der schweren Kette eines Antikörpers
VL	variable Region der leichten Kette eines Antikörpers
WHO	<i>World Health Organization</i>
YT-Medium	Yeast-Trypton-Medium

1 EINLEITUNG

1.1 Antikörpertherapie

Bereits vor über 100 Jahren postulierte der deutsche Mediziner Paul Ehrlich das „*magic bullet concept*“, das besagt, dass ein Medikament zu entwickeln sein müsse, welches an spezifischen Strukturen der Zelloberfläche von Pathogenen oder Tumorzellen angreife und somit zielgerichtet therapeutisch eingesetzt werden könne [1]. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der Behandlung von Tumorerkrankungen stellt eine Möglichkeit solch einer zielgerichteten Therapie dar und kann als Umsetzung des Konzeptes von Paul Ehrlich angesehen werden [2, 3]. Durch den Erfolg von Rituximab in der B-Zell-Lymphom-Therapie wurde der Weg für die Entwicklung und Zulassung weiterer therapeutischer Antikörper geebnet. So werden heute sowohl in der Therapie von hämatoonkologischen Erkrankungen als auch von soliden Tumoren Antikörper vielfältig eingesetzt [4].

1.1.1 Aufbau von Antikörpern

Ein Teil der adaptiven Immunantwort des menschlichen Immunsystems beinhaltet die Bildung spezifischer Antikörper durch B-Zellen bzw. Plasmazellen. Antikörper sind Proteine, die mit Hilfe ihrer variablen Domänen spezifisch ein Antigenepitop binden. Sie werden in fünf verschiedene Isotypen (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE) eingeteilt. Grundsätzlich ist jeder Antikörper aus zwei schweren und zwei leichten Ketten aufgebaut, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die schwere Kette besteht jeweils aus einer variablen (VH) und je nach Isotyp unterschiedlich vielen konstanten Domänen (CH), wohingegen die leichte Kette aus je einer variablen (VL) und einer konstanten Domäne (CL) zusammengesetzt ist. Der Aufbau der schweren Ketten bestimmt den Isotyp eines Antikörpers. Die leichten Ketten können zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (κ oder λ), die jeweils in Kombination mit allen Antikörper-Isotypen und deren Subtypen auftreten können. Beim Menschen kommen sie im Verhältnis 60:40 = κ : λ vor. Der Antigen-bindende Fab-Teil eines Antikörpers wird aus den variablen Domänen (VH und VL) sowie aus je einer konstanten Domäne der schweren und leichten Ketten (CH₁ und CL) gebildet. Der übrige Teil des Antikörpers, bestehend aus den verbleibenden konstanten Regionen der schweren Ketten, wird als Fc-Teil bezeichnet. Über den Fc-Teil werden verschiedene therapeutisch relevante Effektorfunktionen vermittelt. Hier befinden sich beispielsweise die Bindestellen für C1q, das Initiator-molekül des klassischen Weges der Komplementkaskade, oder für Fc-Rezeptoren (FcR) auf

Immunzellen [5]. Der strukturelle Aufbau der beiden für diese Arbeit relevanten Antikörper-Isotypen IgG1 und IgM ist schematisch in Abb. 1.1 gezeigt.

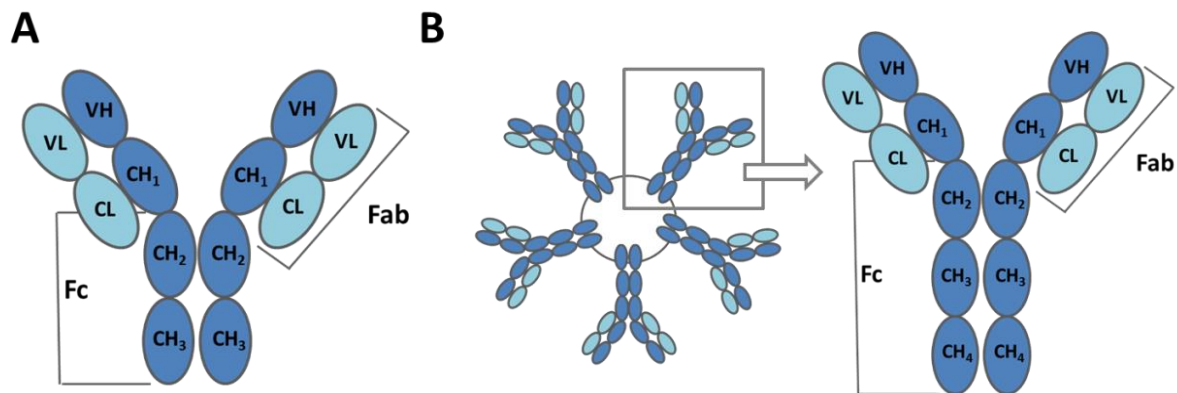


Abb. 1.1 Aufbau von Antikörpern

(A) **Schema eines IgG1-Antikörpers.** Dargestellt sind die beiden schweren (dunkelblau) und leichten (hellblau) Ketten eines humanen IgG1-Antikörpers mit ihren jeweiligen konstanten (CH bzw. CL) und variablen (VH bzw. VL) Domänen. (B) **Schema der pentameren Anordnung von IgM-Antikörpern im Blut.** Gezeigt ist die Zusammenlagerung von fünf IgM-Antikörpern zu einer pentameren Struktur. Auch hier sind die leichten Ketten hell- und die schweren Ketten dunkelblau dargestellt. In der Vergrößerung des IgM-Monomers ist die CH₄-Domäne zu beachten, die für die Pentamerisierung mit Hilfe der J-Kette wichtig ist und in der sich IgG und IgM-Antikörper u.a. unterscheiden.

IgM-Antikörper besitzen im Serum eine Halbwertszeit von fünf Tagen und machen mit einem Serumspiegel von 1,5 g/l etwa 10 % der Gesamt-Immunglobuline des Menschen aus [6, 7]. IgM kommen einerseits membranständig als B-Zell-Rezeptor in monomerer Form auf der Oberfläche von B-Zellen vor, zirkulieren andererseits im Blut jedoch als Pentamer aus fünf monomeren IgM, die über eine sog. J-Kette miteinander verbunden sind [6]. Durch die Eigenschaft der Zusammenlagerung zu Pentameren und den somit vorhandenen zehn Antigenbindestellen zeichnen sich IgM-Antikörper durch eine hohe Gesamtbindungsstärke (Avidität) aus. Darüber hinaus besitzen sie in ihrem Fc-Teil eine Bindestelle für das Komplementprotein C1q und können auf diese Weise sehr effizient das Komplementsystem aktivieren [5]. IgM repräsentieren die Antikörper, die während der Primärantwort des Immunsystems entstehen und so z. B. für die Abtötung von Würmern oder Bakterien verantwortlich sind [5, 7]. Da für die IgM-Antwort kein immunologisches Gedächtnis besteht, ist ein IgM-Titer-Anstieg ein Zeichen für eine akute Infektion [7].

IgG-Antikörper sind mit einem Gesamt-Immunglobulin-Anteil von 75 % und einem Serumspiegel von etwa 13 g/l die häufigste Antikörperklasse des Menschen [7]. Ihre Halbwertszeit im Serum beträgt 8-23 Tage [6]. IgG kommen nicht nur im Serum, sondern auch in anderen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise verschiedenen Sekreten oder der Peritonealflüssig-

keit, vor und sind zudem als einzige Antikörperklasse plazentagängig [7]. Sie können über Fc γ R Immunzellen rekrutieren und auf diesem Wege Effektormechanismen, wie eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder eine Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (ADCP), auslösen [8]. Zudem besitzen insbesondere die Subtypen IgG1 und IgG3 die Eigenschaft das Komplementsystem effektiv zu aktivieren [5]. IgG-Antikörper sind die typischen Vertreter der Sekundärantwort des Immunsystems [7]. Ihre Aufgabe besteht z. B. in der Neutralisierung von Bakterien, bakteriellen Toxinen und Viren sowie in der Opsonierung von Pathogenen. Nach einer abgelaufenen Sekundärantwort des Immunsystems entsteht ein immunologisches Gedächtnis durch die Bildung von sog. Gedächtniszellen. Gedächtniszellen sind langlebige B- oder T-Zellen, die sich während der Immunantwort vermehrt haben und die Fähigkeit besitzen, bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen sofort Antigen-spezifische Antikörper zu sezernieren [5].

1.1.2 Nutzung von Antikörpern für die Tumorthherapie

Köhler und Milstein etablierten im Jahr 1975 die Hybridom-Technologie und legten so den Grundstein für die Produktion und Entwicklung monoklonaler Antikörper für die therapeutische Anwendung [9]. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden weitere Methoden entwickelt, die die Generierung von chimären, humanisierten und humanen Antikörpern ermöglichten. So konnten effektive Antikörpertherapien etabliert werden, mit denen wiederholte Anwendungen ohne Abstoßungsreaktionen – ein Problem der anfänglich eingesetzten Mausantikörper – möglich waren [10]. Zu diesen Antikörpern gehören neben dem bereits erwähnten CD20-Antikörper Rituximab, beispielsweise der gegen Her2/neu gerichtete Trastuzumab, welcher in der Therapie des Mamma-Karzinoms eingesetzt wird, oder der gegen den EGFR gerichtete Cetuximab, der Bestandteil der Behandlung von verschiedenen Kopf-Hals-Tumoren sowie des kolorektalen Karzinoms ist [11–13]. Allein für die Tumorthherapie wurden bis 2017 mehr als 20 Antikörper zugelassen, was die Bedeutung dieser Substanzklasse unterstreicht [14]. Darüber hinaus existieren eine Vielzahl verschiedener Formate und Antikörper-Derivate, die spezielle Eigenschaften besitzen und für die unterschiedlichsten Anwendungen entwickelt werden [15, 16].

1.1.2.1 Antikörper-vermittelte Effektormechanismen

Bei den Antikörper-vermittelten Wirkmechanismen können direkte und indirekte Effekte unterschieden werden. Die direkten Effekte werden über das Fab-Fragment vermittelt und beinhalten die Induktion des programmierten Zelltods oder die Wachstumsinhibition der Zielzellen durch die Bindung des Antikörpers an sein Antigen auf der Zelloberfläche. Bei den

indirekten Effekten findet zusätzlich zur Antigenbindung eine Interaktion des Fc-Teils des Antikörpers mit verschiedenen Komponenten des Immunsystems statt. So können IgG-Antikörper z. B. durch die Bindung von C1q das Komplementsystem aktivieren und ihre Wirkung über eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) entfalten oder über die Bindung an Fc γ R Immunzellen rekrutieren und ADCC oder ADCP vermitteln (Abb. 1.2) [3, 15].

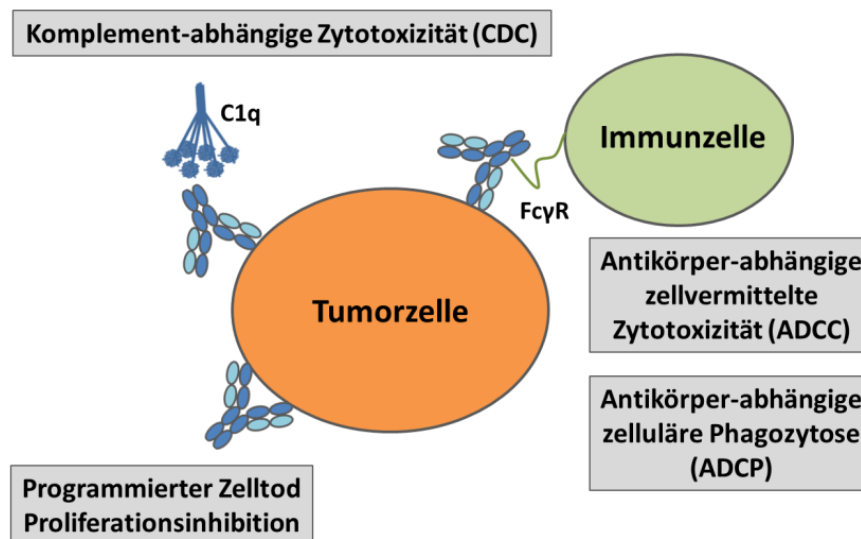


Abb. 1.2 Antikörper-abhängige Effektormechanismen

Dargestellt sind die verschiedenen Antikörper-abhängigen Effektormechanismen. Es können direkte (programmierter Zelltod, Proliferationsinhibition) und indirekte (CDC, ADCC, ADCP) Wirkmechanismen unterschieden werden. Fc γ R = Fc γ -Rezeptor.

Der Mensch besitzt verschiedene Fc γ R, die sich auf Immunzellen, wie beispielsweise Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten oder NK-Zellen, befinden. Es gibt sowohl aktivierende als auch inhibierende Fc γ R, die unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen IgG-Subtypen besitzen. Darüber hinaus sind Polymorphismen (Fc γ RIIA-131H/R, Fc γ RIIB-232I/T, Fc γ RIIIA-158V/F und Fc γ RIIIB-NA1/NA2) bekannt, die die Affinität der Fc γ R zu den Fc-Teilen der Antikörper beeinflussen und sich auch auf die Wirkung therapeutischer IgG1-Antikörper auswirken [17]. So konnte in klinischen Studien zu dem Fc γ RIIIA-158V/F-Polymorphismus ein besseres Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit Rituximab bzw. Elotuzumab von Patienten mit der hochaffinen Valin-Variante des Rezeptors im Vergleich zu denjenigen mit der niedrigaffinen Phenylalanin-Variante gezeigt werden. Damit konnte die Bedeutung Fc-vermittelter Effektorfunktionen von diesen therapeutischen Antikörpern im Menschen belegt werden [18, 19].

Die Signaltransduktion über FcγR und somit die Immunantwort wird über die unterschiedlich starke Bindung an aktivierende und inhibierende Rezeptoren über ITAM- und ITIM-Motive reguliert [20, 21]. Der einzige bekannte inhibierende FcγR beim Menschen ist der FcγRIIB [17]. Die übrigen Rezeptoren der FcγR-Familie (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC sowie FcγRIIIA und FcγRIIIB) sind aktivierend [17, 20]. NK-Zellen besitzen in der Regel den aktivierenden FcγRIIIA und gelten als wichtige Effektorzellpopulation für die Tumorzelllyse über ADCC [20].

1.2 Merkmale von Zielantigenen in der Antikörpertherapie

Die Sicherheit und Effektivität in der Anwendung von Antikörpern in der Tumorthherapie ist u. a. von den Eigenschaften des Zielantigens abhängig. Idealerweise sollte das Antigen in ausreichender Dichte vorhanden und dem Antikörper zugänglich sein. Darüber hinaus sollte es stabil sowie spezifisch auf der Zelloberfläche von Tumorzellen und nicht oder nur in geringem Ausmaß von gesunden Zellen exprimiert werden, um Toxizitäten durch eine Kreuzreaktivität mit gesundem Gewebe zu vermeiden. Des Weiteren ist eine geringe Antigensekretion vorteilhaft, damit zirkulierende Antigene nicht den therapeutischen Antikörper binden und dessen Bindung an das Antigen auf den Tumorzellen minimieren. Zudem sollte das Antigen für die Vermittlung von Antikörper-abhängigen Effektorfunktionen geeignet sein, indem es beispielsweise nach der Bindung des Antikörpers nicht sofort internalisiert wird, sodass der Fc-Teil für die FcR der Immunzellen oder C1q zugänglich ist [4]. Die meisten therapeutisch in der Tumorthherapie eingesetzten Antikörper sind vom IgG1-Isotyp und können mit den FcγR auf NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten interagieren sowie potentiell C1q binden.

1.2.1 Zielstrukturen auf B-Zell-Neoplasien

Bis heute konnten bereits einige Antigene auf B-Zell-Neoplasien identifiziert und als Zielstruktur für die Antikörpertherapie genutzt werden. So gibt es therapeutische Antikörper, die beispielsweise gegen CD19, CD20, CD38 oder BCMA gerichtet und Bestandteil aktueller Therapiestrategien von B-Zell-Neoplasien sind [22–25]. Dennoch profitieren nicht alle Patienten von den bisherigen Therapieoptionen, sodass neue Antigene auf B-Zell-Neoplasien identifiziert werden müssen, um auch diesen Patienten optimale Behandlungsmöglichkeiten anbieten zu können.

1.2.2 CDw75/CD75s

Das Antigen CDw75 wurde erstmalig 1989 auf dem vierten Internationalen Workshop für Humane Leukozytendifferenzierungsantigene durch die murinen IgM-Antikörper LN-1, HH2 und EBU-141 beschrieben [26–29]. Im Rahmen der weiteren Charakterisierung des Antigens konnten Bast *et al.* und Keppler *et al.* zeigen, dass die Antikörper HB-6, HD66, CHRIS-4, EBU-141, LN-1 und HH-2 dasselbe Antigen binden. Ihre Bindung ist von der Enzymaktivität der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase abhängig, die im Golgi-Apparat im Zuge der post-translationalen Modifikationen α -2,6-Sialylreste an Glykoproteine koppelt [30, 31]. Eine aus diesen Untersuchungen resultierende alternative Bezeichnung für CDw75 ist die nunmehr verwendete übergeordnete Bezeichnung CD75s [32]. CD75s ist ein Neuraminidase-sensitives sialyliertes Lactosamin auf der Zelloberfläche, dessen Expression von der Aktivität der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase abhängig ist [30, 32]. Die Funktion dieses Antigens ist weitestgehend ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. CD75s kann u. a. auf gesunden reifen B-Zellen sowie Endothel- und Epithelzellen nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint es insbesondere stark von Tumorzellen, wie reifen malignen B-Zellen, Tumorzellen des Magenkarzinoms, des kolorektalen Karzinoms und des Mammakarzinoms, exprimiert zu werden und könnte daher eine interessante Zielstruktur für die Tumorthherapie sein [28, 33–35].

1.2.3 EBU-65 und EBU-141

Die monoklonalen Antikörper EBU-65 und EBU-141 sind murine IgM-Antikörper, die von Gramatzki *et al.* durch die Immunisierung von Mäusen mit der humanen Plasmazellleukämie-Zelllinie U266 und der Hybridom-Technologie generiert worden sind [28]. Die Zielstruktur von EBU-65 wurde als „CDw75-like“ definiert und ist bislang unbekannt. EBU-141 bindet CD75s, das auf verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen wurde. Sowohl EBU-65 als auch EBU-141 binden z. B. auf der Oberfläche von humanen reifen B-Zell-Neoplasien, wie dem Multiplen Myelom oder dem Burkitt Lymphom, und zeigen nur wenig Reaktivität gegenüber gesundem Gewebe [28].

In dieser Arbeit wurden das Multiple Myelom und das Burkitt-Lymphom exemplarisch als Stellvertreter für reife B-Zell-Neoplasien ausgewählt, um EBU-65 und EBU-141 hinsichtlich ihrer Effektormechanismen und eines möglichen therapeutischen Potentials in der Behandlung von reifen B-Zell-Neoplasien zu evaluieren.

1.3 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist mit einer Inzidenz von 6/100.000 eine der häufigsten hämatoonkologischen Erkrankungen. Männer erkranken etwa 1,5 Mal häufiger als Frauen. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter für beide Geschlechter bei 69 Jahren [36]. Die mittlere Überlebenszeit hat sich in den letzten 20 Jahren aufgrund verbesserter Therapieoptionen, der Möglichkeit der früheren und exakteren Diagnosestellung sowie einer verbesserten Risikostratifizierung von etwa 2 Jahren (Diagnosestellung vor 2001) auf ungefähr 6 Jahre (Diagnosestellung zwischen 2006 und 2010) verbessert [37]. Die Erkrankung ist durch eine Infiltration des Knochenmarks mit klonalen Antikörper-produzierenden Plasmazellen, die monoklonale Immunglobuline und/oder Leichtketten sezernieren, gekennzeichnet [38]. Durch die Infiltration des Knochenmarks wird die normale Blutbildung verdrängt und es kommt zur Anämie. Die gestörte Knochenbildung führt zu Knochenläsionen und einer daraus resultierenden Hypercalcämie, die gemeinsam mit den freien Leichtketten (FLC) zu einer beeinträchtigten Nierenfunktion führen kann. Die klinische Präsentation des Multiplen Myeloms ist unspezifisch. Viele Patienten klagen über Müdigkeit und anhaltende Knochenschmerzen. Weitere Symptome sind wiederkehrende Infektionen, Radikulopathien, Purpura und Petechien [38].

1.3.1 Pathogenese

Gemäß der WHO-Klassifikation, die die hämatoonkologischen Erkrankungen anhand morphologischer, immunphänotypischer und genetischer Parameter einteilt, zählt das Multiple Myelom zu den reifen B-Zell-Neoplasien [39]. Die Tumorzellen haben ihren Ursprung in sog. Gedächtniszellen. Dies sind spezielle Antikörper-produzierende, langlebige Plasmazellen der B-Zell-Reihe im Knochenmark, die für das „immunologische Gedächtnis“ der erworbenen Immunität verantwortlich sind [40]. Abzugrenzen vom Multiplen Myelom sind das MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*) und das SMM (*smouldering multiple myeloma*), die als Vorstufen angesehen werden und mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % (MGUS) bzw. 10 % (SMM) pro Jahr in ein Multiples Myelom übergehen können [41, 42]. Ein zusammenfassender Überblick über die Ätiopathogenese des Multiplen Myeloms ist in Abb. 1.3 graphisch dargestellt.

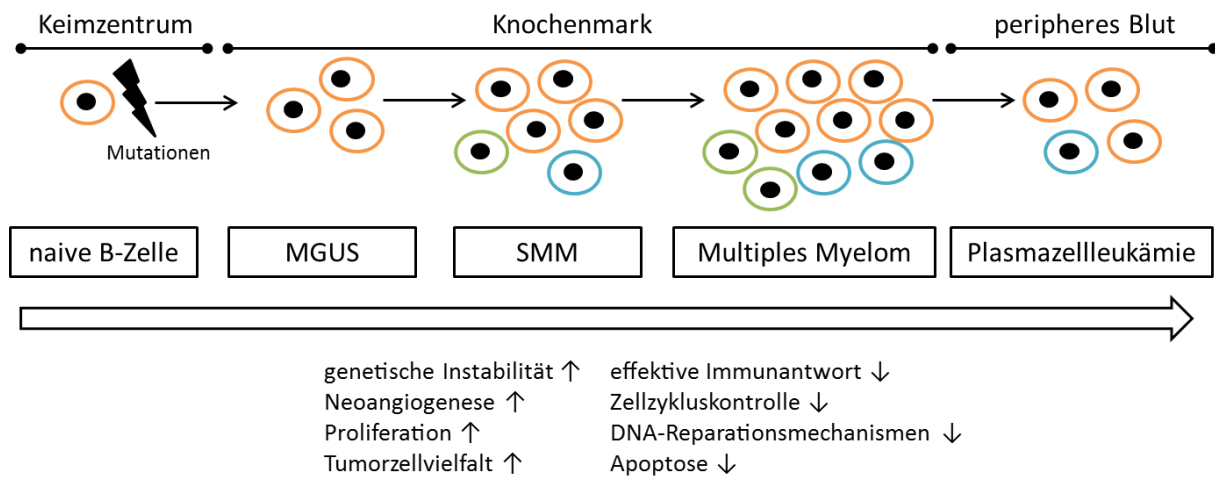


Abb. 1.3 Entstehung des Multiplen Myeloms

Mutierte B-Zellen aus dem Keimzentrum der Lymphknoten wandern als (prä-)maligne Plasmazellen in das Knochenmark ein. Durch weitere Mutationen und die Interaktionen mit dem Mikromilieu des Knochenmarks nehmen die genetische Instabilität, die Neovaskularisierung, die Proliferation und die Vielfalt der Tumorzellen zu, wohingegen die effektive Immunantwort, die Zellzykluskontrolle, die DNA-Reparationsmechanismen und die Apoptosefähigkeit abnehmen. Über die Vorstufen des MGUS und des SMM entsteht ein Multiples Myelom, welches im weiteren Krankheitsverlauf zu einer Plasmazelleukämie voranschreiten kann. (Abbildung modifiziert nach Morgan *et al.* [43])

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung wird angenommen, dass die ersten genetischen Mutationen im Keimzentrum der Lymphknoten während des Prozesses der Affinitätsreifung der B-Zellen (somatische Hypermutation und Klassenwechsel der Immunglobuline) auftreten. Bei diesen Mutationen handelt es sich in den meisten Fällen um chromosomale Translokationen und Hyperdiploidien [43]. Die mutierte (prä-)maligne B-Zelle wandert anschließend in das Knochenmark ein, wo sie zur langlebigen Plasmazelle ausdifferenziert [38]. Während dieses Prozesses kommt es durch zusätzliche Mutationen (z. B. Translokationen oder Deletionen), die beispielsweise zu einer gesteigerten Aktivität von Onkogenen oder einer verminderten Aktivität von Tumorsuppressorgenen führen können, zur Zunahme der genetischen Instabilität, zur Abnahme der Zellzykluskontrolle sowie zu einer verminderten Effektivität von DNA-Reparaturmechanismen [38, 43]. Im Knochenmark entsteht ein Mikromilieu aus Tumorzellen, Stromazellen, Immunzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Durch direkte zelluläre Interaktionen und über lösliche Faktoren wie Zytokine und Chemokine wird das Überleben der Tumorzellen begünstigt, wodurch sich diese einer effektiven Immunantwort entziehen. Darüber hinaus werden beispielsweise durch Neovaskularisierung optimale Bedingungen für die Tumorzellproliferation geschaffen [44]. Beim Multiplen Myelom finden sich oft nicht nur Tumorzellen eines Zellklons, sondern es tritt eine klonale Heterogenität auf. Die genetischen Eigenschaften der einzelnen Zellklone und der Selektionsdruck durch das Mikromilieu oder die Therapie können jedoch die Dominanz eines dieser Zellklone zur Folge

haben [38]. Während des Fortschreitens der Erkrankung können ein oder mehrere Zellklone die Fähigkeit entwickeln auch außerhalb des Knochenmarks zu proliferieren und in das periphere Blut ausschwemmen. Dieses Manifestationsstadium der Erkrankung wird als Plasmazellleukämie bezeichnet [45]. Daneben gibt es noch das sog. extramedulläre Myelom, welches eine besonders aggressive Form der Erkrankung darstellt und sich in verschiedenen Organen, wie beispielsweise dem Gehirn, der Leber, den Nieren, der Haut oder in Lymphknoten, manifestiert [46].

1.3.2 Diagnosestellung

Die *International Myeloma Working Group* führte 2014 neue Diagnosekriterien für das Multiple Myelom und seine Vorstufen ein [47]. Die Diagnose kann gestellt werden, wenn sich bei einem Patienten $\geq 10\%$ klonale Plasmazellen im Knochenmark befinden oder ein bioptisch gesichertes Plasmozytom vorliegt und zusätzlich ein Myelom definierendes Ereignis (MDE) auftritt. Zu den MDE gehören die bereits seit langem etablierten CRAB-Kriterien (Hypercalcämie, Niereninsuffizienz, Anämie und osteolytische Knochenläsionen, die im konventionellen Röntgen, CT oder PET-CT detektiert werden können) sowie drei neu eingeführte spezifische Biomarker. Diese dienen der besseren Identifizierung der Patienten mit einem SMM, die aufgrund der biologischen Eigenschaften der Erkrankung ein hohes Risiko besitzen, im Verlauf ein Multiples Myelom zu entwickeln. Zu diesen Biomarkern zählen das Vorhandensein von $\geq 60\%$ klonalen Plasmazellen im Knochenmark, eine FLC-Ratio von ≥ 100 und mehr als eine fokale Knochenläsion, die im MRT nachgewiesen werden kann [47].

1.3.3 Therapie

In der Therapie des Multiplen Myeloms werden Medikamente aus verschiedenen Arzneimittelgruppen in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Zu diesen zählen Alkylantien (z. B. Melphalan), Glucocorticoide (z. B. Dexamethason), immunmodulatorische Substanzen (z. B. Thalidomid oder Lenalidomid) sowie Proteasominhibitoren (z. B. Bortezomib oder Carfilzomib) [37]. Darüber hinaus sind seit 2015 die beiden monoklonalen Antikörper Daratumumab (als Mono- und Kombinationstherapie) und Elotuzumab (in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason) für die Behandlung des Multiplen Myeloms bei refraktären und rezidierten Patienten zugelassen [48]. Daratumumab ist ein gegen CD38 gerichteter humaner IgG1 κ -Antikörper. CD38 wird stark von Myelomzellen, aber auch von anderen Leukozyten exprimiert und kann somit als Zielstruktur für die Immuntherapie bei hämato-onkologischen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom genutzt werden. Der

Antikörper vermittelt seine Wirkung sowohl über CDC als auch ADCC und ADCP und besitzt direkte Effekte durch die Veränderung der CD38-Enzymaktivität [24]. Der zweite in der Therapie des Multiplen Myeloms zugelassene Antikörper Elotuzumab ist ein gegen CS1 (auch SLAMF7/CD319) gerichteter humanisierter IgG1κ-Antikörper [49]. CS1 ist ein Oberflächenglykoprotein, das in hohem Maße auf Plasmazellen sowie in geringerer Dichte auf anderen Lymphozytensubgruppen, wie z. B. NK-Zellen, exprimiert ist [50]. Elotuzumab besitzt ADCC-Aktivität gegenüber Myelomzellen und aktiviert zudem direkt NK-Zellen, die daraufhin die Tumorzellen lysieren können [49, 51]. Darüber hinaus wird diskutiert, dass Elotuzumab durch die Bindung auf den Myelomzellen eine gestörte Interaktion der Tumorzellen mit den Stromazellen des Knochenmarks bewirkt, was hinsichtlich der vermuteten protektiven Wirkung der Stromazellen auf die Tumorzellen von therapeutischer Bedeutung sein kann [49].

Zusätzlich zu der medikamentösen Therapie besteht für geeignete Patienten (u. a. maximal 65 Jahre alt sowie keine erheblichen Herz-, Lungen-, Nieren- oder Leberdysfunktionen) die Möglichkeit einer autologen Stammzelltransplantation (ASCT) [37, 52]. Eine prospektive, randomisierte Studie konnte 1996 zeigen, dass die myeloablative Hochdosis-Chemotherapie mit ASCT im Gegensatz zu den konventionellen zytostatischen Therapien zu einer erheblichen Verbesserung des Überlebens führt und ist daher heute ein essentieller Bestandteil der Therapie [52]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation, die derzeit die einzige potentiell kurative Myelomtherapie darstellt [53]. Diese ist allerdings mit einem hohen Risiko verbunden. So kann es u. a. zu der sog. *Graft-versus-Host*-Erkrankung (GvHD) kommen, bei der sich Komponenten des Immunsystems des Spenders gegen den Organismus des Empfängers richten. Die Transplantations-assoziierte Mortalität beträgt nach myeloablativer Konditionierung etwa 40-49 % und nach nicht-myeloablativer bzw. dosisreduzierter Konditionierung 17-38 % [53].

Trotz der vielfältigen Therapieoptionen ist das Multiple Myelom nach wie vor in den meisten Fällen nicht kurativ behandelbar und insbesondere Patienten in einem rezidierten oder refraktären Stadium der Erkrankung haben eine schlechte Prognose [54]. Derzeit sind eine Vielzahl von Antikörpern und Antikörper-basierten Molekülen in verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung [55, 56]. Trotzdem ist weiterhin eine intensive Forschung in diesem Bereich notwendig, um die Therapieoptionen zu erweitern und die Prognose und das Überleben der Patienten langfristig zu verbessern.

1.4 Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom ist ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom, das gemäß der WHO-Klassifikation ebenfalls zu den reifen B-Zell-Neoplasien gezählt wird [39]. Die Inzidenz der Erkrankung weist große geographische Unterschiede auf. In Europa und Nordamerika ist die Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,2/100.000 bei Kindern unter 18 Jahren insgesamt selten und aufgrund der guten medizinischen Versorgung ist die Prognose mit einer Heilungsrate von etwa 90 % sehr gut. In Afrika und Papua-Neuguinea hingegen tritt die Erkrankung wesentlich häufiger auf. Die Inzidenz beträgt hier 4-5/100.000 Kinder unter 18 Jahren [57]. Aufgrund der schlechteren medizinischen Versorgung und den damit verbundenen begrenzten Therapiemöglichkeiten sowie Therapie-unterstützenden Maßnahmen ist die Prognose in diesen Regionen schlechter [58].

Es können drei verschiedene Varianten des Burkitt-Lymphoms unterschieden werden: der endemische, der sporadische und der Immundefizienz-assoziierte Typ. Alle drei Formen sind sich sowohl in ihrer Morphologie, ihrem Immunphänotyp als auch ihren genetischen Eigenschaften ähnlich. In Europa und Nordamerika tritt überwiegend der sporadische Typ auf und macht etwa 1-2 % der Lymphome des Erwachsenen sowie 30-40 % der Non-Hodgkin-Lymphome bei Kindern aus. In Äquatorialafrika hingegen sind die meisten Burkitt-Lymphome dem endemischen Typ zuzuordnen [57].

Hinsichtlich ihrer klinischen Präsentation weisen die verschiedenen Varianten des Burkitt-Lymphoms jedoch einige Unterschiede auf. Bei der endemischen Form treten die Tumore hauptsächlich im Bereich des Kiefers und der Nieren auf. Es können jedoch auch Anteile des Darms, die Ovarien oder die Brust betroffen sein. Bei dem Immundefizienz-assoziierten und dem sporadischen Typ finden sich die Tumore hingegen überwiegend im Abdomen. Die Patienten klagen insgesamt oftmals über unspezifische Beschwerden, wie Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen [59].

1.4.1 Pathogenese

Die genaue Pathogenese des Burkitt-Lymphoms ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Faktoren, deren Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung diskutiert wird. Als Ursprung der Tumorzellen werden, je nach Subtyp, einerseits B-Zellen der Keimzentren oder Gedächtniszellen der B-Zell-Reihe angenommen [60]. Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese scheint die Translokation des *MYC*-Gens zu spielen, die in den meisten Tumorzellen der Patienten mit Burkitt-Lymphom nachgewiesen werden kann [61]. Die Translokationen (am häufigsten t(8;14), seltener t(2;8) oder t(8;22)) führen zu einer

verstärkten Expression des *MYC*-Gens [62]. Die resultierende Überexpression des Proto-Onkogens *MYC* führt zu einer gestörten Zellzykluskontrolle, einer erhöhten Proliferation und verstärktem Wachstum der Zellen mit gesteigerter Proteinbiosynthese und Zellmetabolismus. Auch bei anderen B-Zell-Neoplasien können Veränderungen des *MYC*-Gens nachgewiesen werden und stehen meist in Zusammenhang mit einer hohen Aggressivität des Tumors [63].

Der endemische Typ des Burkitt-Lymphoms ist einerseits mit Malaria- und andererseits mit EBV-Infektionen assoziiert. Ein möglicher Mechanismus in der Pathogenese ist, dass die Infektion mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* eine B-Zell-Hyperplasie hervorruft und sich infolgedessen die Mutationswahrscheinlichkeit erhöht, die dann zur Entwicklung eines Burkitt-Lymphoms führen kann [64]. Auch EBV-Infektionen scheinen bei der endemischen Form des Burkitt-Lymphoms eine Rolle zu spielen. So können in nahezu allen endemischen Burkitt-Lymphomen Viruspartikel nachgewiesen werden [65]. Es wird diskutiert, dass das Virus in den infizierten Zellen einerseits zu einer Zunahme der genomischen Instabilität, einer Dysregulation der Telomerefunktion und der Induktion von DNA-Schäden führt und andererseits die Apoptosefähigkeit der Zellen herabsetzt, die eine *MYC*-Translokation tragen [66].

Der Immundefizienz-assoziierte Typ des Burkitt-Lymphoms tritt hauptsächlich bei HIV-infizierten Patienten auf, findet sich aber auch bei Patienten, die transplantiert worden sind oder an einem angeborenen Immundefekt leiden [67]. Sowohl der HIV-assoziierte Typ als auch die sporadische Form des Burkitt-Lymphoms sind im Gegensatz zum endemischen Typ weniger stark mit einer EBV-Infektion assoziiert [68, 69].

1.4.2 Diagnosestellung

Da es sich bei den Burkitt-Lymphomen um eine hochmaligne Erkrankung handelt, die mit einem aggressiven Tumorwachstum verbunden ist, sind eine zügige Diagnosestellung und Ausbreitungsdiagnostik zwingend erforderlich. Für die Diagnose wird in der Regel eine Probe des Tumors (z. B. befallener Lymphknoten) mittels Mikroskopie und immunzytologischen Analysen untersucht. Im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik sollten je nach Verfügbarkeit (wobei die diagnostischen Möglichkeiten in Entwicklungsländern oftmals eingeschränkt sind) eine Sonographie des Abdomens, eine konventionelle Röntgenuntersuchung des Thorax, ein CT des Thorax und des Abdomens oder ein PET-CT durchgeführt werden. Darüber hinaus sollte eine Knochenmarkspunktion sowie eine Liquordiagnostik erfolgen, um die Ausbreitung der Tumorzellen in diese Kompartimente zu überprüfen und die Therapie ggf. entsprechend anpassen zu können [57].

1.4.3 Therapie

Die Therapie des Burkitt-Lymphoms beinhaltet verschiedene Kombinationen aus unterschiedlichen Zytostatika. Zu diesen gehören unter anderem Alkylantien (z. B. Cyclophosphamid), Anthrazykline (z. B. Doxorubicin), Alkaloide (z. B. Vincristin), Antimetabolite (z. B. Cytarabin), Glucocorticoide (z. B. Prednisolon) oder Folsäure-Antagonisten (z. B. Methotrexat) [57, 70]. Zu Beginn der Therapie besteht durch die oftmals große Tumorlast und den bei Therapieansprechen auftretenden Zellzerfall die Gefahr eines Tumorlyse-Syndroms. Hierbei kann es durch die Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen zu einer Hyperurikämie, Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und Hypocalcämie und infolgedessen zu einem akuten Nierenversagen kommen. Die Folgen eines Tumorlyse-Syndroms können jedoch durch Therapie-unterstützende Maßnahmen, wie z. B. den Einsatz von Rasburicase sowie eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr, vermindert werden [70]. Darüber hinaus kann zusätzlich zur zytostatischen Therapie der monoklonale Antikörper Rituximab im Rahmen einer Immuntherapie eingesetzt werden. Rituximab ist ein gegen CD20 gerichteter chimärer IgG1-Antikörper, der über verschiedene Wirkmechanismen CD20-positive Zellen im Blut depletiert und war der erste Antikörper, der 1997 für die Tumorthherapie zugelassen worden ist [23]. CD20 wird mit Ausnahme von prä-B-Zellen und reifen Plasmazellen von allen gesunden B-Zellen und den meisten B-Zell-Lymphomen exprimiert und kann daher als Zielstruktur für eine CD20-gerichtete Tumorthherapie genutzt werden [23].

Trotz der bereits bestehenden effektiven Therapiemöglichkeiten und den insgesamt guten Heilungsraten des Burkitt-Lymphoms haben vorwiegend Patienten mit einem Rezidiv der Erkrankung eine schlechte Prognose [57]. Weitere Forschung zur Entwicklung neuer Substanzen ist notwendig, um einerseits insbesondere die Therapieoptionen für die Behandlung des Rezidivs zu erweitern und andererseits Therapien zu etablieren, die bei gleicher Effektivität eine geringere Toxizität aufweisen und somit auch eine Option für ältere oder geschwächte Patienten darstellen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz vielfältiger Therapieoptionen in der Behandlung von reifen B-Zell-Neoplasien gibt es nach wie vor Patienten, die nicht von diesen Optionen profitieren und eine schlechte Prognose besitzen. Die Suche nach neuen Zielstrukturen sowie die Entwicklung von therapeutischen Antikörpern sind notwendig, um neue Therapiemöglichkeiten zu schaffen und die Situation dieser Patienten zu verbessern.

CD75s stellt aufgrund seines Expressionsprofils einen möglichen Angriffspunkt für immuntherapeutische Ansätze dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte evaluiert werden, inwiefern sich CD75s als Zielstruktur auf reifen B-Zell-Neoplasien für eine Antikörpertherapie eignet. Dazu sollten die murinen IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141, welche spezifisch an CD75s binden, hinsichtlich ihrer direkten und indirekten Wirkmechanismen charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, inwiefern sich die funktionellen Eigenschaften der IgM-Antikörper auf einen, basierend auf den variablen Regionen des EBU-141-Antikörpers hergestellten, chimären IgG1-Antikörper übertragen lassen. Ziel dieser Arbeit war weiterhin die Evaluation des therapeutischen Potentials des abgeleiteten chimären Antikörpers chEBU-141 für die Behandlung von reifen B-Zell-Neoplasien am Beispiel des Multiplen Myeloms und des Burkitt-Lymphoms.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Eine detaillierte Auflistung der für das Erstellen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Labormaterialien findet sich im Anhang unter Punkt 7.1.

2.1.1 Puffer und Lösungen

Die Chemikalien für das Herstellen von Puffern und Lösungen (Tab. 2.1) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Roth (Karlsruhe), Hartmann Analytic (Braunschweig), Lonza (Basel, CH) und Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen und sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

Für das Herstellen von Lösungen und Verdünnungen wurde Wasser aus der *MilliQ A10*-Anlage der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

Tab. 2.1 Zusammensetzung der für die Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
SDS-PAGE Trenngel	2,668 ml Acrylamid/Bis 2,001 ml TRIS (1,5 M, pH 8,8) 80 µl SDS (10 %) 60 µl APS (10 %) 6 µl TEMED ad 8,067 ml <i>Aqua dest.</i>
SDS-PAGE Sammelgel	667 µl Acrylamid/Bis 1,000 ml TRIS (0,5 M, pH 6,8) 40 µl SDS (10 %) 20 µl APS (10 %) 4 µl TEMED ad 4,024 ml <i>Aqua. dest.</i>
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE Ladepuffer (reduzierend)	0,313 M TRIS HCl (pH 6,8) 10 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 0,5 M DTT
Coomassie-Färbelösung	60 ml H ₂ O 20 ml Methanol 20 ml 5×Roti Blue
FACS-Puffer (PBA)	1×PBS 1 % BSA

Name	Zusammensetzung
2×HBS-Puffer (pH 7,5)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
50×TAE-Puffer	242 g TRIS (2 M) 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung ad 1 l <i>Aqua dest.</i>
Agarosegel (1 %)	1×TAE-Puffer 1 % Agarose
MACS-Puffer	AutoMACS Rinsing Solution 1 % HSA
MTS-Lösung (pH 6,5)	1 g MTS ad 500 ml <i>Aqua dest.</i>

2.1.2 Bakterien

Tab. 2.2 Für die Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller (Hauptsitz)
elektrokompetente <i>E. coli</i> XL-1 Blue	eigene Herstellung
<i>One Shot Mach1-T1 chemically competent E. coli</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)

Tab. 2.3 Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung
2×YT (pH 7,2)	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1 ml Ampicillin/Kanamycin-Stocklösungen (100 mg/ml) ad 1 l <i>Aqua dest.</i> (für Agar-Platten noch 15 g/l Agar hinzufügen)

2.1.3 Vektoren

Tab. 2.4 Für die Arbeit verwendete Vektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz	Hersteller (Hauptsitz)
<i>pCR-Blunt II-TOPO Vektor</i>	Kanamycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>pSec-P111-15-VH-wt-IgG1-HC-No Tags</i>	Ampicillin	vom Labor zur Verfügung gestellt
<i>pSec-Rituximab-LC</i>	Ampicillin	vom Labor zur Verfügung gestellt
<i>pEx-A2-VL bzw. -VH</i>	Ampicillin	Eurofins Scientific (Luxemburg)

2.1.4 Zelllinien und Zellkultur

Tab. 2.5 Für die Arbeit verwendete Zelllinien/Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Ursprung	Referenz
EBU-141	Hybridom	Erlangen	Gramatzki <i>et al.</i> , 1991 [28]
EBU-65	Hybridom	Erlangen	Gramatzki <i>et al.</i> , 1991 [28]
U266	humane Myelom-Zelllinie	Erlangen	Nilsson <i>et al.</i> , 1970 [71]
L363	humane Plasmazellleukämie-Zelllinie	DSMZ	Diehl <i>et al.</i> , 1978 [72]
RPMI-8226	humane Myelom-Zelllinie	DSMZ	Drexler <i>et al.</i> , 2000 [73]
INA-6	humane Plasmazellleukämie-Zelllinie	Erlangen	Burger <i>et al.</i> , 2001 [74]
INA-6.Tu1	humane Plasmazellleukämie-Zelllinie	Erlangen	Burger <i>et al.</i> , 2001 [74]
Daudi	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	DSMZ	Klein <i>et al.</i> , 1968 [75]
Raji	humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie	DSMZ	Pulvertaft, 1964 [76]
HEK-293T	humane embryonale Nierenzelllinie	DSMZ	Graham <i>et al.</i> , 1977 [77]
HUVEC	primäre humane Endothelzellen	Lonza	-

Tab. 2.6 Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium
EBU-65, EBU-141, Daudi, U266, L363, RPMI-8226, Raji	RPMI 1640 Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
INA-6, INA-6 Tu.1	RPMI 1640 Medium 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 2 ng/ml IL-6
HEK-293T	DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
HUVEC	EBM EGM SingleQuots (0,1 % hEGF; 0,1 % Hydrocortison; 0,1 % GA-1000; 0,4 % BBE; 2 % FCS; 0,1 % Ascorbinsäure)

Die Zellkulturmaterialien wurden von Life Technologies (Carlsbad, USA), das EBM und die EGM SingleQuots von Lonza (Walkersville, USA) bezogen.

2.1.5 Antikörper

Tab. 2.7 Für die Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifität	Isotyp, Klonalität	Referenz
EBU-65	CDw75-like	muriner IgM, monoklonal	Gramatzki <i>et al.</i> , 1991 [28]
EBU-141	CD75s	muriner IgM, monoklonal	Gramatzki <i>et al.</i> , 1991 [28]
chEBU-141	CD75s	chimärer IgG1, monoklonal	nicht publiziert
<i>Purified Mouse IgM, κ Isotype Control</i>	Isotypkontrolle	muriner IgM, monoklonal	BD Biosciences (Bedford, USA)
Cetuximab	EGFR	chimärer IgG1, monoklonal	Goldstein <i>et al.</i> , 1995 [78]
Rituximab	CD20	chimärer IgG1, monoklonal	Reff <i>et al.</i> , 1994 [23]
TH-69	CD7	muriner IgG1, monoklonal	Baum <i>et al.</i> , 1996 [79]
HM1.24-ETA ^c	CD317/HM1.24	Immuntoxin, monoklonal	Staudinger <i>et al.</i> , 2014 [80]
<i>Mouse IgG_{2A}-PE</i>	Isotypkontrolle	muriner IgG _{2A} , monoklonal	BD Biosciences (Bedford, USA)
<i>IgG1(mouse)-APC</i>	Isotypkontrolle	muriner IgG1, monoklonal	Beckman Coulter (Brea, USA)
CD3-APC	CD3	muriner IgG1, monoklonal	Beckman Coulter (Brea, USA)
CD56-APC	CD56	muriner IgG1, monoklonal	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
CD14-APC	CD14	muriner IgG _{2A} , monoklonal	Beckman Coulter (Brea, USA)
<i>Goat Anti-Mouse IgM</i>	murine IgM	nicht angegeben, polyklonal	Caltaq Laboratories (Carlsbad, USA)
<i>FITC-conjugated F(ab')₂ fragment Anti-Mouse IgG + IgM</i>	murine IgG und IgM	F(ab') ₂ , polyklonal	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)
<i>FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti- Human IgG</i>	humane IgG	F(ab') ₂ , polyklonal	Jackson Immuno Research (Suffolk, UK)
<i>Goat Anti-Human Kappa-FITC</i>	humane kappa leichte Ketten	IgG, polyklonal	SouthernBiotech (Birmingham, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Reinigung der murinen IgM-Antikörper aus Hybridomüberständen

Die Kultivierung der Hybridom-Zelllinien EBU-65 und EBU-141 erfolgte in RPMI Medium 1640 mit 10 % FCS sowie 1 % Penicillin und Streptomycin (R10⁺). Die Zellkulturüberstände mit den darin enthaltenen Antikörpern wurden gesammelt und steril filtriert, nachdem der pH-Wert auf 8,0 eingestellt worden war. Anschließend wurde die *Capture Select IgM Affinity Matrix* (IgM-Beads; Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis 1:1000 für 16 h bei 4 °C eingerührt. Die IgM-Beads mit den gebundenen Antikörpern wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge aus den Überständen separiert, in einer Poly-Prep-Säule gesammelt und dreimal mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden je 1,2 ml 0,1 M TRIS (pH 8,0) in einem 15 ml-Röhrchen vorgelegt und die Antikörper mit je 6 ml 0,1 M Glycin (pH 3,0) von der Säulenmatrix bzw. den Beads eluiert. Das Eluat wurde in einen zuvor in PBS eingeweichten 25 µm Dialysierschlauch gefüllt und drei Tage unter täglichem Wechsel des Puffers in sterilem PBS bei 4 °C dialysiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Antikörper jeweils in einem 6 ml Vivaspinn-Röhrchen bei 4000 rpm zentrifugiert, bis das Volumen auf etwa 1 ml eingeeengt war. Danach wurden die Antikörper erneut steril filtriert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.1.1 Bestimmung des Isotyps von EBU-65 und EBU-141

Zur Überprüfung des Antikörper-Isotyps von EBU-65 und EBU-141 wurde das *Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Als interne Kontrolle diente der murine IgG1κ-Antikörper TH-69 [79].

2.2.2 Herstellung des chimären Antikörpers chEBU-141

2.2.2.1 Isolierung und Klonierung der variablen Regionen von EBU-141

Für die Umwandlung des murinen IgM-Antikörpers EBU-141 in den chimären IgG1-Antikörper EBU-141 (chEBU-141) mussten zunächst die DNA-Sequenzen der variablen Regionen der schweren (VH) und leichten Kette (VL) isoliert werden. Hierzu wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aus 4×10^6 Zellen der Hybridom-Zelllinie EBU-141 die RNA isoliert und deren Konzentration und Reinheit im Photometer bestimmt. Da der Wert für das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ innerhalb des Normbereiches von 1,8-2,1 lag, wurden 10 µg RNA nach Herstellerangaben mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifikation der variablen Regionen muriner Immunglobuline wurde eine V-Regionen-PCR wie in Kellner *et al.*

beschrieben mit Primern nach Burmester *et al.* durchgeführt [81, 82]. Abweichend vom Protokoll wurden nur Primer für die kappa- und nicht für die lambda-Leichtketten verwendet, da EBU-141 zuvor durch die Isotypisierung als muriner IgM-Antikörper mit kappa-Leichtketten identifiziert worden war. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Als Kontrolle diente jeweils ein PCR-Ansatz, in dem sich keine cDNA befand. Alle Ansätze wurden steril und auf Eis pipettiert.

Zur Kontrolle wurde eine einstündige Gelelektrophorese bei 120 V mit den PCR-Produkten und einem 1 %igen Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden je 5 µl PCR-Ansatz mit 5 µl 6×*Loading Dye* (Roth) und 20 µl destilliertem Wasser gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente die *100-bp-DNA-ladder* der Firma Roth.

Anschließend wurden die PCR-Produkte nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe des *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* (Thermo Fisher Scientific) in den *pCR-Blunt II-TOPO Vektor* kloniert. Hierfür wurden je 4 µl der PCR-Produkte für die Ligation eingesetzt und danach in chemisch kompetente *E. coli* (*One Shot Mach1-T1*) mittels Hitzeschock transformiert. Anschließend wurden auf je zwei 2×YT_{Kan}-Platten (mit 100 µg/ml Kanamycin) 15 µl bzw. 100 µl ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 16 h wurden von jeder Platte je 10 Einzelkolonien gepickt, Kulturen von je 3 ml 2×YT_{Kan}-Medium angeimpft und diese unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 16 h wurde die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers mit dem *NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit* (Macherey-Nagel) isoliert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die DNA mit destilliertem Wasser von den Säulen eluiert, um sie direkt sequenzieren zu können.

Als Sequenzierprimer wurde der *M13 Reverse* aus dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen) verwendet. Es wurden je 3 µl Plasmid-DNA mit 1 µl des Primers für die Sequenzierung im *Zentrum für Molekulare Biowissenschaften* der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorbereitet und dort unter standardisierten Bedingungen nach Sanger sequenziert.

Die Sequenzen wurden mit dem *Vector NTI*-Programm der Firma Invitrogen ausgewertet und mit Maus-Immunglobulinsequenzen in der IMGT-Datenbank verglichen, um die VH- und VL-Sequenzen sowie die zugehörigen Immunglobulinfamilien von EBU-141 zu identifizieren. Die so ermittelten DNA-Sequenzen (VH-Familie: IGHV3-1*02, VL-Familie: IGKV4-59*01) wurden jeweils 5' mit einer *NheI*-Schnittstelle, einer KOZAK-Sequenz und ihren natürlichen Leader-Sequenzen sowie 3' mit einer *HindIII*- (VL) bzw. *PpuMI*-Schnittstelle (VH) versehen und von Eurofins Scientific synthetisiert und bezogen. Die lyophilisierten Vektoren *pEx-A2-VL* und *pEx-A2-VH* wurden in je 20 µl Nuklease-freiem,

destilliertem Wasser gelöst und anschließend amplifiziert. Dafür wurden je 4 µl Plasmid-DNA in 40 µl elektrokompente *E. coli XL-1 Blue* transformiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem Ec1-Programm (1,8 kV, 1 *pulse*) des *MicroPulsers* (BioRad) in vorgekühlten 0,1 cm-Elektroporationsküvetten (BioRad). Zu den Ansätzen wurden direkt nach der Elektroporation je 200 µl SOC-Medium gegeben und diese dann 1 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Danach wurden je 200 ml Hauptkulturen (2×YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) mit den Bakterien angeimpft und erneut bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Nach weiteren 16 h wurden nach Protokoll des Herstellers mit dem *NucleoBond Xtra Maxi-Kit* (Macherey-Nagel) die Plasmide isoliert und deren Konzentration und Reinheit im Photometer bestimmt.

Die Plasmide *pEx-A2-VL* und *pSec-Rituximab-LC* wurden einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII*, die Plasmide *pEx-A2-VH* und *pSec-PIII-15-VH-wt-IgG1-HC-No Tags* einem Doppelverdau mit *NheI* und *PpuMI* unterzogen, um die VL- bzw. die VH-Regionen „auszuschneiden“ (Restriktionsansätze siehe Tab. 2.8). Die Puffer 10×NEB2.1 und 10×CutSmart sowie die Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen. Der Restriktionsverdau wurde für 16 h bei 37 °C durchgeführt.

Tab. 2.8 Restriktionsverdau von *pEx-A2-VL/-VH* und *pSec-Rituximab-LC* bzw. *pSec-PIII-15-VH-wt-IgG1-HC-No Tags*

<i>pEx-A2-VL</i>	<i>pSec-Rituximab-LC</i>
5 µl 10×NEB2.1-Puffer	5 µl 10×NEB2.1-Puffer
2 µg DNA	2 µg DNA
1 µl <i>NheI</i> (10.000 U/ml)	1 µl <i>NheI</i> (10.000 U/ml)
1 µl <i>HindIII</i> (100.000 U/ml)	1 µl <i>HindIII</i> (100.000 U/ml)
ad 50 µl <i>Aqua dest.</i>	ad 50 µl <i>Aqua dest.</i>

<i>pEx-A2-VH</i>	<i>pSec-PIII-15-VH-wt-IgG1-HC-No Tags</i>
5 µl 10×CutSmart-Puffer	5 µl 10×CutSmart-Puffer
2 µg DNA	2 µg DNA
1 µl <i>NheI</i> (10.000 U/ml)	1 µl <i>NheI</i> (10.000 U/ml)
1 µl <i>PpuMI</i> (10.000 U/ml)	1 µl <i>PpuMI</i> (10.000 U/ml)
ad 50 µl <i>Aqua dest.</i>	ad 50 µl <i>Aqua dest.</i>

Für die Klonierung der variablen Regionen (VH und VL) in die *pSec*-Vektoren wurden die Restriktionsansätze einer 1 %igen Agarosegelelektrophorese unterzogen. Hierzu wurden jeweils 50 µl Restriktionsverdau mit je 10 µl 6×*Loading Dye* (Roth) verwendet. Als Größenstandard diente die *100-bp-DNA-ladder* der Firma Roth. Die DNA der variablen

Regionen und der *pSec*-Vektoren wurde anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Agarosegel extrahiert.

Für die Ligation der VH- bzw. der VL-Sequenz in die entsprechenden *pSec*-Vektoren wurden jeweils 7 µl des entsprechenden Vektors mit 10 µl des jeweiligen Inserts (*EBU-141-VH* oder *EBU-141-VL*), 2 µl *Ligation Buffer* und 1 µl *T4-Ligase* (Roche) für 16 h bei 4 °C inkubiert, um die Expressionsvektoren *pSec-EBU-VL-kappa-LC-Full-No Tags* und *pSec-EBU-VH-wt-IgG1-HC-No Tags* zu generieren. Die verwendeten *pSec*-Vektoren enthielten bereits die konstanten Regionen der humanen kappa-Leichtkette (*pSec-LC*) bzw. der schweren Kette des humanen IgG1 (*pSec-IgG1-HC*) sowie Stopp-Codons vor den myc- und His-Tags des ursprünglichen *pSec Tag2*-Vektors. Je 4 µl Ligationsansatz wurden anschließend wie bereits oben beschrieben in je 50 µl chemisch kompetente *E. coli* (*One Shot Mach 1-T1*) transformiert, mit der Ausnahme, dass als Antibiotikum 100 µg/ml Ampicillin statt Kanamycin verwendet wurde. Es wurden erneut 10 Einzelkolonien pro Platte gepickt und analog zu dem bereits beschriebenen Vorgehen zunächst 3 ml-Vorkulturen und dann 200 ml-Hauptkulturen angeimpft. Nach 16 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler wurden die Plasmide mit dem *NucleoBond Xtra Maxi-Kit* (Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers isoliert und anschließend deren Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt.

Abschließend wurden die Vektoren im *Zentrum für Molekulare Biowissenschaften* der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sequenziert und die Sequenzen der für den chimären EBU-141 IgG1 kodierenden DNA auf Korrektheit und Vollständigkeit überprüft. Dazu wurden jeweils 3 µl der *pSec-EBU-VL-kappa-LC-Full-No Tags* Plasmid-DNA mit je 1 µl der Primer *pSec CMV (forward)* und *pSec Reverse* und je 3 µl der *pSec-EBU-VH-wt-IgG1-HC-No Tags* Plasmid-DNA mit je 1 µl der Primer *pSec CMV (forward)*, *CH1(forward)*, *back 1 (reverse)*, *back 2 (reverse)* und *pSec Reverse* zur Sequenzierung gegeben. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und bezogen.

2.2.2.2 Expression von chEBU-141 in HEK-293T-Zellen durch Ca₂PO₄-Transfektion

Für die Expression von chEBU-141 wurden je 3×10⁶ HEK-293T-Zellen in sterilen 12 cm-Zellkulturplatten (Sarstedt) ausgesät und 16 h bei 37 °C inkubiert. Vor der Calciumphosphat-Transfektion wurden 8 ml frisches Medium pro Platte vorgelegt. Der Transfektionsansatz pro Platte enthielt 20 µg Gesamt-DNA (je 10 µg *pSec-EBU-VL-kappa-LC-Full-No Tags* und 10 µg *pSec-EBU-VH-wt-IgG1-HC-No Tags*), 100 µl 2,5 M CaCl₂ und 5 µl Chloroquin (100 mM) in 1 ml sterilem Wasser. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise im

Verhältnis 1:1 zu 2×HBS-Puffer gegeben und gleichzeitig mit einer zweiten Pipette Luft in das Gemisch geblasen. Anschließend wurden jeweils 2 ml pro Platte gleichmäßig auf die HEK-293T-Zellen verteilt und 8 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, verworfen und durch 10 ml frisches Medium pro Platte ersetzt. Nach drei und nach sechs Tagen erfolgten weitere Medienwechsel. Die Zellkulturüberstände wurden in sterilen 2 Liter-Flaschen gesammelt.

2.2.2.3 Reinigung von chEBU-141

Die Reinigung des chEBU-141 erfolgte analog zur Reinigung der murinen IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141. Die Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die *Capture Select IgG-CH1 Affinity Matrix* für humane IgG-Antikörper der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet wurde.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes in den Antikörperlösungen (EBU-65, EBU-141 und chEBU-141) sowie zur Überprüfung der Reinheit der Antikörper wurden die nachfolgend beschriebenen Verfahren angewendet. Die finale Antikörperkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Konzentrationen aus den drei Verfahren.

2.2.3.1 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Für die SDS-PAGE wurde ein 10 %iges Trenngel mit einem 10 %igen Sammelgel verwendet und nach Standardmethoden gegossen. Es wurden je 2 µl des reduzierenden SDS-PAGE-Ladepuffers zu 8 µl Antikörperlösung pipettiert und 5 min bei 94 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, bevor sie zentrifugiert (5 min, 3000 rpm) und danach in die Taschen des Gels pipettiert wurden. Als Größenstandard diente *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BioRad). Um die Proteinkonzentrationen abschätzen zu können, wurden parallel Verdünnungsreihen mit dem chimären CD20-Antikörper Rituximab bzw. eine IgM-Isotypkontrolle aufgetragen. Die Proben mit Rituximab und der IgM-Isotypkontrolle wurden analog zu den Proben mit EBU-65, EBU-141 und chEBU-141 behandelt. Die Gelelektrophorese wurde für 10 min bei 120 V und anschließend für weitere 50 min bei 150 V in SDS-PAGE-Laufpuffer durchgeführt.

Zur Färbung der Proteinbanden wurde das Gel über 16 h in Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend über mehrere Stunden mit Leitungswasser wieder entfärbt. Zur Dokumentation und Quantifizierung der Antikörperkonzentration wurde die *Quantity One 1-D Analysis Software* (BioRad) verwendet.

2.2.3.2 Bradford- und BCA-Assay

Zwei weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Proteinkonzentration sind die Bradford-Methode und die Biuret-Reaktion [83, 84]. Zur Erstellung von Eichgeraden wurden BSA-Reihen mit 25-2000 µg/ml hergestellt und parallel zu den Proben mit unbekannter Proteinkonzentration entweder mit dem *Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit* oder dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (beide Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die Absorption der Proben wurde bei 595 nm (Bradford) bzw. bei 562 nm (BCA) mit dem *Sunrise Remote* Photometer und der *Magellan – Data Analysis Software* der Firma Tecan in 96-well-Platten gemessen. Bei der Bradford-Methode steigt die Absorption des an das BSA gebundenen Coomassie-Farbstoffes bei 595 nm in diesem Konzentrationsbereich nahezu linear an und konnte so zur Bestimmung der Antikörperkonzentration genutzt werden [83]. Bei der Biuret-Reaktion entsteht ein violetter Komplex aus zwei BCA-Molekülen und einem Kupfer-Ion, dessen Menge linear zur Proteinkonzentration im alkalischen Milieu ist und eine starke Absorption bei 562 nm hat [84].

Für die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben wurde mit den BSA-Messwerten und deren gemessener Absorptionen bei der entsprechenden Wellenlänge jeweils eine Standardgerade erstellt. Die Berechnung der Konzentration der Antikörper erfolgte anschließend mit Hilfe der linearen Regressionsgeraden nach folgender Formel in *Microsoft Excel 2007*: $x = (y-b)/m$, wobei y die gemessene Absorption der Probe ist, b der Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y-Achse und m die Steigung der Eichgeraden.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Für alle FACS-Analysen wurden die Zellen (angegebene Zelllinie bzw. PBMC oder NK-Zellen) zunächst mit PBA-Puffer (1xPBS mit 1 % BSA) gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, 4 °C), mittels Trypanblaufärbung gezählt und mit kaltem PBA-Puffer auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Bindungskurven der EBU-Antikörper (EBU-65, EBU-141, chEBU-141) wurden je 100 µl Zellen pro Probe in FACS-Röhrchen vorgelegt, die Antikörper in den angegebenen Konzentrationen auf Eis hinzu pipettiert und mit den Zellen gemischt. Jeder Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend drei Mal mit je 1 ml kaltem PBA gewaschen. Die Zellpellets wurden in je 50 µl PBA mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (alle 1:20 in PBA verdünnt) resuspendiert und erneut 30 min auf Eis und lichtgeschützt inkubiert. Als Sekundärantikörper für diese indirekten FACS-Analysen wurde der *FITC-conjugated F(ab')₂ fragment Anti-Mouse IgG + IgM* für EBU-65 und EBU-141 und für chEBU-141 der *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG* bzw.

der *Goat Anti-Human Kappa-FITC* verwendet. Danach wurden die Proben erneut mit je 1 ml PBA gewaschen und anschließend in 500 µl kaltem PBA aufgenommen.

Für die FACS-Analysen der PBMC und NK-Zellen wurden je 10 µl direkt gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmarker auf NK-Zellen (CD56-PE) oder T-Zellen (CD3-APC) bzw. die entsprechenden Isotypkontrollen (IgG-PE, IgG-APC) zusammen mit je 10 µl des Vitalitätsfarbstoffs 7-AAD der Firma Beckman Coulter verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls 30 min auf Eis mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, einmal mit je 1 ml PBA gewaschen und anschließend in 500 µl kaltem PBA resuspendiert.

Für den Nachweis der Bindung des chEBU-141 an dasselbe Epitop/Antigen wie EBU-141 wurden je 500.000 Zellen 30 min entweder mit 200 µg/ml EBU-141 oder mit 100 µg/ml chEBU-141 inkubiert und nachfolgend einmal mit je 1 ml PBA gewaschen. Daraufhin wurden die Proben weitere 30 min mit 50 µl *FITC-conjugated F(ab')₂ fragment Anti-Mouse IgG + IgM* bzw. *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG* inkubiert. Für den Nachweis der Blockade des Epitops/Antigens durch EBU-141 wurde eine Probe nach der Inkubation mit 200 µg/ml EBU-141 einmal mit 1 ml PBA gewaschen, dann 30 min mit 100 µg/ml chEBU-141 inkubiert, erneut gewaschen und abschließend mit 50 µl *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment Goat Anti-Human IgG* weitere 30 min inkubiert. Alle Ansätze wurden nach einem letzten Waschschrift in 500 µl kaltem PBA aufgenommen.

Sämtliche Proben wurden mit entsprechenden Protokollen und Einstellungen am *Navios Flow Cytometer* gemessen und mit der *Kaluza-Software* (Version 1.1) von Beckman Coulter ausgewertet.

2.2.5 Proliferationsinhibition und Induktion des Zelltods

2.2.5.1 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Assay

Für die Versuche wurden 96-well-Zellkulturplatten mit einem finalen Volumen von 100 µl pro well verwendet. Die einzelnen Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert. Die Zielzellen wurden mit 30.000 Zellen pro Probe eingesetzt und ggf. Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen hinzu pipettiert. Die Platten wurden 72 h bei 37 °C inkubiert, bevor 25 µl MTS-Lösung (Promega) pro well hinzugegeben wurden. Die Proben wurden danach weitere 2-3 h im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm mit dem *Sunrise Remote* Photometer (Tecan) gemessen. Die gemessene Absorption bei 490 nm verhält sich proportional zur Anzahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen, da nur diese mit Hilfe ihrer mitochondrialen Enzyme das gelbliche Tetrazoliumsalz in das gemessene, braune

Formazan umwandeln können [85]. Die Prozentzahl lebender Zellen wurde relativ zu unbehandelten Zellen bzw. deren gemessener Absorption nach folgender Formel mit *Microsoft Excel 2007* berechnet:

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

Als Positivkontrolle für die Versuche mit den U266-Zellen wurde HM1.24-ETA⁺, ein auf dem *Pseudomonas*-Exotoxin A (ETA) basierenden Immuntoxin gegen HM1.24/CD317 verwendet, welches auf Myelomzellen exprimiert ist [80]. Für die Versuche mit den Daudi-Zellen wurde Rituximab als Positivkontrolle eingesetzt.

2.2.5.2 Induktion des Zelltods durch Kreuzvernetzung

Für diese Versuche wurden pro Ansatz 500.000 Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in je 100 µl kaltem PBA-Puffer resuspendiert und anschließend EBU-65, EBU-141 oder ein IgM-Isotypkontrollantikörper in den angegebenen Konzentrationen hinzu pipettiert. Alle Proben wurden 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze einmal mit R10⁺-Medium gewaschen (Zentrifugation bei 1600 rpm, 5 min) und in je 100 µl R10⁺-Medium resuspendiert, das 10 µg/ml *Goat Anti-Mouse IgM* als kreuzvernetzenden Sekundärantikörper enthielt. Die Proben wurden für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD* der Firma BioLegend nach Protokoll des Herstellers verwendet, die Proben innerhalb von 30 min mit dem *Navios Flow Cytometer* gemessen und mit der *Kaluza-Software* (Version 1.1) von Beckman Coulter ausgewertet.

2.2.6 Zytotoxizitätsversuche

2.2.6.1 Isolation humanen Serums und humaner Effektorzellen aus Blut

Alle im Weiteren beschriebenen Versuche wurden mit dem Einverständnis der betreffenden Personen durchgeführt (Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, AZ.: D467/15; siehe Punkt 7.3 im Anhang).

Die Isolierung humanen Serums aus dem peripheren Blut erfolgte am Tag der funktionellen Versuche. Dazu wurde gesunden Spendern in Serum-Monovetten (Sarstedt) Blut abgenommen und dieses 30 min auf Eis gelagert, bis es vollständig geronnen war. Anschließend wurden die Blutproben 20 min bei 2000 rpm zentrifugiert, das Serum abgenommen und in ein steriles 15-ml-Sarstedt-Röhrchen überführt.

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) gesunder Spender erfolgte steril mittels Dichtegradientenzentrifugation aus *Leucocyte Reduction Chambers* (LRC), die vom *UKSH Blutspendezentrum Kiel* als Abfallprodukte zur Verfügung gestellt wurden. Dazu wurde das Blut einer LRC in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit 1xPBS auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. In vier 50 ml-Röhrchen wurden je 20 ml *Lymphoflot* (Bio-Rad) vorgelegt, mit je 10 ml Blut überschichtet und anschließend 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten die durch ihre Dichte als deutliche Schicht erkennbaren PBMC abgenommen und in frische 50 ml-Röhrchen überführt werden. Die PBMC wurden zwei Mal mit 1xPBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min) bevor die verbliebenen Erythrozyten lysiert wurden (30 s Inkubation mit 45 ml kaltem, destilliertem Wasser; Abstoppen durch Zugabe von 5 ml 10xPBS). Die Zellen wurden daraufhin erneut mit 1xPBS gewaschen (Zentrifugation bei 1000 rpm, 10 min) und in 20 ml 1xPBS resuspendiert. Um Zellaggregate zu entfernen, wurden die Zellen abschließend durch ein 70 µm-Zellsieb (BD Biosciences) in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführt.

Zur Isolierung der NK-Zellen aus den PBMC wurde das *NK Cell Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec nach Protokoll des Herstellers verwendet, wodurch alle anderen Zellpopulationen magnetisch mithilfe von Antikörper-beladenen Beads entfernt wurden. Isolierte NK-Zellen (CD56-positiv) mit einer Reinheit von > 95 % wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml, die PBMC mit einer Dichte von 10×10^6 Zellen/ml in R10⁺-Medium für maximal 24 h in Zellkulturflaschen kultiviert, bevor sie für die funktionellen Versuche eingesetzt wurden.

2.2.6.2 Komplement-abhängige Zytotoxizität

In einem ersten Schritt wurden die Zielzellen mit 50-150 µl ^{51}Cr (100 µCi) für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend drei Mal mit R10⁺-Medium gewaschen, um extrazelluläres ^{51}Cr zu entfernen. Für die Versuche wurden 96-*well*-Mikrotestplatten mit runden Böden der Firma Sarstedt verwendet.

Für jeden Ansatz wurden 5.000 Zielzellen mit 50 µl frischem, humanem Serum und Medium auf ein Endvolumen von 200 µl/*well* eingestellt und ggf. 10 µl Antikörper/*well* zugegeben. Zur Bestimmung der basalen ^{51}Cr -Freisetzung (*Basal Release, BR*) wurden die Tumorzellen ohne Antikörper und Serum inkubiert. Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung (*Maximal Release, MR*) durch die Tumorzellen wurde durch die Zugabe von 100 µl 1 %igem Triton-X-100 ermittelt.

Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert, 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Je 25 µl Überstand/*well* wurden zu je 150 µl Szintillations-Mix (*Optiphase Super-Mix*) in eine *1450 MicroBeta 96-well*-Platte (beides von der Firma Perkin Elmer) überführt und 15 min geschüttelt, bevor die Freisetzung von ⁵¹Cr indirekt im *MicroBeta TriLux 1450 LSC & Luminescence Counter* (ebenfalls Perkin Elmer) in *counts per minute* (cpm) gemessen wurde.

Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

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

2.2.6.3 Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Die ADCC-Versuche wurden analog zu den CDC-Versuchen durchgeführt (siehe Punkt 2.2.6.2). Anstelle von Serum wurden humane Effektorzellen (PBMC im Verhältnis 80:1 und NK-Zellen im Verhältnis 10:1 zu den Zielzellen) eingesetzt.

Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte ebenfalls mit der unter Punkt 2.2.6.2 angegebenen Formel.

2.2.7 Statistische Analyse

Die graphische Auswertung und statistische Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Programm *GraphPad PRISM 4.0* (GraphPad Software). Signifikanzen (*p*-Werte) wurden mittels ANOVA und dem Bonferroni Post-Test berechnet. Die Nullhypothese wurde für *p* < 0,05 verworfen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von EBU-65 und EBU-141

3.1.1 Reinigung der murinen IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141

Die murinen Antikörper EBU-65 und EBU-141 wurden mittels Affinitätschromatographie mit Anti-Maus-IgM-Antikörper-Beads aus den Zellkulturüberständen der beiden Hybridom-Zelllinien gereinigt, die durch die Immunisierung von Mäusen mit der humanen Plasmazellleukämie-Zelllinie U266 von Gramatzki *et al.* 1991 generiert worden waren [28]. Um die Reinheit und Konzentration der Antikörper zu überprüfen, wurden diese zusammen mit einer Maus-IgM-Isotypkontrolle und einer Verdünnungsreihe des chimären Antikörpers Rituximab einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung unterzogen. Wie in Abb. 3.1 unter A zu erkennen (Darstellung einer repräsentativen SDS-PAGE), finden sich bei EBU-65 und EBU-141 deutliche Banden bei 75 kDa und bei etwa 23 kDa. Diese entsprechen dem zu erwartenden Molekulargewicht der schweren (75 kDa) und der leichten Kette (23 kDa) von Maus-IgM-Antikörpern und finden sich auch bei der Maus-IgM-Isotypkontrolle (K). Da keine weiteren Banden detektiert werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass die gereinigten Antikörper keine oder nur sehr geringe Verunreinigungen durch andere Proteine enthielten. Die Rituximab-Verdünnungsreihe diente gemeinsam mit den zusätzlich durchgeführten BCA- und Bradford-Assays zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Antikörper, die hier bei etwa 1,5 mg/ml für beide Antikörper lag. Die durchschnittliche Proteinausbeute betrug für EBU-65 0,92 mg und für EBU-141 0,59 mg pro Liter Zellkulturüberstand.

Zur Überprüfung des Isotyps wurden jeweils 1 µg/ml EBU-65 und EBU-141 in einem ELISA für die Bestimmung des Isotyps von Maus-Antikörpern eingesetzt (Abb. 3.1 B, Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses). Es zeigte sich, wie bereits zuvor von Gramatzki *et al.* beschrieben, dass sowohl EBU-65 als auch EBU-141 Maus-IgM-Antikörper sind, die kappa-Leichtketten tragen [28]. Als Kontrolle diente TH-69, ein muriner IgG1κ-Antikörper, dessen Isotyp zuvor bekannt war und durch den ELISA bestätigt wurde [79].

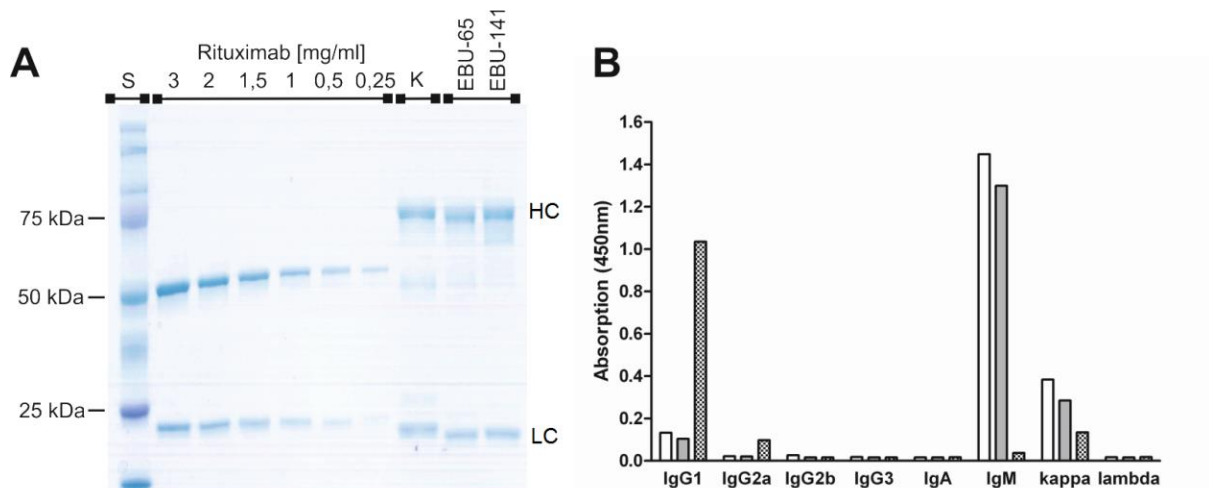


Abb. 3.1 Coomassie-Gel und Bestimmung des Isotyps von EBU-65 und EBU-141

(A) Die aus den Hybridomüberständen gereinigten Antikörper EBU-65 und EBU-141 sowie eine Maus-IgM-Isotypkontrolle (K) wurden zusammen mit definierten Konzentrationen von Rituximab für eine denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen verwendet und das Gel anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. S=Größenstandard. HC=*heavy chain* (schwere Kette), LC=*light chain* (leichte Kette). (B) Ergebnisse eines repräsentativen ELISA für die Bestimmung des Isotyps von Maus-Antikörpern, für den je 1 µg/ml EBU-65 (weiße Balken), EBU-141 (graue Balken) und TH-69 (karierte Balken) eingesetzt worden sind. Die gemessene Absorption bei 450 nm ist für die verschiedenen Isotypen und Leichtketten gezeigt.

3.1.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens

Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurde anschließend die Bindung von EBU-65 und EBU-141 auf verschiedenen Zelllinien untersucht. Wie von Gramatzki *et al.* bereits teilweise beschrieben [28], binden beide Antikörper auf den Myelom-Zelllinien U266, INA-6 und INA-6.Tu1, nicht jedoch auf RPMI-8226 und L363 (Abb. 3.2 A). Darüber hinaus konnte eine Bindung auf primären Patientenzellen, die aus dem Pleurapunktat eines Patienten mit Multiplem Myelom/Plasmazellleukämie gewonnen worden waren und auf den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji CS nachgewiesen werden (Abb. 3.2 A).

Zur Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50} -Werte¹) von EBU-65 und EBU-141 wurde die dosisabhängige Bindung auf den Zelllinien U266, Daudi und Raji CS gemessen (Abb. 3.2 B). Die EC_{50} -Werte lagen für beide Antikörper im nanomolaren Bereich. Dabei waren die Werte mit 22,2 nM (95 % KI: 14,4-34,4 nM) und 16,7 nM (95 % KI: 12,2-23,3 nM) für EBU-65 sowie 11,1 nM (95 % KI: 4,4-23,3 nM) und 10 nM (95 % KI: 7,8-12,2 nM) für EBU-141 auf den Burkitt-Lymphom-Linien Daudi und Raji CS vergleichbar, aber für beide Antikörper mit 14,4 nM (95 % KI: 5,6-37,8 nM; EBU-65) und 3,3 nM (95 % KI: 2,2-5,6 nM; EBU-141) höher als für die U266-Zelllinie. Insgesamt waren die EC_{50} -Werte

¹ Zur besseren Vergleichbarkeit mit dem später beschriebenen chimären IgG1-Antikörper chEBU-141 werden die EC_{50} -Werte in molarer Konzentration angegeben.

von EBU-141 auf den untersuchten Zelllinien geringer als für EBU-65, was auf eine höhere Avidität von EBU-141 hindeuten könnte.

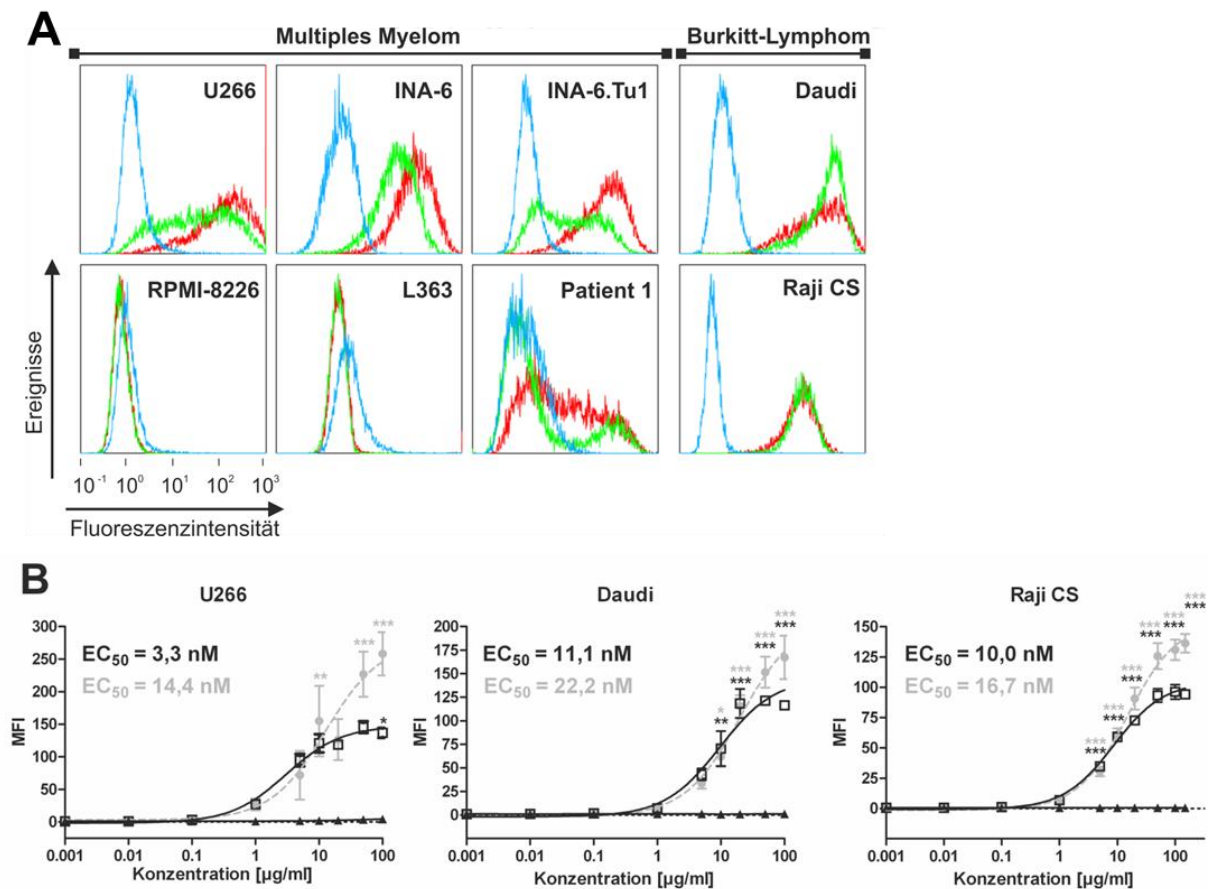


Abb. 3.2 Bindung von EBU-65 und EBU-141 auf Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zellen

(A) **Bindung auf verschiedenen Tumorzelllinien.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen mit je 10 $\mu\text{g/ml}$ EBU-65 (rote Linie), EBU-141 (grüne Linie) und einer Maus-IgM-Isotypkontrolle (blaue Linie) auf der angegebenen Zelllinie. (B) **Dosisabhängige Bindung auf U266, Daudi und Raji CS.** Gezeigt sind Dosiskurven von EBU-65 (●) und EBU-141 (□), sowie einer Maus-IgM-Isotypkontrolle (▲) auf den jeweils angegebenen Zelllinien. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. $n = 3$.

3.1.3 Direkte Effektormechanismen

Zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von EBU-65 und EBU-141 wurden zunächst direkte Effektormechanismen der IgM-Antikörper untersucht. Mittels MTS-Assay, der auf der mitochondrialen Enzymaktivität lebender Zellen beruht, wurde der Einfluss von EBU-65 und EBU-141 auf die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien analysiert. Es kam durch die dreitägige Inkubation von U266-, Daudi- sowie Raji CS-Zellen (Raji CS nicht dargestellt) mit EBU-65 bzw. EBU-141 in einer Konzentration von je 10 $\mu\text{g/ml}$ zu keiner Proliferationsinhibition (Abb. 3.3 A). Daher scheint die Bindung der Antikörper an ihre

Zielantigene auf der Oberfläche der Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zellen keinen direkten Einfluss auf deren Wachstum zu haben.

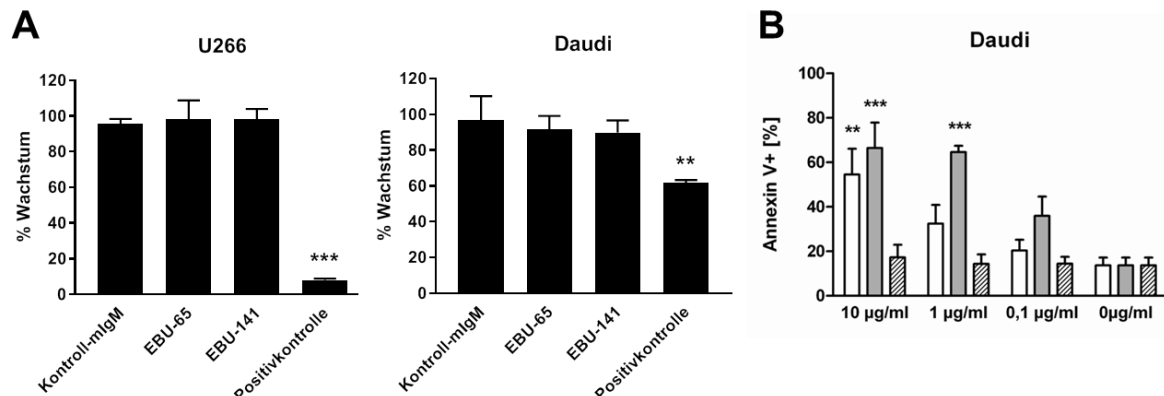


Abb. 3.3 Direkte Effektormechanismen von EBU-65 und EBU-141

(A) Dargestellt sind die Ergebnisse eines MTS-Assays nach dreitägiger Inkubation von Zellen der jeweiligen Zelllinie mit jeweils 10 µg/ml EBU-65 und EBU-141. n=3 (U266), n=5 (Daudi). (B) Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Induktion des Zelltods auf Daudi-Zellen nach sekundärer Kreuzvernetzung von EBU-65 (weiße Balken), EBU-141 (graue Balken) und einer Maus-IgM-Isotypkontrolle (gestreifte Balken) in verschiedenen Konzentrationen durch einen *Goat Anti-Mouse* IgM-Antikörper. n=3. *** p<0,001; ** p<0,01.

Es konnte hingegen gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung von EBU-65 und EBU-141 durch einen *Goat Anti-Mouse*-IgM-Antikörper auf der Oberfläche von Daudi-Zellen konzentrationsabhängig und ab einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml (EBU-141) bzw. 10 µg/ml (EBU-65) signifikant den Zelltod induziert, wohingegen die Maus-IgM-Isotypkontrolle keinen Effekt hatte (Abb. 3.3 B). In diesem Versuch wurden nach 24 h Inkubation durchflusszytometrisch Annexin V⁺- und 7-AAD⁺-Zellen gemessen. Der durchflusszytometrische Nachweis von Annexin V auf der Zelloberfläche gilt als Indiz für den Zelltod und frühapoptotische Zellen, da dieses Protein an Phosphatidylserine bindet, die bei vitalen Zellen nur intrazellulär vorkommen [86]. Der prozentuale Anteil von Annexin V⁺-Tumorzellen war für alle verwendeten Dosierungen von 0,1 µg/ml bis 10 µg/ml mit EBU-141 höher als für EBU-65 und erreichte bereits bei 1 µg/ml etwa 70 %. Mit EBU-65 konnte durch die Kreuzvernetzung auf der Zelloberfläche in einer Konzentration von 10 µg/ml bei etwa 50 % der Zellen der Zelltod induziert werden.

3.1.4 Indirekte Effektormechanismen

Zur weiteren Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von EBU-65 und EBU-141 wurden die indirekten Effektormechanismen dieser Antikörper untersucht. Da Maus-IgM-Antikörper in der Regel keine humanen Immunzellen für die Tumorzelllyse rekrutieren können [87], wurden ausschließlich ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche mit humanem Serum für die Analyse der CDC-Aktivität durchgeführt. Humanes C1q, welches das Initiator-molekül der

klassischen Komplementkaskade ist, kann auch an Maus-IgM-Antikörper binden [88]. Die Inkubation von EBU-65 und EBU-141 führte im Vergleich zur Maus-IgM-Isotypkontrolle konzentrationsabhängig zur signifikanten Lyse von U266-Tumorzellen, wohingegen Antigen-negative L363-Zellen, auf denen die Antikörper nicht binden, nicht lysiert wurden (Abb. 3.4 A). Diese Daten belegen die Antigen-abhängige spezifische Lyse der humanen Tumorzellen durch EBU-65 und EBU-141 über die Aktivierung des humanen Komplementsystems. Ab einer eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml konnten signifikante Lysen ($p < 0,001$) beider Antikörper im Vergleich zur Maus-IgM-Isotypkontrolle ermittelt werden. Bei einer sättigenden Konzentration von 100 µg/ml wurden maximale Zelllysen von etwa 30 % (EBU-65) bzw. etwa 40 % (EBU-141) erreicht. Der ermittelte EC_{50} -Wert von EBU-141 für die U266-Myelomzellen war mit 3,3 nM (95 % KI: 2,2-13,3 nM) kleiner als der von EBU-65, welcher 5,6 nM (95 % KI: 2,2-14,4 nM) betrug. Beide Antikörper waren damit in nanomolaren Konzentrationen in der Lage, die humanen Myelomzellen über CDC zu lysieren.

Die Versuche wurden anschließend mit den gegenüber Komplementlyse sensitiven Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji CS (CS=*complement-sensitive*) durchgeführt. Für EBU-65 und EBU-141 konnte zuvor auf beiden Zelllinien eine Bindung nachgewiesen werden. Für beide Antikörper zeigte sich für die Daudi-Zellen und die Raji CS-Zellen eine signifikante Antikörper-vermittelte Tumorzelllyse (Abb. 3.4 B). Sowohl EBU-141 als auch EBU-65 vermittelten konzentrationsabhängig eine Zytotoxizität von maximal bis zu 50 % (Raji CS) bzw. 60 % (Daudi) der Zellen, wohingegen keine komplementabhängigen zytotoxischen Effekte durch die Maus-IgM-Isotypkontrolle auftraten. Die Zelllysen waren ab einer eingesetzten Konzentration von 0,1 µg/ml (EBU-141) bzw. 1 µg/ml (EBU-65) auf den Daudi-Zellen und ab einer eingesetzten Konzentration von 0,01 µg/ml (EBU-141) bzw. 0,1 µg/ml (EBU-65) auf den Raji CS-Zellen signifikant gegenüber der Isotypkontrolle. Der EC_{50} -Wert von EBU-141 erreichte auf den Raji CS-Zellen 10 pM (95 % KI: 7,8-22,2 pM) und lag auch auf den Daudi-Zellen mit 114 pM (95 % KI: 25,6-392,2 pM) im pikomolaren Bereich. Für EBU-65 konnte auf den Raji CS-Zellen ein EC_{50} -Wert von 40 pM (95 % KI: 17,8-83,3 pM) ermittelt werden, wohingegen er auf den Daudi-Zellen bei 264 pM (95 % KI: 113,3-617,8 pM) lag. Im Vergleich zu den U266-Myelomzellen konnten die Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji CS effektiver durch die Antikörper lysiert werden. So wurden insgesamt höhere maximale Zelllysen und EC_{50} -Werte im pikomolaren Bereich erreicht. Insgesamt zeigte sich eine bessere CDC-Aktivität von EBU-141 gegenüber EBU-65 auf den drei untersuchten Zelllinien, wobei beide Antikörper sehr effektiv waren.

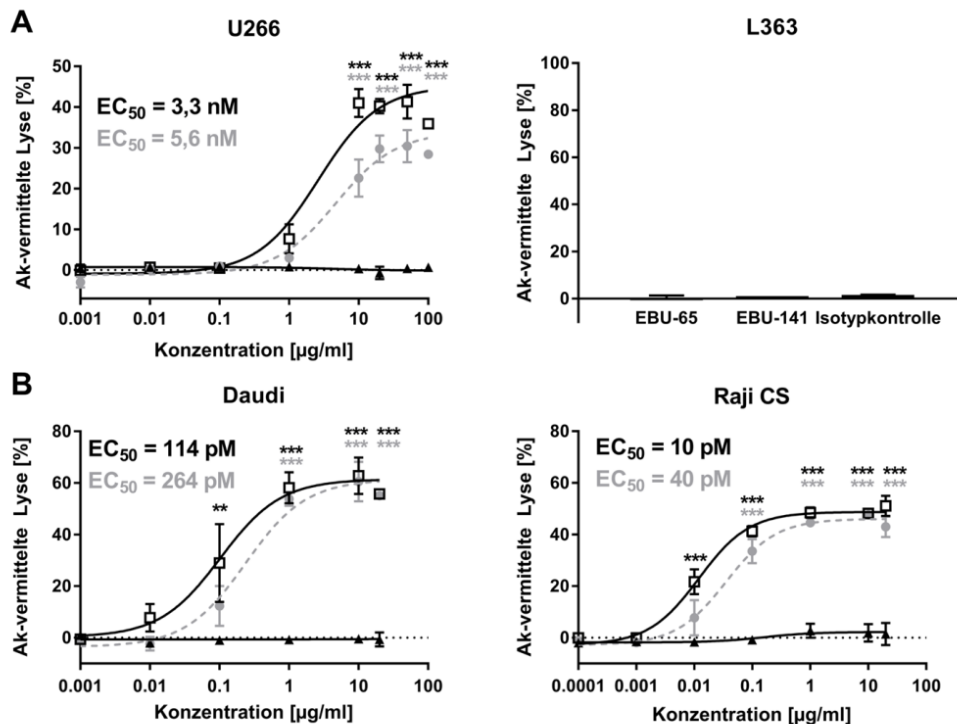


Abb. 3.4 CDC-Aktivität von EBU-65 und EBU-141 im ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuch

(A) **Dosisabhängige Tumorzelllyse.** Dargestellt sind die Ergebnisse von ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuchen mit Dosiskurven von EBU-65 (●) bzw. EBU-141 (□) auf U266-Zellen im Vergleich zur Maus-IgM-Isotypkontrolle (▲). Auf den Antigen-negativen L363-Zellen wurden die Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. n=7 (U266), n=2 (L363). (B) **Zytotoxizität gegenüber Burkitt-Lymphom-Zelllinien.** Gezeigt sind Dosiskurven von EBU-65 (●) und EBU-141 (□) auf der angegebenen Zelllinie im Vergleich zu einer Maus-IgM-Isotypkontrolle (▲). Für alle Versuche wurden je 50 µl frisches humanes Serum verwendet. n=5 (Daudi), n=3 (Raji CS). *** p<0,001; ** p<0,01.

Gegenüber den Myelom-Zelllinien INA-6, INA-6 Tu.1 und den primären Tumorzellen eines Myelompatienten zeigten EBU-65 und EBU-141 keine CDC-Aktivität (siehe Abb. 7.1 im Anhang unter Punkt 7.2). Zusätzlich wurden primäre Endothelzellen (HUVEC-Zellen) gesunder Spender untersucht, da eine Bindung von EBU-141 auf Endothelzellen bei Gramatzki *et al.* beschrieben worden war [28]. Auch hier zeigte sich kein zytotoxischer Effekt von EBU-65 und EBU-141 (siehe Abb. 7.1), was hinsichtlich potentieller Nebenwirkungen im Rahmen einer möglichen therapeutischen Anwendung ein positives Ergebnis ist.

3.2 Charakterisierung von chEBU-141

3.2.1 Herstellung und Reinigung von chEBU-141

Hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Anwendung beim Menschen ist eine teilweise Humanisierung der murinen Antikörper EBU-141 oder EBU-65 notwendig. Da der EBU-141-Antikörper dem EBU-65-Antikörper sowohl in Bezug auf die direkten als auch die indirekten Effekte sowie hinsichtlich der Avidität überlegen war und auch seine Zielstruktur CD75s bekannt ist, wurde dieser Maus-IgM-Antikörper für die Chimärisierung und Herstellung von

chEBU-141 ausgewählt. Dafür wurde die Gesamt-RNA des EBU-141-Hybridoms isoliert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe spezifischer Primer die variablen Regionen (V-Regionen) durch PCR amplifiziert. Dabei deckten die Primer die V-Regionen der kappa-Leichtketten sowie der schweren Ketten aller Maus-Immunglobulinfamilien ab.

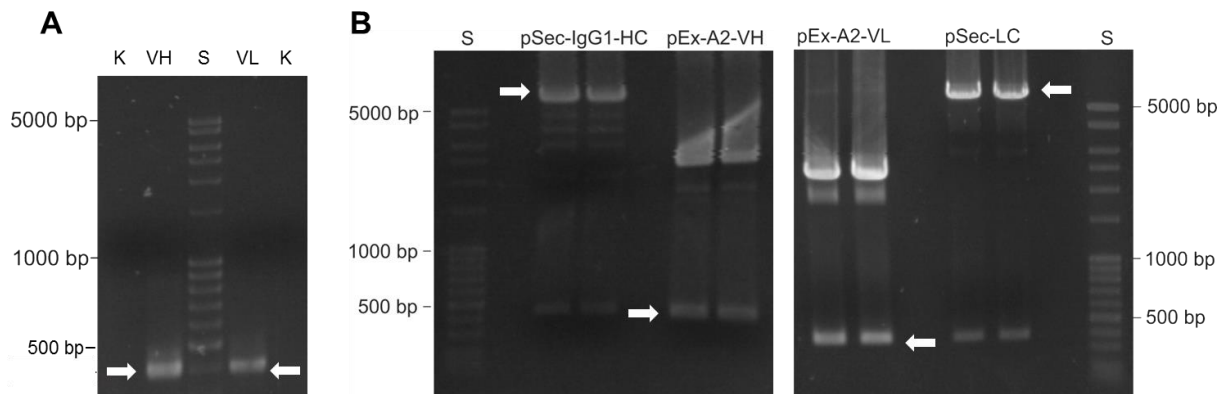


Abb. 3.5 Agarosegele zur Herstellung von chEBU-141

(A) PCR-Produkte. Gezeigt ist das Agarosegel mit den PCR-Produkten der V-Regionen-Amplifikation der schweren (VH) und leichten Kette (VL) von EBU-141. **(B) Restriktionsverdau der Expressionsplasmide.** Dargestellt sind die Restriktionsverdau der *pSec*-Vektoren und der *pEX-A2*-Vektoren für die Herstellung von chEBU-141. Die relevanten DNA-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. S=Größenstandard. K=Wasserkontrolle.

Wie in Abb. 3.5 unter A dargestellt, konnten sowohl für die variablen Regionen der schweren Ketten (VH) als auch für die variablen Regionen der leichten Ketten (VL) spezifische PCR-Produkte mit je ca. 400 bp amplifiziert werden. Entsprechende Wasserkontrollen waren negativ. Die Auswahl der EBU-141-VL und EBU-141-VH erfolgte wie im Material- und Methodenteil unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben. Die Sequenzen wurden von der Firma Eurofins synthetisiert und in *pEX-A2*-Vektoren (*pEX-A2-VH* und *pEX-A2-VL*) geliefert. Um die variablen Regionen von EBU-141 aus den *pEX-A2*-Vektoren in *pSec*-Vektoren zu klonieren, welche bereits die genetischen Informationen für die konstanten Regionen der kappa-Leichtkette (*pSec-LC*) und der schweren Kette humaner IgG1-Antikörper (*pSec-IgG1-HC*) enthielten, wurden die Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (für nähere Informationen siehe Material- und Methodenteil unter Punkt 2.2.1.1). Die so entstandenen DNA-Fragmente (VH und VL: je ca. 400 bp; *pSec-IgG1-HC*: ca. 6500 bp; *pSec-LC*: ca. 5800 bp; in Abb. 3.5 durch Pfeile gekennzeichnet) konnten durch Agarosegelelektrophorese getrennt, aus den Gelen ausgeschnitten und für die Klonierung der Expressionsplasmide *pSec-EBU-VL-kappa-LC-Full-No Tags* und *pSec-EBU-VH-wt-IgG1-HC-No Tags* verwendet werden (Abb. 3.5 B). Vor der Verwendung der Plasmide wurde deren Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

Für die Herstellung des chimären EBU-141-IgG1-Antikörpers chEBU-141 wurden beide Expressionsplasmide im Verhältnis 1:1 mittels Calciumphosphat in HEK-293T-Zellen transient transfiziert und chEBU-141 aus dem Zellkulturüberstand affinitätschromatographisch gereinigt. Wie in Abb. 3.6 unter A zu sehen (Darstellung einer repräsentativen SDS-PAGE), konnten mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung für chEBU-141 ausschließlich Banden bei 50 kDa und 25 kDa detektiert werden. Diese entsprechen dem zu erwartenden Molekulargewicht der schweren (50 kDa) und leichten (25 kDa) Kette von IgG1-Antikörpern und finden sich auch bei Rituximab, der hier sowohl als IgG1-Isotypkontrolle als auch zum Abschätzen der Proteinkonzentration von chEBU-141 diente, welche hier bei etwa 3 mg/ml lag. Die durchschnittliche Proteinausbeute von chEBU-141 lag bei 2,5 mg pro Liter Zellkulturüberstand. Die Konzentration des Antikörpers wurde durch die Abschätzgele und mit Hilfe von Bradford- und BCA-Assays ermittelt und ergab sich aus dem Mittelwert aller drei Verfahren.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten sowohl für Rituximab als auch für chEBU-141 Banden bei ~150 kDa detektiert werden, die dem zu erwartenden Molekulargewicht von IgG1-Antikörpern entsprechen (Abb. 3.6).

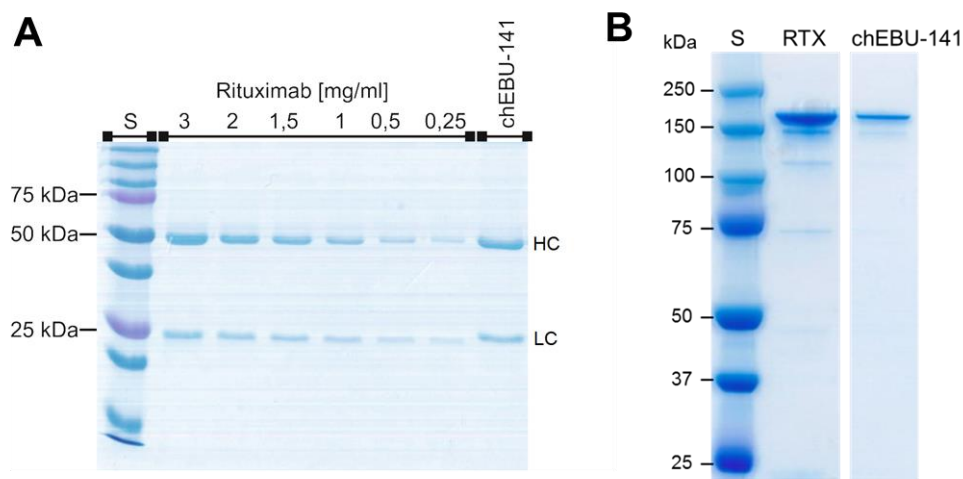


Abb. 3.6 Coomassie-Gele von chEBU-141

Der aus den Zellkulturüberständen gereinigte Antikörper chEBU-141 wurde gemeinsam mit definierten Konzentrationen von Rituximab für eine denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden (A) und nicht reduzierenden (B) Bedingungen verwendet und das Gel anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. S=Größenstandard. HC=*heavy chain* (schwere Kette), LC=*light chain* (leichte Kette). RTX=Rituximab.

3.2.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens

Zunächst wurde untersucht, ob chEBU-141 dasselbe Antigen/Epitop, wie der murine IgM-Antikörper EBU-141 bindet. Hierzu wurden durchflusszytometrische Analysen auf U266-

Zellen durchgeführt. Durch Vorinkubation mit EBU-141, der in einer sättigenden Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt worden war, konnte die Bindung von chEBU-141 in einer Konzentration von 100 µg/ml vollständig blockiert werden (Abb. 3.7 A). Dies deutet darauf hin, dass beide Antikörper das gleiche Antigen/Epitop binden und durch die Chimärisierung keine Änderung des gebundenen Epitops erfolgt ist.

Anschließend konnte, wie in Abb. 3.7 unter B dargestellt, mit durchflusszytometrischen Messungen eine Bindung von chEBU-141 (in einer Konzentration von 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml) auf den Myelom-Zelllinien U266, INA-6, INA-6.Tu1 und auf primären Patientenzellen sowie zusätzlich auf den Burkitt-Lymphom-Linien Daudi und Raji CR nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden auch hier die Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und L363 mitgeführt, auf denen analog zu EBU-141 ebenfalls keine Bindung von chEBU-141 detektiert werden konnte.

Zur Ermittlung der EC_{50} -Werte wurde die dosisabhängige Bindung von chEBU-141 in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 1500 µg/ml auf den Zelllinien Daudi und Raji CR untersucht (Abb. 3.7 C). Eine im Vergleich zum Kontrollantikörper signifikante Bindung konnte ab einer eingesetzten Konzentration von 50 µg/ml (Daudi) bzw. 200 µg/ml (Raji CR) gemessen werden. Die EC_{50} -Werte lagen für beide untersuchten Zelllinien für chEBU-141 im micromolaren Bereich [Daudi: 2,2 µM (95 % KI: 1,63-3,08 µM); Raji CR: 3,5 µM (95 % KI: 2,3-5,3 µM)]. Verglichen mit den EC_{50} -Werten von EBU-141 ist die Bindung von chEBU-141 auf den untersuchten Zelllinien deutlich geringer, was möglicherweise auf die bivalente Bindung von chEBU-141 im Gegensatz zur möglichen dekavalenten Bindung von EBU-141 zurückzuführen ist.

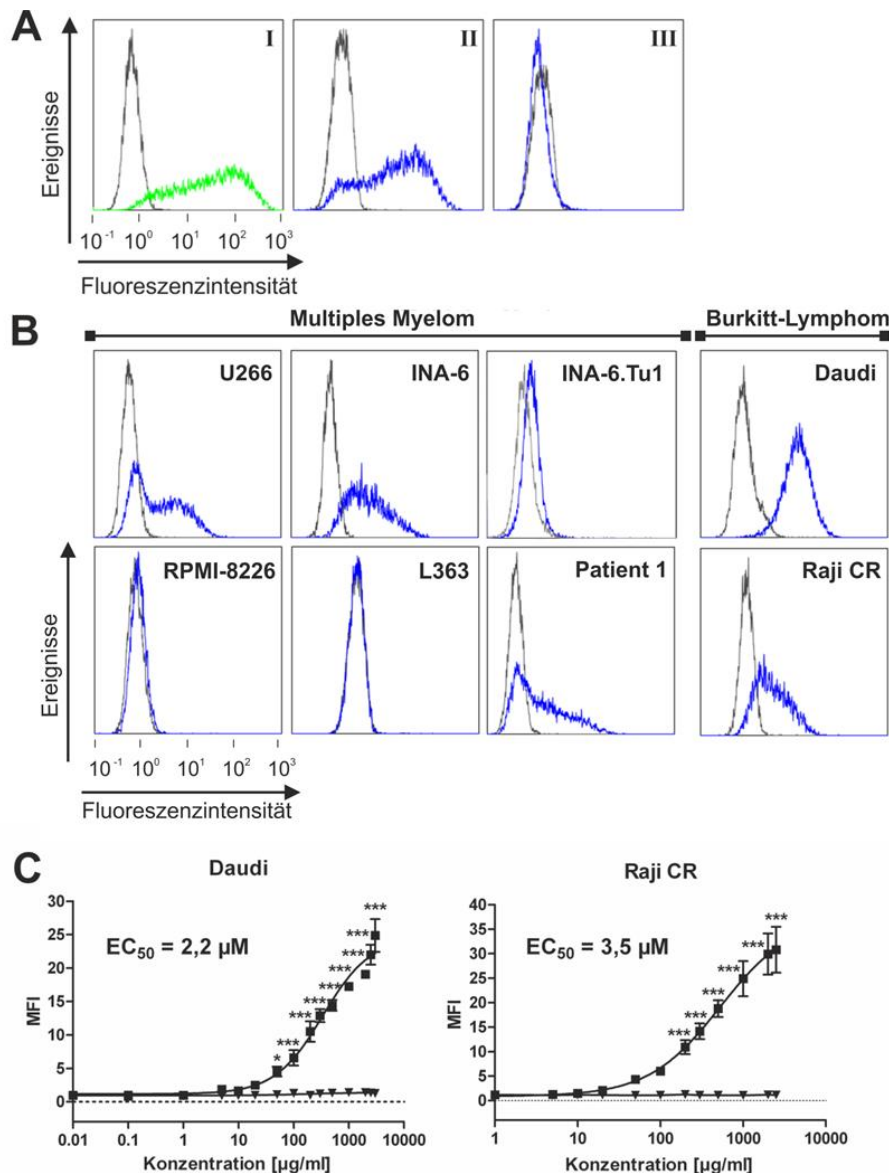


Abb. 3.7 Bindung von chEBU-141

(A) **Bindung von EBU-141 und chEBU-141.** Gezeigt sind durchflusszytometrische Analysen von 200 $\mu\text{g/ml}$ EBU-141 (I, grüne Linie), sowie 100 $\mu\text{g/ml}$ chEBU-141 (II, blaue Linie) bzw. zunächst 200 $\mu\text{g/ml}$ EBU-141 und anschließend 100 $\mu\text{g/ml}$ chEBU-141 (III) auf U266-Zellen im Vergleich zu Ansätzen, die nur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (graue Linie) inkubiert worden waren. (B) **Bindung auf verschiedenen Tumorzelllinien.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Messungen mit je 50 $\mu\text{g/ml}$ chEBU-141 (blaue Linie) bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ chEBU-141 (INA-6, INA-6.Tu1 und primäre Patientenzellen) auf den Zellen der angegebenen Zelllinie im Vergleich zu Ansätzen, die nur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert worden waren. (C) **Dosiskurven.** Gezeigt sind Dosiskurven von chEBU-141 (■) auf Zellen der Zelllinien Daudi und Raji CR im Vergleich zu einer IgG1-Isotypkontrolle (▼). *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. $n = 3$.

3.2.3 Direkte Effektormechanismen

Für die Charakterisierung der direkten zytotoxischen Effekte von chEBU-141 wurde exemplarisch der Einfluss auf die Proliferation der Zelllinien U266 als Beispiel für das Multiple Myelom und Daudi aus der Gruppe der Burkitt-Lymphome mittels MTS-Assay untersucht. Es

zeigte sich keine Proliferationsinhibition durch chEBU-141 (Abb. 3.8). Dieses Ergebnis ist analog zum Ursprungsantikörper EBU-141.

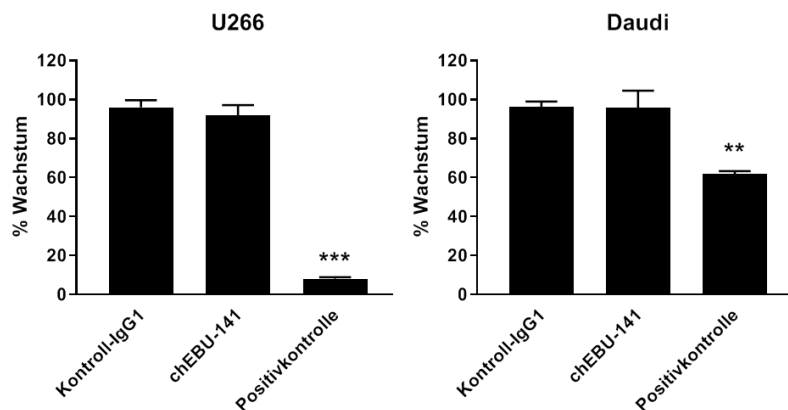


Abb. 3.8 Keine Proliferationsinhibition von reifen B-Zell-Lymphomzellen durch chEBU-141

Dargestellt sind die Ergebnisse eines MTS-Assays nach dreitägiger Inkubation der Zellen der angegebenen Zelllinie mit 10 µg/ml chEBU-141. n=2. *** p<0,001; ** p<0,01.

Die Untersuchung der Induktion des programmierten Zelltods durch Kreuzvernetzung des Antikörpers auf der Zelloberfläche, einer Eigenschaft von EBU-141, steht für chEBU-141 noch aus.

3.2.4 Indirekte Effektormechanismen

Zur Evaluation der indirekten Effektormechanismen wurden zunächst ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche mit den Zelllinien Daudi und Raji CS mit chEBU-141 und humanem Serum durchgeführt, um die CDC-Aktivität von chEBU-141 zu evaluieren. Im Gegensatz zu den murinen IgM-Antikörpern EBU-65 und EBU-141, die mit 10 µg/ml in sättigender Konzentration eingesetzt wurden und die erwartet signifikant hohen Lyseraten zeigten (vergleiche auch Abb. 3.4), hatte die Inkubation mit 100 µg/ml chEBU-141 keine zytotoxischen Effekte auf die untersuchten Zelllinien (Abb. 3.9). Daher scheint die Rekrutierung von C1q und die Initiation der klassischen Komplementkaskade durch den bivalent und deutlich schwächer an die Tumorzellen bindenden chEBU-141 nicht so effizient zu erfolgen wie durch die pentameren IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141.

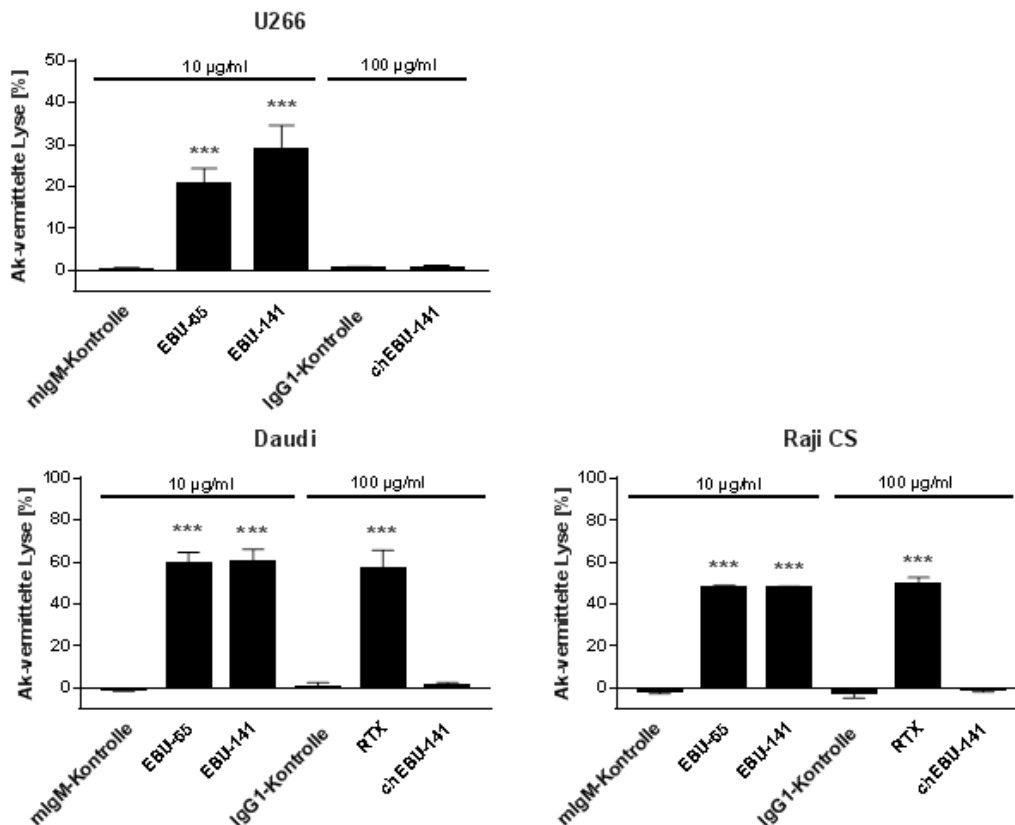


Abb. 3.9 Vergleich der CDC-Aktivität von EBU-65, EBU-141 und chEBU-141

Dargestellt sind die Ergebnisse von 51 Chrom-Freisetzungsversuchen mit je 10 µg/ml EBU-65 und EBU-141 sowie 100 µg/ml chEBU-141 mit den Zellen der angegebenen Zelllinie und 50 µl frischen humanen Serums. Als Kontrollantikörper dienten eine Maus-Isotypkontrolle und eine IgG1-Isotypkontrolle. mIgM-Kontrolle = Maus-IgM-Isotypkontrolle. n=7 (U266), n=5 (Daudi), n=3 (Raji CS). *** p<0,001.

Im Gegensatz zu murinen IgM-Antikörpern sind humane/chimäre IgG1-Antikörper prinzipiell in der Lage humane Immunzellen für die Tumorzelllyse zu rekrutieren [8]. Daher wurden 51 Chrom-Freisetzungsversuche mit humanen PBMC und isolierten NK-Zellen als zellulären Effektorzellen zur Untersuchung der ADCC-Aktivität von chEBU-141 durchgeführt. Durchflusszytometrische Analysen vor Beginn der Versuche dienten zur Kontrolle der Vitalität und Reinheit der verwendeten Effektorzellen (Abb. 3.10). In den PBMC und NK-Zellen wurde durch die Inkubation mit PE- und APC-gekoppelten Antikörpern gegen CD56 (NK-Zell-Marker) und CD3 (T-Zell-Marker) der Anteil der NK-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass der Anteil von NK-Zellen (CD56⁺) in den PBMC, die für die ADCC-Versuche verwendet wurden, spenderabhängig zwischen 7 % und 26 % variierte. In dem in Abb. 3.10 gezeigten Beispiel waren vor der NK-Zell-Isolation 16,64 % CD56⁺ NK-Zellen in den PBMC vorhanden, deren Anteil sich auf 95,94 % durch die magnetische Zellseparation erhöhte. Der Anteil an kontaminierenden CD3⁺ T-Zellen lag hier bei 0,28 %. Für die sich anschließenden ADCC-Versuche wurden nur NK-Zell-Präparationen verwendet, die mehr als 90 % CD56⁺

NK-Zellen enthielten und eine Vitalität von über 90 % aufwiesen. Eine hohe Vitalität von über 90 % war ebenfalls Voraussetzung für die Verwendung der PBMC in den ADCC-Experimenten.

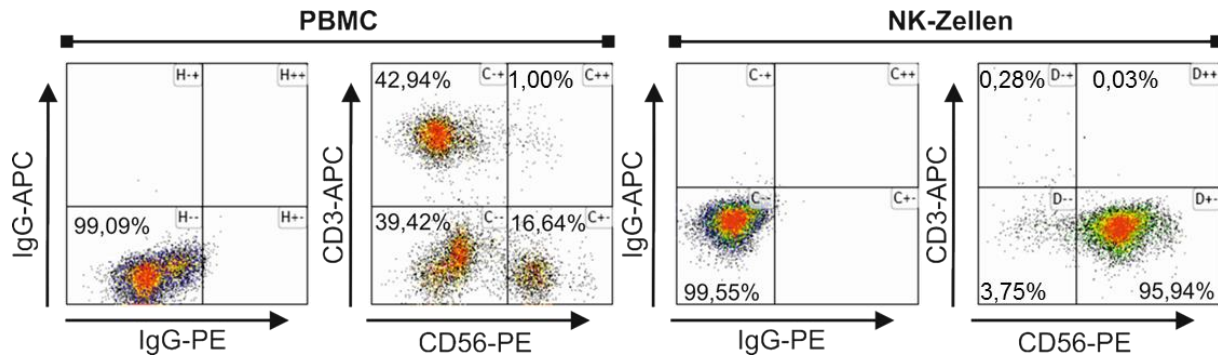


Abb. 3.10 Durchflusszytometrische Analysen der PBMC und NK-Zellen

Gezeigt sind durchflusszytometrische Analysen der PBMC und NK-Zellen unmittelbar vor deren Verwendung in $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD56 und CD3 bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen IgG-PE und IgG-APC und dem Vitalitätsfarbstoff 7-AAD inkubiert und anschließend der Anteil von CD56⁺-NK-Zellen und CD3⁺-T-Zellen in den 7-AAD-negativen Zellen gemessen.

Zunächst wurde die ADCC-Aktivität von chEBU-141 gegenüber U266-Zellen, sowie Daudi- und Raji CR-Zellen (CR = *complement-resistant*) mit humanen PBMC als Effektorzellen untersucht. Diese wurden in einem Verhältnis von 80:1 zu den Tumorzellen eingesetzt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Antikörper-vermittelte Zelllyse von allen drei Zelllinien, wohingegen keine zytotoxischen Effekte durch die IgG1-Isotypkontrolle auftraten (Abb. 3.11 A). Die Antikörper wurden in einem Dosisbereich von 0,01 µg/ml bis 100 µg/ml getestet. Ab einer eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml konnten signifikante Zelllysen gegenüber dem Kontrollantikörper gemessen werden. Mit in sättigender Konzentration eingesetztem chEBU-141 konnten signifikante Zelllysen erreicht werden. Die ermittelten EC₅₀-Werte lagen für alle untersuchten Zelllinien im nanomolaren Bereich [U266: 111,4 nM (95 % KI: 353,3-1613,3 nM); Daudi: 26,7 nM (95 % KI: 6,7-80,0 nM); Raji CR: 133,3 nM (KI: 53,3-353,3)]. Anschließend wurden Versuche durchgeführt, in denen gereinigte NK-Zellen als Effektorzellen in einem Verhältnis von 10:1 zu den Tumorzellen eingesetzt wurden (Abb. 3.11 B). NK-Zellen exprimieren den aktivierenden FcγRIIIA als in der Regel einzigen Rezeptor, an den IgG1-Antikörper binden können.

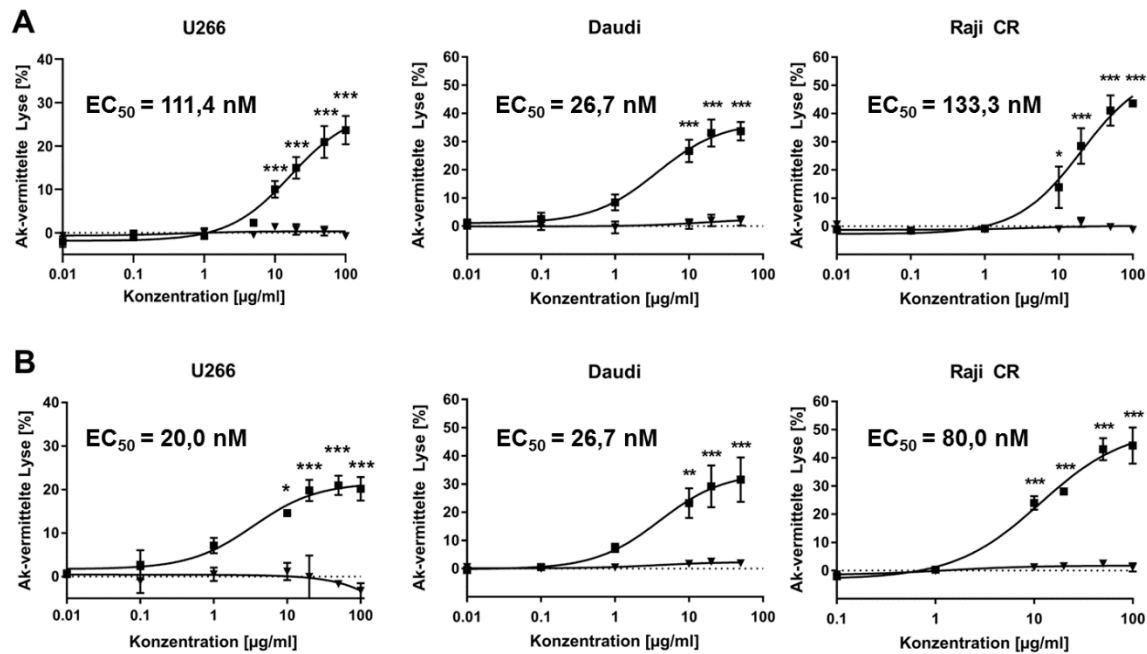


Abb. 3.11 ADCC-Aktivität von chEBU-141 im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuch

(A) **Multiples Myelom und Burkitt-Lymphom mit PBMC.** Gezeigt sind die Antikörper-vermittelten, dosisabhängigen Zelllysen nach der Inkubation von Zellen der angegebenen Zelllinie mit chEBU-141 (●) im Gegensatz zu einer IgG1-Isotypkontrolle (▼). Als Effektorzellen wurden PBMC im Verhältnis von 80:1 zu den Tumorzellen verwendet. $n=7$ (U266), $n=7$ (Daudi), $n=3$ (Raji CR). (B) **Multiples Myelom und Burkitt-Lymphom mit NK-Zellen.** Dargestellt sind Dosiskurven von chEBU-141 (●) und einer IgG1-Isotypkontrolle (▼) auf den angegebenen Zelllinien. Die Tumorzellen wurden gemeinsam mit NK-Zellen im Verhältnis 10:1 und dem jeweiligen Antikörper inkubiert. $n=4$ (U266), $n=5$ (Daudi), $n=2$ (Raji CR). *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

Die Antikörper-vermittelte Zelllyse durch chEBU-141 war auch mit NK-Zellen für alle drei getesteten Zelllinien ab einer eingesetzten Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant gegenüber der IgG1-Isotypkontrolle (Abb. 3.11 B). Die ermittelten EC_{50} -Werte für die drei verwendeten Zelllinien lagen mit 20 nM (95 % KI: 6,7-80 nM; U266), 26,7 nM (95 % KI: 6,7-200 nM; Daudi) und 80 nM (95 % KI: 40,0-153,3 nM; Raji CR) im nanomolaren Bereich. Dies zeigt, dass chEBU-141 NK-Zellen rekrutieren und mit Hilfe dieser Effektorzellen eine effektive Tumorzelllyse auslösen kann.

Hinsichtlich der hier untersuchten, indirekten Effektormechanismen hat der parentale EBU-141-Antikörper somit durch die Chimärisierung zwar seine CDC-Aktivität gegenüber den getesteten reifen B-Zell-Neoplasien verloren, besitzt jedoch als chEBU-141 eine signifikante ADCC-Aktivität und ist in der Lage, NK-Zellen als wichtige Effektorzellpopulation für die Tumorzelllyse zu rekrutieren.

4 DISKUSSION

Die murinen IgM-Antikörper EBU-65 und EBU-141 zeigen, wie von Gramatzki *et al.* beschrieben [28], Reaktivität gegenüber reifen B-Zell-Neoplasien wie dem Multiplen Myelom und Burkitt-Lymphom. Sie sind in der Lage, nach sekundärer Kreuzvernetzung des Antikörpers auf der Zelloberfläche den Zelltod zu induzieren und besitzen eine potente CDC-Aktivität gegenüber Tumorzelllinien. Der im Rahmen dieser Arbeit aus dem Hybridomantikörper EBU-141 neu generierte chimäre IgG1-Antikörper chEBU-141 zeigt eine um den Faktor 100 niedrigere Avidität auf den untersuchten Zelllinien. Er besitzt im Gegensatz zu EBU-141 keine CDC-Aktivität mehr, zeigt jedoch eine potente ADCC-Aktivität gegenüber den untersuchten Zelllinien. Dabei ist chEBU-141 in der Lage, effektiv NK-Zellen als Effektorzellen für die Tumorzelllyse zu rekrutieren.

Die Hybridomantikörper EBU-65 und EBU-141 waren durch die Immunisierung von Mäusen mit der humanen Myelomzelllinie U266 generiert und von Gramatzki *et al.* vorrangig bezüglich ihrer Bindungseigenschaften und ihrer Reaktivität gegenüber gesunden und malignen hämatopoetischen Zellen charakterisiert worden. Dabei zeigten beide Antikörper eine hohe Spezifität für reife B-Zell-Neoplasien und wenig Reaktivität mit gesunden Geweben [28]. Hinsichtlich der Bindung auf ausgewählten Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien zeigte sich, dass der in dieser Arbeit für die potentielle klinische Anwendung beim Menschen neu generierte chEBU-141 ein ähnliches Bindungsmuster wie der parentale murine Antikörper EBU-141 aufweist und, wie Kreuzkompetitionsexperimente zeigen konnten, dasselbe Antigen bindet. Auf den Raji-, Daudi- und U266-Zellen war die Bindung von chEBU-141 gegenüber EBU-141 um den Faktor 100 schwächer. So lagen die EC_{50} -Werte von chEBU-141 für diese drei exemplarisch näher untersuchten Zelllinien im micromolaren Bereich, wohingegen diejenigen von EBU-141 im nanomolaren Bereich lagen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende bzw. schwächere Bindung von chEBU-141 findet sich in den Isotypen der Antikörper. IgM-Antikörper zeichnen sich aufgrund ihrer Eigenschaft der Zusammenlagerung zu Pentameren durch eine hohe Avidität aus [5]. IgG-Antikörper hingegen lagern sich nicht zu Pentameren zusammen und besitzen daher im Gegensatz zu IgM-Antikörpern statt zehn nur zwei Antigenbindestellen, wodurch ihre Gesamtbindungsstärke geringer ist.

Die Affinität eines Antikörpers ist ein kritischer Parameter bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern. Daher wurden Verfahren entwickelt, mit Hilfe derer die Bindungsstärke

von Antikörpern *in vitro* molekularbiologisch gesteigert werden kann. Diese sind an die Affinitätsreifung *in vivo* angelehnt, bei denen die Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen im Zuge der B-Zell-Reifung durch Mutationen in den variablen Regionen erhöht wird [89]. Eine weit verbreitete Methode ist die von Leung *et al.* entwickelte *error prone PCR*. Grundlage dieses Verfahrens ist die durch veränderte Versuchsbedingungen erhöhte Fehlerrate der verwendeten DNA-Polymerase während der PCR, infolge derer es auch zu Punktmutationen in den V-Regionen der Antikörper kommt [90]. Zur Selektion der so diversifizierten Antikörper hinsichtlich ihrer Antigenaffinität kann die *Phage Display*-Methode in Kombination mit dem immobilisierten Antigen und einem ELISA-Screening verwendet werden, bei der hochaffin bindende Antikörper identifiziert werden können [91, 92]. So können mit Hilfe einer *error prone PCR* und anschließender Selektion mittels *Phage Display* die Bindungseigenschaften eines Ursprungsantikörpers in Bezug auf seine Antigenaffinität optimiert werden, wie das Beispiel eines CD96-Antikörpers aus unserer Arbeitsgruppe zeigt [93]. Da EBU-141 und damit auch chEBU-141 eine hohe Spezifität für reife B-Zell-Neoplasien und wenig Reaktivität mit gesunden Zellen und Geweben aufweisen [28] – einem wichtigen Kriterium für die therapeutische Entwicklung eines Antikörpers – könnte dieses Verfahren in Zukunft auch für die Erhöhung der Affinität von chEBU-141 für CD75s angewendet werden.

Sowohl EBU-141 als auch chEBU-141 binden an CD75s, einem Neuraminidase-sensitiven sialylierten Lactosamin, dessen Expression von der Enzymaktivität der β -Galactosid α -2,6-Sialyltransferase abhängig ist [30, 32]. CD75s wird vor allem von Tumorzellen wie reifen malignen B-Zellen, Tumorzellen des Magenkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms sowie von Mammakarzinomen, aber auch von gesundem Gewebe, wie beispielsweise reifen B-Zellen sowie Endothel- und Epithelzellen, exprimiert [28, 33–35]. Posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Kohlenhydratgruppen, stellen eine potentiell interessante Antigen-Gruppe dar, da sich im Rahmen der Tumorgenese auch die komplexen Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen verändern. Diese Tumor-assoziierten Kohlenhydratgruppen können beispielsweise als neues Merkmal von Tumorzellen exprimiert werden, wohingegen sie sich nicht auf gesunden Zellen befinden. Werden sie hingegen auch von gesunden Zellen exprimiert, können sie jedoch auf Tumorzellen in höherem Ausmaß detektiert werden [94]. Einige gegen derartige Strukturen gerichtete Antikörper (u. a. RAV12) sind Gegenstand derzeitiger Forschung. RAV12 ist ein monoklonaler chimärer IgG1-Antikörper, der gegen RAAG12, eine

Kohlenhydratstruktur, gerichtet ist [95]. RAAG12 wird u. a. von verschiedenen Adenokarzinomen des Kolons, Magens oder Pankreas exprimiert [96]. Burris *et al.* konnten in einer klinischen Phase I-Studie zeigen, dass RAV12 in der Therapie von fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren wirksam ist [97]. So stellen Kohlenhydratstrukturen insgesamt einen interessanten Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie mittels monoklonaler Antikörper dar. Aufgrund seines Expressionsprofils könnte auch CD75s eine mögliche Zielstruktur in der Therapie von reifen B-Zell-Neoplasien sein.

Um die Eignung des gegen CD75s gerichteten Antikörpers EBU-141 sowie von EBU-65 für die Tumorthherapie zu evaluieren, wurden sowohl direkte als auch indirekte Effektorfunktionen der Antikörper mit Hilfe von Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien im Labor analysiert. Zu den direkten Wirkmechanismen zählen die Induktion des Zelltods oder die Wachstumsinhibition. Die indirekten Effektormechanismen umfassen die Zelllyse über CDC, ADCC oder ADCP [3, 15]. In der Untersuchung der Antikörper-vermittelten Effektormechanismen konnten weder EBU-65 noch EBU-141 die Proliferation von reifen B-Zell-Lymphom-Linien inhibieren. Beide Antikörper waren jedoch in der Lage, nach sekundärer Kreuzvernetzung den Zelltod von Daudi-Zellen zu induzieren und zeigten eine sehr potente CDC-Aktivität gegenüber verschiedenen reifen B-Zell-Neoplasien. Die Aktivierung des Komplementsystems für die Tumorzelllyse ist ein wichtiger indirekter Effektormechanismus von therapeutischen Antikörpern. Im Rahmen der Charakterisierung von EBU-141 und EBU-65 wurde auch die CDC-Aktivität gegenüber HUVEC-Zellen, Endothelzellen eines gesunden menschlichen Spenders, untersucht, da Gramatzki *et al.* eine Bindung auf Endothelzellen beschrieben hatten [28]. Es konnten keine zytotoxischen Effekte der EBU-Antikörper nachgewiesen werden. Dies ist ein wichtiges Erkenntnis hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Anwendung der Antikörper, da ein Ziel der Antikörpertherapie die spezifische Aktivität gegenüber Tumorzellen unter Schonung von gesundem Gewebe ist.

Murine Antikörper wie EBU-65 und EBU-141 sind nur begrenzt therapeutisch einsetzbar, da sie nach wiederholter Applikation zur Bildung von humanen anti-Maus Antikörpern (HAMA) führen können, die gegen immunogene Epitope der murinen Antikörper gerichtet sind [98, 99]. Die eingesetzten Antikörper werden von den HAMA gebunden und neutralisiert, sodass sie keinen therapeutischen Effekt mehr besitzen [100–102]. Diese Problematik in der Therapie mit murinen Antikörpern führte in der Vergangenheit dazu, dass Strategien, wie beispielsweise die Chimärisierung oder Humanisierung, bei der große Teile der

Mausantikörpersequenzen durch humane Antikörpersequenzen (meist IgG1) ausgetauscht werden, entwickelt wurden, um die Immunogenität von therapeutischen Antikörpern zu reduzieren [103, 104]. Chimäre und humanisierte Antikörper führen nicht mehr oder nur in geringerem Ausmaß zur Bildung von Antikörpern, die gegen sie gerichtet sind [humane anti-chimäre Antikörper (HACA), humane anti-humanisierte Antikörper (HAHA)] und sind somit besser für die Therapie geeignet [105–107]. So wurden seit der Zulassung des ersten chimären Antikörpers Rituximab 1997 mehr als 20 chimäre, humanisierte und humane Antikörper, meist vom IgG1-Isotyp, für die Tumorthherapie zugelassen [4, 14]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Chimärisierung des murinen EBU-141 zu chEBU-141, bei dem nur noch die variablen Regionen von dem ursprünglichen murinen Antikörper stammen und alle anderen Bereiche die eines humanen IgG1-Antikörpers sind, ist daher ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung beim Menschen. EBU-141 wurde aufgrund seiner im Vergleich zu EBU-65 höheren Effektivität hinsichtlich der Antikörper-vermittelten Effektormechanismen und des bekannten Antigens CD75s für die Chimärisierung ausgewählt.

Humane IgG1-Antikörper können, neben der Aktivierung des Komplementsystems durch die Bindung von C1q, insbesondere auch Immunzellen für Antikörper-vermittelte zelluläre Effektormechanismen wie ADCC und ADCP rekrutieren. Zudem können sie effektiver als murine (IgM-) Antikörper mit den verschiedenen Komponenten des humanen Immunsystems interagieren [108, 109].

Im Gegensatz zur potenten CDC-Aktivität von EBU-141 zeigte sich keine CDC-Aktivität von chEBU-141 gegenüber den verwendeten Zelllinien. Damit eine Bindung von C1q und somit eine Aktivierung des Komplementsystems durch IgG1-Antikörper erfolgen kann, müssen sich diese auf der Zelloberfläche zu Dimeren oder größeren Komplexen zusammenlagern. Dabei wird das Komplementsystem umso effektiver aktiviert, je größer der Komplex (Trimer < Tetramer < Pentamer < Hexamer) und je näher dieser am Hexamer ist. Die Eigenschaften des Antigens, die Antigendichte, die Affinität und das Epitop des Antikörpers sowie die Anzahl der gebundenen Antikörper auf der Oberfläche haben dabei einen Einfluss. Ist die Antigendichte gering, so kommen IgG-Antikörper nach Bindung ihres Antigens oft nicht in räumliche Nähe zueinander und das niedrig-affine C1q-Molekül kann sich nicht anlagern [110, 111]. Bei gleicher Antigendichte können IgM-Antikörper durch ihre Eigenschaft der Zusammenlagerung zu Pentameren das Komplementsystem effektiver aktivieren, welches den Vorteil von EBU-141 gegenüber chEBU-141 hinsichtlich der CDC-Aktivität erklären könnte. Die CDC-Aktivität ist ein potentiell wichtiger Effektormechanismus therapeutischer

Antikörper. So kann beispielsweise Rituximab, als bis dato einer der wichtigsten Antikörper in der Therapie von B-Zell-Lymphomen, wahrscheinlich auch *in vivo* über seinen Fc-Teil humanes C1q binden und die klassische Komplementkaskade auslösen [23]. Der Beitrag der CDC-Aktivität zur anti-tumoralen Wirkung im Patienten ist aber nach wie vor nicht abschließend geklärt. Studien belegen allerdings, dass bei CLL-Patienten nach einer Rituximab-Infusion Komplementproteine im Blut schnell depletiert und komplement-regulatorische Proteine auf Lymphomzellen im Blut von CD20-Antikörper-therapierten Patienten hochreguliert sind [112, 113].

Im Rahmen der Weiterentwicklung und Optimierung von Antikörpern kann deren zytotoxisches Potential durch verschiedene Formen des *Fc-Engineerings* erhöht werden. Diebolder *et al.* konnten zeigen, dass sich verschiedene gegen CD20- und EGFR-gerichtete IgG1-Antikörper nach Bindung ihres Antigens auf der Zelloberfläche zu Hexameren anordnen. Diese Anordnung ist vergleichbar mit der pentameren Struktur von IgM-Antikörpern und kann damit als Angriffspunkt für C1q dienen, um dieses effektiv auf der Zelloberfläche zu fixieren (Abb. 4.1) [111, 114].

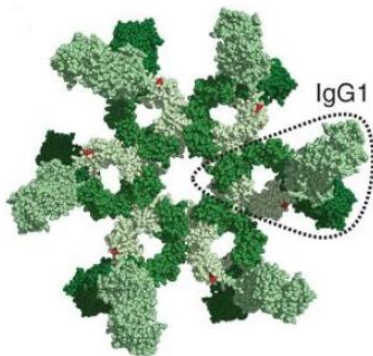


Abb. 4.1 Hexamerbildung von IgG1-Antikörpern

Dargestellt ist die Hexamerbildung von IgG1-Antikörpern mittels Interaktionen der Fc-Teile über nicht-kovalente Bindungen (übernommen aus Diebolder *et al.* [111]).

Die Hexamerisierung entsteht mittels Interaktionen der Fc-Teile der Antikörper über nicht-kovalente Bindungen. Die C1q-Bindestelle befindet sich bei humanen IgG1-Antikörpern in der CH2-Domäne. Ist diese nach der Hexamerbildung zugänglich, kann es zur Bindung von C1q und zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade kommen. Darüber hinaus können diese Fc-Interaktionen über gezielte Mutationen gesteigert werden, welches zu einer verstärkten Neigung zur Hexamerbildung führt und mit einer daraus resultierenden effektiveren Aktivierung des Komplementsystems einhergeht [111]. So führen u. a. die Mutationen E430G und E345K zu einer gesteigerten Hexamerisierung von IgG1-Antikörpern auf der Zelloberfläche. Hieraus resultiert eine potentere CDC-Aktivität der mutierten Antikörper

im Vergleich zum Wildtyp, wobei es aber zu keiner Antigen-unabhängigen Komplement-aktivierung kommt. De Jong *et al.* konnten dies am Beispiel von CD20-Antikörpern zeigen [115]. Das Verfahren der Hexamerisierung stellt eine Möglichkeit in der Weiterentwicklung des chEBU-141 dar, um ggf. die verloren gegangene CDC-Aktivität wiederzuerlangen, die der parentale EBU-141 als potenten Wirkmechanismus gegenüber B-Zell-Neoplasien aufwies.

Im Gegensatz zum parentalen EBU-141 besitzt chEBU-141 als chimärer IgG1-Antikörper eine potente ADCC-Aktivität gegenüber verschiedenen reifen B-Zell-Lymphom-Zelllinien. Es konnten sowohl mit PBMC als auch mit isolierten NK-Zellen als Effektorzellen EC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich gegenüber Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien ermittelt werden. Die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität wird als ein Hauptwirkmechanismus vieler therapeutisch eingesetzter Antikörper angesehen. So vermitteln beispielsweise die in der Myelomtherapie zugelassenen Antikörper Daratumumab und Elotuzumab sowie der in der Therapie von B-Zell-Lymphomen genutzte Antikörper Rituximab ihre zytotoxische Wirkung u. a. über ADCC [23, 24, 49, 51]. Da NK-Zellen in der Regel den aktivierenden $Fc\gamma RIIIA$ exprimieren, gelten sie als wichtige Effektorzellpopulation für die Tumorzelllyse über ADCC. Es wird jedoch mehr und mehr auch die Bedeutung myeloischer Effektorzellen/Makrophagen erkannt [20]. Eine potentielle ADCP-Aktivität von chEBU-141 gegen Tumorzellen durch die Rekrutierung von Makrophagen soll in Zukunft noch untersucht werden.

Eine weitere Form des *Fc-Engineerings* ist das sog. *Glyco-Engineering*, dessen Ziel die Änderung des Glykosylierungsprofils eines Antikörpers zur Verbesserung der ADCC-Aktivität ist [116, 117]. Shields *et al.* konnten zeigen, dass gering fukosylierte Antikörper eine gesteigerte Affinität zum $Fc\gamma RIIIA$ auf NK-Zellen besitzen, sodass diese effektiver für die Zelllyse rekrutiert werden können und es infolgedessen zu einer verbesserten ADCC-Aktivität kommt [118]. Eine verminderte Fukosylierung kann u. a. durch die Antikörperproduktion in Lec13-Zellen erreicht werden, die eine verminderte Fukosylierungsaktivität besitzen. Auch eine Antikörperproduktion in Zellen, die die $\beta 1,4$ -N-Acetylglucosaminyltransferase (GnT-III) überexprimieren, führt zu einer herabgesetzten Fukosylierung der entsprechenden Antikörper [119, 120].

Das Verhältnis der Affinität des Fc-Teils zwischen inhibierenden und aktivierenden $Fc\gamma R$ ist die Grundlage des *Protein-Engineerings*, bei dem das Protein-Grundgerüst im Fc-Teil durch gezielte Mutationen, wie bereits für die Hexamerisierung und die C1q-Bindung beschrieben, modifiziert wird [116]. Lazar *et al.* konnten Mutationen im Fc-Teil identifizieren (z. B.

S239D-I332E-A330L), die zu einer verstärkten Affinität des mutierten IgG1-Antikörpers zum aktivierenden Fc γ RIIIA im Verhältnis zum inhibierenden Fc γ RIIB führen und somit das Verhältnis zu Gunsten von aktivierenden Fc γ R auf den Effektorzellen beeinflussen. Mittels dieser Mutationen konnte die ADCC-Aktivität von verschiedenen IgG1-Antikörpern gegenüber deren Wildtyp hinsichtlich des EC₅₀-Wertes und der maximal erreichten Zelllyse *in vitro* signifikant verbessert werden [117].

Sowohl das *Glyco*- als auch das *Protein-Engineering* könnten in der Weiterentwicklung von chEBU-141 angewendet werden, um dessen Zytotoxizität zu optimieren. So könnte die bereits nachgewiesene potente ADCC-Aktivität von chEBU-141 mittels der beschriebenen Verfahren weiter gesteigert werden, um die bestmögliche Effektivität dieses neuen CD75s-Antikörpers hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung bei reifen B-Zell-Neoplasien wie dem Multiplen Myelom oder Burkitt-Lymphom zu erreichen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der seit 2015 zugelassenen therapeutischen monoklonalen Antikörper Daratumumab und Elotuzumab zur Behandlung des Multiplen Myeloms und dem bereits fest etablierten Rituximab in der Therapie von B-Zell-Lymphomen profitieren nicht alle Patienten von diesen Therapieoptionen. Insbesondere das Multiple Myelom hat nach wie vor eine schlechte Prognose. Neue Oberflächenmoleküle für zielgerichtete Immuntherapien könnten die Behandlung und das Überleben der Patienten in Zukunft weiter verbessern.

CD75s (ursprüngliche Bezeichnung CDw75) ist ein Neuraminidase-sensitives sialyliertes Lactosamin auf der Zelloberfläche von reifen B-Zell-Neoplasien, wie dem Multiplen Myelom oder dem Burkitt-Lymphom, und könnte als Antigen im Rahmen einer Antikörpertherapie Potential für die Behandlung dieser Erkrankungen haben. Die murinen IgM-Antikörper EBU-141 und EBU-65 binden selektiv an CD75s (EBU-141) sowie an ein verwandtes Antigen, welches, angelehnt an die ursprüngliche Nomenklatur von CD75s, als „CDw75-like“ (EBU-65) bezeichnet wurde und bisher nicht näher charakterisiert ist. Beide Antikörper zeigen nur wenig Reaktivität gegenüber gesundem Gewebe.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Bindungseigenschaften und Effektor-mechanismen dieser Antikörper *in vitro*, um anhand der Ergebnisse einen abgeleiteten chimären Antikörper herzustellen, dessen therapeutisches Potential für die Behandlung reifer B-Zell-Neoplasien beim Menschen evaluiert werden sollte.

Wie bereits von Gramatzki *et al.* 1991 beschrieben, konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass die Hybridomantikörper EBU-65 und EBU-141 auf verschiedenen Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien, sowie auf primären Patientenzellen binden. Bei der Charakterisierung der Wirkmechanismen dieser Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführt wurde, zeigt sich insbesondere eine potente Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) gegenüber den getesteten Tumorzelllinien. Darüber hinaus kann EBU-141 den Zelltod von B-Zell-Lymphom-Zellen nach sekundärer Kreuzvernetzung des Antikörpers auf der Zelloberfläche induzieren. Aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften wurde der gegen CD75s gerichtete Antikörper EBU-141 für die Herstellung eines chimären Antikörpers ausgewählt. Die variablen Regionen von EBU-141 wurden isoliert und der chimäre IgG1κ-Antikörper chEBU-141 im Zuge dieser Arbeit generiert und produziert. chEBU-141 zeigt die erwartete Reaktivität gegenüber CD75s auf Myelom- und Burkitt-Lymphom-Linien, wobei die Bindungsstärke im Gegensatz zum parentalen IgM-Antikörper

EBU-141 – wie zu erwarten war – geringer ist. Die Komplement-abhängige Zytotoxizität von EBU-141 gegenüber den untersuchten Zelllinien konnte für den chimären IgG1-Antikörper chEBU-141 nicht mehr nachgewiesen werden. Allerdings vermittelt dieser neue Antikörper eine potente Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegenüber reifen B-Zell-Neoplasien durch die effektive Rekrutierung von humanen PBMC oder NK-Zellen als Effektorzellen.

CD75s ist durch sein Expressionsmuster ein interessantes Antigen für die Immuntherapie von reifen B-Zell-Neoplasien. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bindungseigenschaften als auch die potente Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) des neuen, chimären, gegen CD75s gerichteten IgG1-Antikörpers chEBU-141 vielversprechende Eigenschaften für einen immuntherapeutischen Ansatz beim Multiplen Myelom oder Burkitt-Lymphom darstellen und die weitere Evaluation von chEBU-141 sinnvoll erscheint. Mittels verschiedener Verfahren, wie beispielsweise einer Affinitätsreifung oder dem *Fc-Engineering*, könnten die Affinität und die Effektorfunktionen von chEBU-141 optimiert werden, um das zytotoxische Potential des Antikörpers hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung noch weiter ausschöpfen zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ehrlich P (1908). **Experimental researches on specific therapy. On Immunity with special relationship between distribution and action of antigens.** Harben Lecture. London.
2. Strebhardt K, Ullrich A (2008). **Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress.** *Nat Rev Cancer*. 8. 473–480.
3. Weiner LM, Murray JC, Shuptrine CW (2012). **Antibody-based immunotherapy of cancer.** *Cell*. 148. 1081–1084.
4. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ (2012). **Antibody therapy of cancer.** *Nat Rev Cancer*. 12. 278–287.
5. Rassow J (2012). **Molekulare Immunologie.** In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg.). *Duale Reihe Biochemie*. Aufl. 3. 653–698. Thieme. Stuttgart
6. Dudek RW (2006). **High-Yield: Cell & Molecular Biology.** Aufl. 2. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
7. Kaufmann SHE (2014). **Basiswissen Immunologie.** Aufl. 7. Springer. Berlin / Heidelberg.
8. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014). **IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.** *Front Immunol*. 5. Artikel 520.
9. Köhler G, Milstein C. (1975). **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature*. 256. 495–497.
10. Carter PJ (2006). **Potent antibody therapeutics by design.** *Nat Rev Immunol*. 6. 343–357.
11. Vermorken Jan B., Mesia Ricard, Rivera Fernando, Remenar Eva, Kawecki Andrzej, Rottey Sylvie, Erfan Jozsef, Zabolotnyy Dmytro, Kienzer Heinz-Roland, Cupissol Didier, Peyrade Frederic, Benasso Marco, Vynnychenko Ihor, De Raucourt Dominique, Bokemeyer Carsten, Schueler Armin, Amellal Nadia, Hitt Ricardo (2008). **Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer.** *N Engl J Med*. 359. 1116–1127.
12. Pegram MD, Lipton A, Hayes, D. F., Weber, BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twadeell T, Glaspy JA, Slamon DJ (1998). **Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment.** *J Clin Oncol*. 16. 2659–2671.
13. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, van Cutsem E (2004). **Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med*. 351. 337–345.
14. Almagro JC, Daniels-Wells TR, Perez-Tapia SM, Penichet ML (2017). **Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy.** *Front Immunol*. 8. 1751.
15. Redman JM, Hill EM, AlDeghaither D, Weiner LM (2015). **Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer.** *Mol Immunol*. 67. 28–45.
16. Weiner GJ (2015). **Building better monoclonal antibody-based therapeutics.** *Nat Rev Cancer*. 15. 361–370.
17. Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008). **Fcγ receptors as regulators of immune responses.** *Nat Rev Immunol*. 8. 34–47.
18. Cartron G (2002). **Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene.** *Blood*. 99. 754–758.

19. Jakubowiak A, Offidani M, Pégourie B, La Rubia J de, Garderet L, Laribi K, Bosi A, Marasca R, Laubach J, Mohrbacher A, Carella AM, Singhal AK, Tsao LC, Lynch M, Bleickardt E, Jou Y-M, Robbins M, Palumbo A (2016). **Randomized phase 2 study: Elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM.** *Blood*. 127. 2833–2840.
20. Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A (2015). **FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities.** *Trends Immunol.* 36. 325–336.
21. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S (2009). **Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy.** *Lancet*. 373. 1033–1040.
22. Scheuermann RH, Racila E (1995). **CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy.** *Leuk Lymphoma*. 18. 385–397.
23. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson (1994). **Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody CD20.** *Blood*. 83. 435–445.
24. Weers M de, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, Mutis T, Bleeker WK, Anderson KC, Lokhorst HM, van de Winkel JGJ, Parren PWHI (2011). **Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of Multiple Myeloma and other hematological tumors.** *J Immunol*. 186. 1840–1848.
25. Ryan MC, Hering M, Peckham D, McDonagh CF, Brown L, Kim KM, Meyer DL, Zabinski RF, Grewal IS, Carter PJ (2007). **Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells.** *Mol Cancer Ther*. 6. 3009–3018.
26. Epstein AL, Marder RJ, Winter JN, Fox RI (1984). **Two monoclonal antibodies (LN-1, LN-2) reactive in B5 formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with follicular center and mantle cell zone human B lymphocytes and derived tumors.** *J Immunol*. 133. 1028–1036.
27. Smeland E, Funderud S, Ruud E, Bloomhoff HK, Godal T (1985). **Characterization of two murine monoclonal antibodies reactive with human B cells.** *Scand J Immunol*. 21. 205–214.
28. Gramatzki M, Burger R, Kraus J, Lauer U, Rohwer P, Eger G, Kalden JR, Henschke F (1991). **Monoclonal antibodies EBU-141 (CDw75) and EBU-65 allow reliable distinction between mature and pre-B-cell tumors in suspension and on tissue sections.** *Ann Hematol*. 63. 20–26.
29. Dorken B, Moller, P, Pezzutto, A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G (1989). **B-cell antigens: CDw75.** In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, dem Borne A von (Hrsg.). *Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens*. Aufl. 1. 109–110. Oxford University Press. Oxford
30. Bast B, Zhou LJ, Freeman G, Colley KJ, Ernst TJ, Munro S, Tedder TF (1992). **The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the β-galactoside α2,6-sialyltransferase.** *J Cell Biol*. 116. 423–435.
31. Keppler OT, Moldenhauer G, Oppenländer M, Schwartz-Albiez R, Berger EG, Funderud S, Pawlita M (1992). **Human golgi beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase generates a group of sialylated B lymphocyte differentiation antigens.** *Eur J Immunol*. 22. 2777–2781.
32. Zola H, Swart B, Nicholson I, Voss E (2007). **Leucocyte and stromal cell molecules: the CD markers.** Aufl. 1. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.
33. David L, Nesland JM, Funderud S, Sobrinho-Simões M (1993). **CDw75 Antigen expression in human gastric carcinoma and adjacent mucosa.** *Cancer*. 72. 1522–1527.

34. Costa-Nogueira C, Villar-Portela S, Cuevas E, Gil-Martín E, Fernández-Briera A (2009). **Synthesis and expression of CDw75 antigen in human colorectal cancer.** *BMC cancer*. 9. 431.
35. Reed W, Erikstein BK, Funderud S, Lilleng R, Tvedt K, Nesland JM (1993). **CDw75 antigen expression in breast lesions.** *Pathol Res Pract*. 189. 394–398.
36. Howlader N, Noone HN, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (2017). **SEER cancer statistics review 1975-2014.** https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. 10 Feb 2018
37. Rajkumar SV (2016). **Myeloma today: disease definitions and treatment advances.** *Am J Hematol*. 91. 90–100.
38. Bianchi G, Anderson KC (2014). **Understanding biology to tackle the disease: Multiple Myeloma from bench to bedside, and back.** *CA Cancer J Clin*. 64. 422–444.
39. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016). **The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.** *Blood*. 127. 2375–2390.
40. Anderson KC, Carrasco RD (2011). **Pathogenesis of Myeloma.** *Annu Rev Pathol*. 6. 249–274.
41. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Larson DR, Plevak MF, Jelinek DF, Fonseca R, Melton LJ, III, Rajkumar SV (2007). **Clinical course and prognosis of Smoldering (asymptomatic) Multiple Myeloma.** *N Engl J Med*. 356. 2582–2590.
42. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ (2002). **A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *N Engl J Med*. 346. 564–569.
43. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE (2012). **The genetic architecture of Multiple Myeloma.** *Nat Rev Cancer*. 12. 335–348.
44. Bianchi G, Munshi NC (2015). **Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in Multiple Myeloma.** *Blood*. 125. 3049–3058.
45. Mina R, D'Agostino M, Cerrato C, Gay F, Palumbo A (2017). **Plasma cell leukemia: update on biology and therapy.** *Leuk Lymphoma*. 58. 1538–1547.
46. Bladé J, Fernández de Larrea C, Rosiñol L, Cibeira MT, Jiménez R, Powles R (2011). **Soft-tissue plasmacytomas in Multiple Myeloma: incidence, mechanisms of extramedullary spread, and treatment approach.** *J Clin Oncol*. 29. 3805–3812.
47. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BGM, Miguel JFS (2014). **International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of Multiple Myeloma.** *Lancet Oncol*. 15. e535-e548.
48. Laubach JP, Paba Prada CE, Richardson PG, Longo DL (2017). **Daratumumab, Elotuzumab, and the development of therapeutic monoclonal antibodies in Multiple Myeloma.** *Clin Pharmacol Ther*. 101. 81–88.
49. Tai YT, Dillon M, Song W, Leiba M, Li X-F, Burger P, Lee AI, Podar K, Hideshima T, Rice AG, van Abbema A, Jesaitis L, Caras I, Law D, Weller E, Xie W, Richardson P, Munshi NC, Mathiot C, Avet-Loiseau H, Afar DEH, Anderson KC (2008). **Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits Myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu.** *Blood*. 112. 1329–1337.

50. Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, Huseni M, Powers D, Nanisetti A, Zhang Y, Rice AG, van Abbema A, Wong M, Liu G, Zhan F, Dillon M, Chen S, Rhodes S, Fuh F, Tsurushita N, Kumar S, Vexler V, Shaughnessy JD, Barlogie B, van Rhee F, Hussein M, Afar DEH, Williams MB (2008). **CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of Multiple Myeloma.** *Clin Cancer Res.* 14. 2775–2784.
51. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, Starling GC, Ciarlariello D, Bhaskar S, Briercheck EL, Hughes T, Yu J, Rice A, Benson DM (2013). **Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against Myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC.** *Cancer Immuno Immunother.* 62. 1841–1849.
52. Attal M, Harousseau J-L, Stoppa A-M, Sotto J-J, Fuzibet J-G, Rossi J-F, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R (1996). **A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in Multiple Myeloma.** *N Engl J Med.* 335. 91–97.
53. Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, Bruno B, San Miguel J, Pérez-Simon JA, Kröger N, Moreau P, Gahrton G, Gasparetto C, Giralt S, Bensinger W (2010). **International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for Multiple Myeloma.** *J Clin Oncol.* 28. 4521–4530.
54. Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, Morgan G, Richardson PG, Crowley J, Haessler J, Feather J, Hoering A, Moreau P, LeLeu X, Hulin C, Klein SK, Sonneveld P, Siegel D, Bladé J, Goldschmidt H, Jagannath S, Miguel JS, Orlowski R, Palumbo A, Sezer O, Rajkumar SV, Durie BGM (2012). **Risk of progression and survival in Multiple Myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter International Myeloma Working Group study.** *Leukemia.* 26. 149–157.
55. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, Cook G, Richardson PG, Gertz MA, Giralt S, Mateos MV, LeLeu X, Anderson KC (2018). **Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond.** *Leukemia.* 32. 252–262.
56. Köhler M, Greil C, Hudecek M, Lonial S, Raje N, Wäsch R, Engelhardt M (2018). **Current developments in immunotherapy in the treatment of multiple myeloma.** *Cancer.* 124. 2075–2085.
57. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, Harrison CJ, Israels T, Bailey S (2012). **Burkitt's lymphoma.** *Lancet.* 379. 1234–1244.
58. Molyneux E, Scanlan T, Chagaluka G, Renner L (2017). **Haematological cancers in african children: progress and challenges.** *Br J Haematol.* 177. 971–978.
59. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC (2004). **Adult Burkitt leukemia and lymphoma.** *Blood.* 104. 3009–3020.
60. Bellan C, Lazzi S, Hummel M, Palumbo N, Santi M de, Amato T, Nyagol J, Sabbatini E, Lazure T, Pileri SA, Raphael M, Stein H, Tosi P, Leoncini L (2005). **Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas.** *Blood.* 106. 1031–1036.
61. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982). **Human c-myc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in burkitt lymphoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79. 7824–7827.
62. Hayday AC, Gillies SD, Saito H, Wood C, Wiman K, Hayward WS, Tonegawa S (1984). **Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus.** *Nature.* 307. 334–340.

63. Ott G, Rosenwald A, Campo E (2013). **Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 575–583.
64. Magrath I (2012). **Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma.** *Br J Haematol.* 156. 744–756.
65. Niedobitek G, Agathangelou A, Rowe E, Jones, EL, Jones, DB, Turyaguma P, Oryema J, Wright DH, Young LS (1995). **Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma.** *Blood.* 86. 659–665.
66. Kamranvar SA, Gruhne B, Szeles A, Masucci MG (2007). **Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma.** *Oncogene.* 26. 5115–5123.
67. Ferry JA (2006). **Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis.** *Oncologist.* 11. 375–383.
68. Subar M, Neri A, Inghirami G, Knowles DM, Dalla-Favera R (1988). **Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma.** *Blood.* 72. 667–671.
69. Gutiérrez MI, Bhatia K, Barriga F, Diez B, Sackmann Muriel F, Andrea ML de, Epelman S, Risueno C, Magrath IT (1992). **Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from south america: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions.** *Blood.* 79. 3261–3266.
70. Miles RR, Arnold S, Cairo MS (2012). **Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia.** *Br J Haematol.* 156. 730–743.
71. Nilsson K, Bennich S, Johansson SGO, Pontén J (1970). **Established immunoglobulin producing Myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE Myeloma patient.** *Clin Exp Immunol.* 7. 477–489.
72. Diehl V, Schaadt M, Kirchner H, Hellriegel KP, Gudat F, Fonatsch C, Laskewitz E, Guggenheim R (1978). **Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study.** *Blut.* 36. 331–338.
73. Drexler HG, Matsuo Y (2000). **Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of Multiple Myeloma and plasma cell leukemia.** *Leuk Res.* 24. 681–703.
74. Burger R, Guenther A, Bakker F, Schmalzing M, Bernand S, Baum W, Duerr B, Hocke GM, Steininger H, Gebhart E, Gramatzki M (2001). **Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma.** *Hematol J.* 2. 42–53.
75. Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P (1968). **Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines.** *Cancer Res.* 28. 1300–1310.
76. Pulvertaft RJV (1964). **Cytology of burkitt's tumour (african lymphoma).** *Lancet.* 283. 238–240.
77. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J Gen Virol.* 36. 59–72.
78. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995). **Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model.** *Clin Cancer Res.* 1. 1311–1318.
79. Baum W, Steininger H, Bair H, Becker W, Hansen-Hagge T, Kressel M, Kremmer E, Kalden, JR., Gramatzki M (1996). **Therapy with CD7 monoclonal antibody TH-69 is highly effective for xenografted human T-cell ALL.** *Br J Haematol.* 95. 327–338.
80. Staudinger M, Glorius P, Burger R, Kellner C, Klausz K, Gunther A, Repp R, Klapper W, Gramatzki M, Peipp M (2014). **The novel immunotoxin HM1.24-ETA' induces apoptosis in multiple myeloma cells.** *Blood cancer journal.* 4. e219.

81. Kellner C, Nodehi SM, Peipp M (2010). **Mouse immune libraries for the generation of ScFv fragments directed against human cell surface antigens.** In: Kontermann R, Dübel S (Hrsg.). *Antibody Engineering Volume 1*. Aufl. 2. 47–63. Springer. Berlin / Heidelberg
82. Burmester J, Plückthun A (2001). **Construction of scFv fragments from hybridoma or spleen cells by PCR assembly.** In: Kontermann R, Dübel S (Hrsg.). *Antibody Engineering*. Aufl. 1. 19–40. Springer. Berlin / Heidelberg
83. Bradford MM (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 72. 248–254.
84. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem.* 150. 76–85.
85. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991). **Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.** *Cancer Commun.* 3. 207–2012.
86. van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM (1996). **A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture.** *Cytometry.* 24. 131–139.
87. Shenoy AM, Brahmi Z (1989). **Human IgG1 and mouse IgG3 but not monomeric IgM or IgE facilitate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by human natural killer cells.** *Nat Immun Cell Growth Regul.* 8. 338–348.
88. Collins C, Tsui FWL, Shulman MJ (2002). **Differential activation of human and guinea pig complement by pentameric and hexameric IgM.** *Eur J Immunol.* 32. 1802–1810.
89. Lüllmann-Rauch R (2009). **Taschenlehrbuch Histologie.** Aufl. 3. Thieme. Stuttgart.
90. Leung DW, Chen E, Goeddel DV (1989). **A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction.** *Technique.* 1. 11–15.
91. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990). **Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.** *Nature.* 348. 552–554.
92. Hust M, Toleikis L, Dübel S (2007). **Selection strategies II: antibody phage display.** In: Dübel S (Hrsg.). *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Aufl. 1. 45–68. WILEY-VCH. Weinheim
93. Nodehi SM, Repp R, Kellner C, Bräutigam J, Staudinger M, Schub N, Peipp M, Gramatzki M, Humpe A (2012). **Enhanced ADCC activity of affinity matured and Fc-engineered mini-antibodies directed against the AML stem cell antigen CD96.** *PloS one.* 7. e42426.
94. Singhal A, Hakomori S (1990). **Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer.** *BioEssays.* 12. 223–230.
95. Loo D, Pryer N, Young P, Liang T, Coberly S, King KL, Kang K, Roberts P, Tsao M, Xu X, Potts B, Mather JP (2007). **The glycotope-specific RAV12 monoclonal antibody induces oncosis in vitro and has antitumor activity against gastrointestinal adenocarcinoma tumor xenografts in vivo.** *Mol Cancer Ther.* 6. 856–865.
96. Coberly SK, Chen FZ, Armanini MP, Chen Y, Young P, Mather JP, Loo DT (2009). **The RAV12 monoclonal antibody recognizes the N-linked glycotope RAAG12: expression in human normal and tumor tissues.** *Arch Pathol Lab Med.* 133. 1403–1412.
97. Burris HA, Rosen LS, Rocha-Lima CM, Marshall J, Jones S, Cohen RB, Kunkel LA, Loo D, Baughman J, Stewart SJ, Lewis N (2010). **Phase 1 experience with an anti-**

- glycotope monoclonal antibody, RAV12, in recurrent adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res.* 16. 1673–1681.
98. Courtenay-Luck NS, Epenetos AA, Moore R, Larche M, Pectasides D, Dhokia B, Ritter MA (1986). **Development of primary and secondary responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms.** *Cancer Res.* 46. 6489–6493.
 99. Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO (1985). **Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG.** *J Immunol.* 135. 1530–1535.
 100. Dillman RO, Shawler DL, Dillman JB, Royston I (1984). **Therapy of chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma with T101 monoclonal antibody.** *J Clin Oncol.* 2. 881–891.
 101. Miller RA, Oseroff AR, Stratte PT, Levy R (1983). **Monoclonal antibody therapeutic trial in seven patients with T-cell lymphoma.** *Blood.* 62. 988–995.
 102. Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, Miller RA, Thielemans K, Warnke R, Levy R (1985). **A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy.** *Blood.* 65. 1349–1363.
 103. Morrison SL, Johnson MJ, La Herzenberg, Oi VT (1984). **Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81. 6851–6855.
 104. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986). **Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.** *Nature.* 321. 522–525.
 105. Piro LD, White CA, Grillo-López AJ, Janakiraman N, Saven A, Beck TM, Varns C, Shuey S, Czuczman M, Lynch JW, Kolitz JE, Jain V (1999). **Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma.** *Ann Oncol.* 10. 655–661.
 106. Tchong JE, Kereiakes DJ, Am Lincoff, George BS, Kleiman NS, Sane DC, Cines DB, Jordan RE, Mascelli MA, Langrall MA, Damaraju L, Schantz A, Effron MB, Braden GA (2001). **Abciximab readministration: results of the ReoPro readministration registry.** *Circulation.* 104. 870–875.
 107. Jurcic JG, DeBlasio T, Dumont L, Yao TJ, Scheinberg DA (2000). **Molecular remission induction with retinoic acid and anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in acute promyelocytic leukemia.** *Clin Cancer Res.* 6. 372–380.
 108. Lux A, Nimmerjahn F (2013). **Of mice and men: the need for humanized mouse models to study human IgG activity in vivo.** *J Clin Immunol.* 33 Suppl 1. 4–8.
 109. Overdijk MB, Verploegen S, Ortiz Buijsse A, Vink T, Leusen JHW, Bleeker WK, Parren PWHI (2012). **Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells.** *J Immunol.* 189. 3430–3438.
 110. Wright JK, Tschoop J, Jaton JC, Engel J (1980). **Dimeric, trimeric and tetrameric complexes of immunoglobulin G fix complement.** *Biochem J.* 187. 775–780.
 111. Diebolder CA, Beurskens FJ, Jong RN de, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, Voorhorst M, Ugurlar D, Rosati S, Heck AJ, van de Winkel JGJ, Wilson IA, Koster AJ, Taylor RP, Ollmann Saphire E, Burton, Schuurman J, Gros P, Parren PWHI (2014). **Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface.** *Science.* 343. 1260–1263.
 112. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, Densmore JJ, Williams ME, Taylor RP (2004). **Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia.** *J Clin Immunol.* 172. 3280–3288.

113. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri JM, Bernasconi S, Terdesco F, Rambaldi A, Introna M (2000). **Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis.** *Blood*. 95. 3900–3908.
114. Sharp TH, Boyle AL, Diebold CA, Kros A, Koster AJ, Gros P (2019). **Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116. 11900–11905.
115. Jong RN de, Beurskens F, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, Horstman W, Engelberts PJ, Oostindie SC, Wang G, Heck AJR, Schuurman J, Parren P (2016). **A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface.** *PLoS biology*. 14. e1002344.
116. 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.
117. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Sean CY, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI (2006). **Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103. 4005–4010.
118. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG (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.
119. Schachter H (2000). **The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches.** *Glycoconj J*. 17. 465–483.
120. Patnaik SK, Stanley P (2006). **Lectin-resistant CHO glycosylation mutants.** *Methods Enzymol*. 416. 159–182.

7 ANHANG

7.1 Geräte und Labormaterialien

Tab. 7.1 Geräte

Gerät	Hersteller-Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz)
Autoklav	Systec 5075EL	Systec (Linden)
Brutschrank	HERA cell 240	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer	Navios Flow Cytometer	Beckman Coulter (Brea, USA)
Elektroporator	MicroPulser	BioRad (Hercules, USA)
Gefrierschrank	Kendro Typ HFU 686 Top	Heraeus (Hanau)
Heizblock	block heater SBH130D	Stuart (Staffordshire, UK)
Imager	Universal Hood II	BioRad (Hercules, USA)
Kühlschrank	Kühl-Gefrierkombination NoFrost	Liebherr (Bulle)
Lichtmikroskop	Axiovert25	Zeiss (Oberkochen)
LSC & Luminescence Counter	MicroBeta TriLux 1450	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Magnetrührer	MR Hei-Mix S	Heidolph (Schwabach)
MilliQ Anlage	MilliQ A10	Merck (Darmstadt)
Netzteil für Elektrophorese	PowerPac HC	BioRad (Hercules, USA)
pH-Meter	HI2215 pH/ORP Meter	HANNA instruments (Vöhringen)
Photometer	BioPhotometer Sunrise remote	Eppendorf (Hamburg) Tecan (Männedorf, CH)
Pipetten	pipetus-akku eppendorf reference	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt) Eppendorf (Hamburg)
Pumpe	laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Schüttelinkubator	HI infors	Infors HT (Einsbach)
Schüttler	3006	GFL (Burgwedel)
Sterilbank	HERA Safe Typ HS18	Heraeus (Hanau)
Thermocycler	PTC-200 (Peltier Thermal Cycler)	BioRad (Hercules, USA)
UV-Tisch	SYAV 3020	Syngene (Cambridge, UK)
Vortexer	Bio Vortex V1	Schmidt (Wien, AU)
Waage	XB 2200 C Precisa	PESA (Wetzikon, CH)
Wasserbad	Typ WB7	Memmert (Schwabach)
Zentrifugen	Multifuge 3S-R Biofuge fresco Galaxy Mini	Heraeus (Hanau) Heraeus (Hanau) VWR (Darmstadt)

Tab. 7.2 Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller-Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz)
96 well Platten	Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen, Flachboden, mit Deckel für geringe Verdunstung Mikrotestplatte, 96 Well, R 96 Well Sample Plate	Sarstedt (Nümbrecht) Sarstedt (Nümbrecht) Perkin Elmer (Waltham, USA)
Bechergläser		Schott (Mainz)
25 µm Dialysierschlauch	Dialysierschlauch Visking, Cellulose Typ 27/32 inch	Roth (Karlsruhe)
Drigalskispatel	Plattierungsspatel	Sarstedt (Nümbrecht)
Einwegskalpell		Feather (Osaka, JPN)
Elektrophoresekammern	Mini-Protean 3 Cell Sub-Cell GT	BioRad (Hercules, USA) BioRad (Hercules, USA)
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette	BioRad (Hercules, USA)
Erlenmeyerkolben		Schott (Mainz)
FACS-Röhrchen	5 ml Tube	Sarstedt (Nümbrecht)
Filtriersäulen für die Antikörperreinigung	Poly-Prep Chromatography Columns	BioRad (Hercules, USA)
Flaschen		Schott (Mainz)
Gel-Gieß-Vorrichtung		BioRad (Hercules, USA)
Glasplatten und Kämmen		BioRad (Hercules, USA)
Kanülen		Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Kulturschalen		Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten	Eppendorf UVette 220-1600 nm	Eppendorf (Hamburg)
Messzylinder		Kartell (Noviglio, I)
Neubauer-Kammer	Neubauer improved	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Pipettenspitzen	Sarstedt serological pipette Biosphere Filter Tips	Sarstedt (Nümbrecht) Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße		Sarstedt (Nümbrecht)
Röhrchen	15 ml- und 50 ml Röhrchen Safe Seal Tube CryoPure Tube	Sarstedt (Nümbrecht) Sarstedt (Nümbrecht) Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzen		Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Sterilfilter (groß) 0,22 µm	Millipore Express Plus	Merck (Darmstadt)
Sterilfilter (klein) 0,22 µm	Acrodisc Syringe Filter 0,2 µm HT Tuffryn Membrane	Pall (Port Washington, USA)
Ultrafiltrationssäulen	Vivaspin	Sartorius (Göttingen)

Labormaterial	Hersteller-Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz)
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T175	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsieb	CellStrainer 70 µm	BD Biosciences (Bedford, USA)

7.2 Zusätzliche Abbildungen

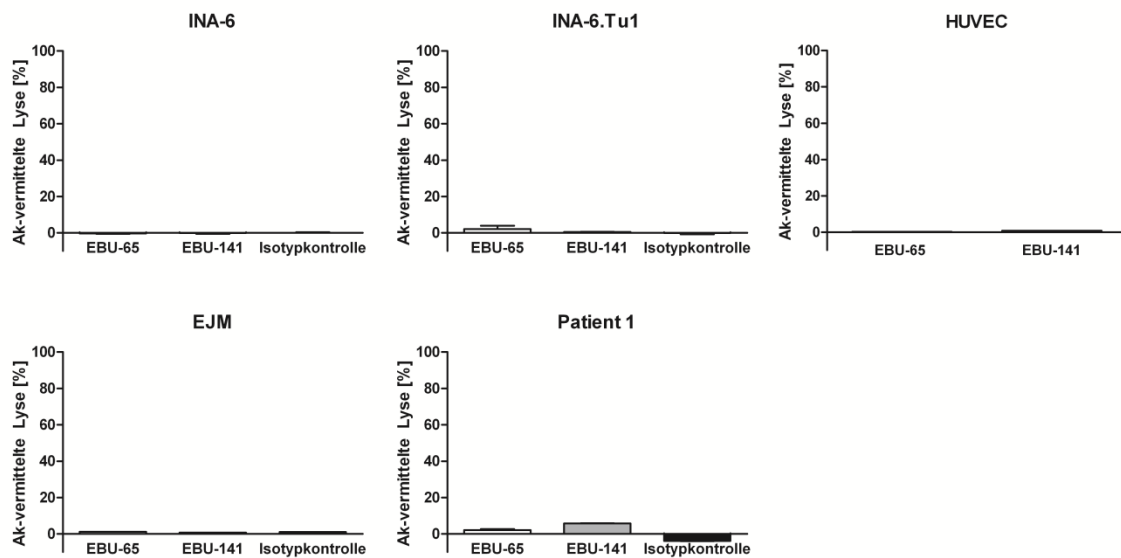


Abb. 7.1 CDC-Aktivität von EBU-65 und EBU-141 auf verschiedenen Tumorzelllinien

Dargestellt sind die Ergebnisse von $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsversuchen von je 10 µg/ml EBU-65 (weiße Balken), bzw. EBU-141 (graue Balken) und einer Maus-IgM-Isotypkontrolle (schwarze Balken) auf jeweils 5.000 Zellen der angegebenen Zelllinie. n=2.

7.3 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Dr. Katja Klausz
2. Medizinische Klinik
UKSH Campus Kiel
Schittenhelmstraße 12
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 12. Mai 2015

AZ.: D 467/15 (bitte stets angeben)
Studienplan: Identifizierung neuer Antikörper gegen Myelomzellen durch die Kombination von Phagen-Display und Next-Generation-Sequencing
Antrag vom 1. April 2015; Basisformular für einen Ethik-Antrag vom 8. Mai 2015; Informationsblatt und Einverständniserklärung für Patienten (Knochenmarkaspiration); Informationsblatt und Einverständniserklärung für Patienten (Pleurapunktion); Informationsblatt und Einverständniserklärung für Patienten (Blutentnahme); Informationsblatt und Einverständniserklärung für gesunde Spender (Blutentnahme);
Studienleiter und Antragsteller: Dr. Katja Klausz, 2. Medizinische Klinik, UKSH Campus Kiel
Antrag vom: 1. April 2015 (Eingang: 11. Mai 2015)

Sehr geehrte Frau Dr. Klausz,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

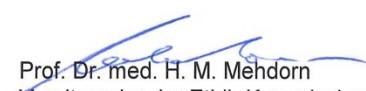
1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten/Mitarbeitern.
3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.

4. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

5. Vor Beginn der Studie bitten wir um Nachreichung der Unterschriften von PD Dr. Renate Burger, PD Dr. Matthias Peipp und Dr. Christian Kellner.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Alexandra Pries
Geschäftsstelle der Ethik-Kommission

8 PUBLIKATIONEN

Zitierfähige Abstracts

- **Buck M**, Krohn S, Burger R, Kellner C, Peipp M, Gramatzki M, Klausz K (2017). **The novel chimeric CDw75 antibody chEBU-141 induces potent antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) against mature B-lineage neoplasm.** *Oncol Res Treat.* 40 (suppl 3): 1-308.
Vortrag auf der *Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie* in Stuttgart (29.09.2017 - 03.10.2017)
- Klausz K, **Buck M**, Krohn S, Burger R, Kellner C, Gramatzki M, Peipp M (2017). **CD75s represents a therapeutic target for antibody-based immunotherapy of B cell lymphoma and multiple myeloma.** *Blood.* 130 (suppl 1): 1810.
Poster auf dem Kongress der *American Society of Hematology* in Atlanta, USA (09.-12.12.2017)
- Klausz K, Karimzadeh A, **Buck M**, Krohn S, Otte A, Kellner C, Croci GA, Klapper W, Peipp M, Gramatzki M (2018). **Targeting the glyco-antigen CD75s with the tetravalent, Fc-engineered antibody ‘EBU-141 Tetra’ induces potent killing of B cell lymphoma and plasma cell tumors.** *Blood.* 132 (suppl 1): 4178.
Poster auf dem Kongress der *American Society of Hematology* in San Diego, USA (01.-04.12.2018)
- Klausz K, Karimzadeh A, **Buck M**, Krohn S, Otte A, Kellner C, Croci GA, Klapper W, Peipp M, Gramatzki M (2019). **Potent targeting of the glycoantigen CD75s on myeloma by the tetravalent, Fc-engineered antibody ‘EBU-141 Tetra’.** *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 19; 10 (supplement): e17-e18.
Vortrag auf dem *International Myeloma Workshop* in Boston, USA (12.-15.09.2019)

9 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Malena Kristin Buck, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle von mir genutzten Quellen und Hilfsmittel angegeben habe.

Die Arbeit hat bisher weder in gleicher, noch ähnlicher Form an anderer Stelle in einem Prüfungsverfahren vorgelegen und die Ergebnisse wurden, bis auf die aufgeführten Ausnahmen, noch nicht veröffentlicht.

Bremen, 28.01.2020

Malena Buck

10 DANKSAGUNG

Zu Beginn gilt mein Dank Prof. Dr. Matthias Peipp für die Möglichkeit zur Mitarbeit und Promotion in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Überlassung des interessanten Themas. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Martin Gramatzki für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in der Klinik für Innere Medizin II in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie anfertigen zu können.

Dr. Katja Klausz möchte ich dafür danken, dass sie mich für wissenschaftliches Denken und Arbeiten begeistert hat. Ich möchte diese Erfahrung nicht missen. Außerdem danke ich für die vielen interessanten Denkanstöße und ihre Geduld und Genauigkeit beim Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke auch dem gesamten Laborteam für die Hilfsbereitschaft und die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich werde die tolle Zeit im Labor nie vergessen. Ein besonderer Dank gilt hier Kathrin Richter für ihre unermüdliche Motivation und Freude an der Anleitung in der Laborarbeit und für die vielen wissenschaftlichen und freundschaftlichen Gespräche.

Außerdem danke ich Annika Marklein, Nele Genuttis und Lisa Worch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die damit verbundene Möglichkeit einige Dinge noch einmal aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Dennis Stöver möchte ich für seine starke Schulter danken: Danke, dass du in allen Lebenslagen für mich da bist und alle großen und kleinen Probleme mit mir gemeinsam bewältigst.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester: Mama, Papa, Mareike, ohne euch wäre ich nicht die, die ich bin und auf euch kann ich immer zählen.