

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

**HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG
FC-ENGINEERTER VARIANTEN DES CHIMÄREN
MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS EBU-141**

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

vorgelegt von
Amir Karimzadeh
aus Hamburg

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Petra Bacher

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2022

zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.12.2021

gez.: Priv.-Doz. Dr. Renate Burger

Vorsitzende der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 VON ZAUBERKUGELN ZUR ANTIKÖRPERTHERAPIE	1
1.2 EFFEKTORFUNKTIONEN MONOKLONALER IgG1-ANTIKÖRPER	3
1.3 STRATEGIEN ZUR OPTIMIERUNG VON IgG1-ANTIKÖRPERN DURCH Fc-ENGINEERING	5
1.3.1 Fc Protein-Engineering	5
1.3.2 Fc Glyco-Engineering	7
1.4 DER CHIMÄRE EBU-141 ANTIKÖRPER UND SEIN ANTIGEN CD75s.....	7
1.5 ZIEL DER ARBEIT	9
2 MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 MATERIAL.....	10
2.2 METHODEN.....	15
2.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide für die Fc-engineerten chimären EBU-141 Antikörper	15
2.2.2 Sequenzierung der Expressionsplasmide	17
2.2.3 Antikörperexpression und -aufreinigung.....	17
2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen.....	19
2.2.5 MTS-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität.....	20
2.2.6 Zytotoxizitätsversuche (⁵¹ Chrom-Freisetzungsversuche)	20
2.2.7 Statistische Analysen	22
3 ERGEBNISSE	23
3.1 HERSTELLUNG DER FC-OPTIMIERTEN IgG1 ANTIKÖRPER CHEBU-141 FC ENG UND CHEBU-141 Duo FC ENG	23
3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren	23
3.1.2 Herstellung der Antikörper	24
3.1.3 Analysen des Bindungsverhaltens der bi- oder tetravalenten Varianten von chEBU-141	26
3.1.4 chEBU-141-Antikörper hemmen nicht die Proliferation CD75s-positiver Tumorzellen	28
3.1.5 Analyse der ADCC- und CDC-Aktivität der Fc-egnireerten chEBU-141-Antikörper	29
4 DISKUSSION	37
5 ZUSAMMENFASSUNG	43
6 LITERATURVERZEICHNIS	44
7 ANHANG	48
8 PUBlikATIONEN/ZITIERFÄHIGE ABSTRACTS	50
9 ERKLÄRUNG	51
10 DANKSAGUNG.....	52

Abkürzungsverzeichnis

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
2xYT-Medium	2xYeast-Trypton-Medium
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Amp.	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BiTE	<i>bispecific T cell engager</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BspQI	<i>Bacillus sphaericus QI</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CH	konstante Domäne der schweren Kette
chEBU-141	chimärer EBU-141
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie, Chronische Lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E/T-Ratio	<i>effector-to-target-ratio</i>
EC ₅₀	<i>half maximal effective concentration</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Fab-Region	<i>fragment antigen binding region</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fc eng	Fc engineer
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
Fc γ R	Fc γ -Rezeptor
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gramm
h	hour
HBS	<i>hepes buffered saline</i>
HC	<i>heavy chain</i>

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2/neu.....	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
ITAM.....	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM.....	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	<i>light chain</i>
LRSC	<i>Leukocyte-Reduction-System-Chamber</i>
LSC.....	<i>Liquid Scintillation</i>
mAk.....	monoklonaler Antikörper
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
min	Minuten
Mio.....	Millionen
ml	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar
MNC	<i>mononuclear cells</i>
MTS.....	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
MZR.....	maximale Zelllyserate
n	<i>number</i>
Nhel.....	<i>Neisseria mucosaheidelbergensis I</i>
NK-Zellen.....	natürliche Killerzellen
nm.....	Nanometer
nM.....	Nanomolar
o.g.....	oben genannt
P/S.....	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-1.....	<i>programmed cell death protein 1</i>
pH.....	<i>potentia hydrogenii</i>
PpuMI.....	<i>Pseudomonas putida MI</i>
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
s.....	Sekunde
S	Größenstandard
scFv	<i>single chain Fragments variable</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Siglecs.....	<i>immunglobulin-like lectins</i>
SOC.....	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
sog.....	sogenannt
ST6Gal1	β -Galaktose- α -2,6-Sialyltransferase
Tab.....	Tabelle
TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V.....	Volt
VH.....	variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
z.B.....	zum Beispiel
z.T.....	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Von Zauberkugeln zur Antikörpertherapie

Seit Paul Ehrlichs visionärer Vorstellung von Zauberkugeln als zielgerichtete Arzneistoffe, die pathogene Zellen im Menschen töten sollten, ohne ihm Schaden zuzufügen, verging mehr als ein Dreivierteljahrhundert ehe die Entwicklung der Hybridom-Technik durch César Milstein und Georges Köhler erstmals die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) in großen Mengen ermöglichte (1,2). Die Applikation muriner mAk in den menschlichen Organismus, wie sie bis in die 1990er zunächst nicht anders realisierbar war, limitierte allerdings den therapeutischen Einsatz. Aufgrund von Immunreaktionen gegen das fremde nicht-menschliche Eiweiß, kurzen Halbwertszeiten durch die Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern, mangelnder Interaktion mit dem menschlichen Immunsystem zur Bekämpfung von Krebszellen und einer schlechten Penetration des Tumorgewebes blieb das therapeutische Potential dieser Antikörper hinter den Erwartungen zurück (3). Erst mit den entsprechenden molekularbiologischen Entwicklungen konnten chimäre Antikörper mit einer murinen antigenbindenden Region (V-Regionen) sowie der konstanten Region eines menschlichen IgG generiert werden. Chimäre Antikörper wiesen ein wesentlich geringeres immunogenes Potential auf und erzielten durch die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) deutlich längere Halbwertszeiten, wodurch die Erfolgsgeschichte therapeutischer Antikörper eingeleitet wurde (4,5). 1997 wurde dann mit dem chimären IgG1 Rituximab, der an das transmembrane CD20 auf der Oberfläche von B-Zellen bindet, der erste Antikörper zur Behandlung des Non-Hodgkin Lymphoms von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (6). Im Vergleich zur klassischen Chemotherapie verbesserte die Chemoimmuntherapie mit Rituximab das Überleben von Lymphom-Patienten deutlich und sollte endgültig den Weg für den Einsatz mAk zur zielgerichteten Krebstherapie ebnen (7). Seither wurden hunderte weitere murine, chimäre, humanisierte und humane Antikörper entwickelt (8). Allein 2019 befanden sich 79 therapeutische Antikörper in fortgeschrittenen klinischen Studien, von denen etwa die Hälfte keine Krebsindikation hatten, was den Stellenwert der Antikörpertherapie in und außerhalb der Malignomtherapie verdeutlicht (9). Zu den verschiedenen Anwendungen gehören bspw. die Kopplung mAk mit radioaktiven oder toxischen Substanzen. Ein solches Antikörperkonjugat, das seine Wirkung nach der Antigenbindung entfaltet, ist z.B. der mit dem β -Strahler

⁹⁰Yttrium konjugierte murine CD20-IgG1 Ibritumomab-Tiuxetan, der in klinischen Studien einen deutlichen Vorteil gegenüber Rituximab in der Behandlung von rezidivierten oder refraktären Non-Hodgkin Lymphomen aufwies und seit 2002 zugelassen ist (10,11). Ein ähnliches Beispiel ist Trastuzumab-Emtansin, der die Eigenschaften des mAk Trastuzumab und des Mitosehemmstoffs DM1 kombiniert und zur Behandlung inoperabler HER2/neu-positiver Mammakarzinome zugelassen ist (12). Ein relativ neuer und innovativer Ansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen ist die Immun-Checkpoint-Inhibition, für deren grundlegende Erkenntnisse James Allison und Tasuku Honjo 2018 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurden. Dabei führt die Blockade inhibitorischer Immun-Checkpoints wie das *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) oder das *programmed cell death protein 1* (PD-1) zu einer verstärkten T-Zell-Antwort gegen das Malignom (13). Zu solchen Immun-Checkpoint-Inhibitoren zählt z.B. Ipilimumab, ein vollständig humaner IgG1 gegen CTLA-4 auf T-Zellen, der in Phase-III-Studien einen signifikanten Vorteil für das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom aufwies und seit 2011 für diese Indikation zugelassen ist (14). Weiterhin sind bispezifische Antikörper, die imstande sind, Tumorzellen und Immunzellen in räumliche Nähe zueinander zu bringen und so eine Immunzellantwort gegen die Tumorzellen auszulösen, Gegenstand aktueller Forschung. So kann z.B. Blinatumomab, ein CD19-gerichteter *bispecific T cell engager* (BiTE), der zur Behandlung bestimmter Formen der refraktären B-Zell Akuten Lymphoblastischen Leukämie (ALL) zugelassen ist, über zwei *single chain Fragments variable* (scFv), die über einen Linker miteinander verbunden sind, sowohl CD19 auf B-Zellen als auch CD3 auf T-Zellen binden und zu einer effektiven Immunantwort gegen die Tumorzelle führen (15). Die neueste Entwicklung ist die *Chimeric Antigen Receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie, bei der autologe T-Zellen vom Patienten entnommen, gentechnisch mit einem Antigen-Rezeptor gegen ein krebspezifisches Oberflächenmolekül ausgestattet, aktiviert und expandiert, dem Patienten schließlich als sog. CAR-T-Zellen reinfundiert werden (16). Die ersten zugelassenen CAR-T-Zell-Therapeutika sind das gegen CD19 gerichtete Tisagenlecleucel, das von der FDA 2017 zur Behandlung bestimmter Formen der kindlichen ALL zugelassen wurde, sowie das Axicaptagene-Ciloleucel, das ebenfalls 2017 eine Zulassung zur Behandlung von ALL-Formen beim Erwachsenen erhielt (17,18). Trotz des Erfolgs innovativer immuntherapeutischer Strategien und des erfolgreichen Einsatzes von Antikörpern und Antikörper-basierten Molekülen sprechen allerdings nicht alle Patienten

gleichermaßen gut auf die Therapie an und Rezidive sowie Refrakterität bleiben nach wie vor ein Problem. Daher ist das Ziel translationaler Forschung, neue Strategien und Ansatzpunkte zur Verbesserung des Therapieansprechens und der Effizienz mAk und Antikörper-basierter Therapien zu entwickeln.

1.2 Effektorfunktionen monoklonaler IgG1-Antikörper

Antikörper verfügen über unterschiedliche direkte und je nach Isotyp über verschiedene Fc-vermittelte Effektorfunktionen, die auch zur Bekämpfung von Tumorzellen genutzt werden können (Abb. 1). Die direkten Wirkmechanismen werden durch die Bindung des Antigens über die Fab-Region eines Antikörpers vermittelt und sind größtenteils unabhängig vom Isotyp. Zu diesen Effekten zählt z.B. die Induktion von Apoptose, die Blockierung der Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren oder von Rezeptor-Liganden-Interaktionen zwischen Tumorzelle und Immunzelle (19). So konnte bspw. gezeigt werden, dass Rituximab über *Crosslinking* nach der Bindung von CD20 auf der Oberfläche maligner B-Lymphozyten zur Proliferationsinhibition und einer Induktion des programmierten Zelltods führen kann (20). Ein weiteres Beispiel ist der chimäre monoklonale IgG1-Antikörper Cetuximab, der bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms zum Einsatz kommt (21). Dieser mAk blockiert die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und verhindert so die Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, was konsekutiv zu einem verminderten Zellwachstum führt (22).

Zu den Fc-vermittelten Effektorfunktionen zählen wiederum die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) sowie die Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose (ADCP). Diese Fc-vermittelten Wirkmechanismen werden über die Interaktion der Fc-Region eines mAk mit Komponenten des Immunsystems vermittelt. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Isotypen der Immunglobuline in Bezug auf die Aktivierung solcher Mechanismen. Bereits vor etwa drei Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass IgG1-Antikörper großes Potential im Hinblick auf CDC sowie ADCC haben und daher für die therapeutische Anwendung zu favorisieren sind (23). Heute bilden die mAk des Typs IgG1 die Majorität der eingesetzten Antikörper zur Krebsbehandlung und auch für andere Indikationen wie Autoimmunerkrankungen. IgG1-Antikörper besitzen in der C_H2-Domäne Bindestellen für C1q, das Initiationsmolekül der klassischen Komplementkaskade. Über C1q erfolgt eine Bindung und Aktivierung weiterer

Komplementfaktoren, die schließlich zur Bildung der C3-/C5-Konvertase führen und in der Aktivierung des Membranangriffskomplexes und der Rekrutierung weiterer Immunzellen gipfeln, wodurch es zur Lyse der Zielzelle kommt (24). Darüber hinaus befinden sich in der C₁-C₂-C₃-Domäne von IgG1-Antikörpern Bindestellen für den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), was die Halbwertszeit essentiell steigert, sowie für Fcγ-Rezeptoren (FcγR), die von Immunzellen exprimiert und über die zell-vermittelte Effektormechanismen wie ADCC und ADCP gesteuert werden (25,26). Diese Effektormechanismen werden über die Bindung der Fc-Region an FcγR auf der Oberfläche von Effektorzellen (z.B. NK-Zellen) vermittelt (27). Ob es zu einer Aktivierung oder Inhibierung von Fc-vermittelten Effektorfunktionen kommt, ist abhängig vom FcγR. Man unterscheidet hierbei aktivierende von inhibierenden FcγR, die entsprechend in ihrer intrazellulären Domäne über sog. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) bei den aktivierenden FcγRI, FcγRIIa und FcγRIIIa oder über *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs* (ITIMs) bei dem inhibierenden FcγRIIb verfügen (28-30). Dass die Interaktion der Fc-Region mAk mit den unterschiedlichen FcγR eine fundamentale Rolle für die therapeutische Wirksamkeit spielt, zeigte sich in einer Vielzahl an Studien. Unter anderem kam es in Mausmodellen mit nicht-funktionalen ITAMs aktivierender FcγR zur konsekutiven Störung der Signalkaskade und einem Wirkverlust von Rituximab (31). Zudem konnte festgestellt werden, dass der Expressionsverlust aktivierender FcγR wie FcγRIa (CD64a) und FcγRIIIa (CD16a), die z.B. auf Monozyten bzw. Makrophagen und NK-Zellen exprimiert werden, zu einer wesentlichen Störung der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort gegen Tumorzellen führte (32). Als Gegenspieler aktivierender FcγR und damit als essentielles Bedeutungselement der Regulation des Immunsystems fungiert der FcγRIIb, der unter anderem auf Mastzellen, Granulozyten und Makrophagen vorkommt (27,30). In Mausversuchen mit FcγRIIb-Knockout und IgG1-Antikörpern, die sowohl an den inhibierenden FcγRIIb als auch den aktivierenden FcγRIIIa binden, zeigte sich eine deutliche Zunahme der ADCC-Aktivität von Rituximab und Trastuzumab, da die Antikörper so ausschließlich an den aktivierenden FcγRIIIa binden und deutlich effektiver das Tumorwachstum *in vivo* unterbinden können (33). Dies und die Beobachtung, dass mAk mit einer höheren Affinität zu aktivierenden FcγR sowie einer verminderten Affinität zu inhibierenden FcγR *in vivo* bessere Therapieresultate erzielten, führten zu der Annahme, dass sowohl die Interaktion von Fc-Region und FcγR als auch die Affinität mit der die Fc-

Region eines mAk an aktivierende Fc γ R bindet, eine zentrale Rolle bei der Verbesserung mAk mittels Fc-Engineering spielen sollte (34).

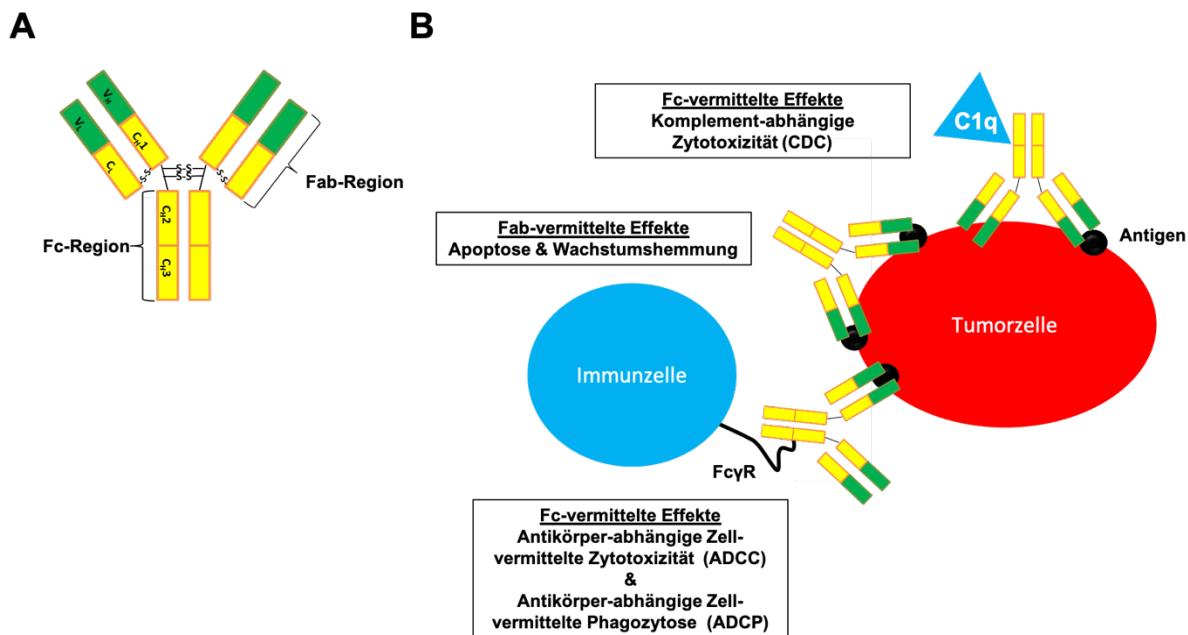


Abb.1. Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers und seiner direkten und Fc-vermittelten Effektorfunktionen. (A) IgG1-Antikörper bestehen aus zwei Regionen, darunter die antigenbindende Fab-Region, die wiederum aus der variablen Domäne der leichten (V_L) und der schweren (V_H) Kette (grün) sowie der, hier gelb gefärbten, konstanten Domäne der leichten (C_L) und einem Teil der schweren Kette (C_{H1}) aufgebaut ist sowie der Fc-Region, die sich aus den konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} der schweren Kette (gelb) zusammensetzt. Disulfidbrücken, die die hinge-Region zusammenhalten, sind mit einem S gekennzeichnet. (B) Direkte Fab-vermittelte Effekte (Apoptose, Wachstumshemmung usw.) gegen eine Tumorzelle werden durch die Bindung des Antigens (schwarz) ausgelöst, wohingegen die Fc-vermittelten Effekte von IgG1-Antikörpern die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC), die durch die Bindung des Initiationsmolekül der klassischen Komplementkaskade C1q vermittelt wird sowie die ADCC und ADCP, die durch die Bindung von aktivierenden Fc γ R auf Immunzellen ausgelöst wird, umfassen.

1.3 Strategien zur Optimierung von IgG1-Antikörpern durch Fc-Engineering

Das Fc-Engineering zur Verbesserung der therapeutischen Effektivität mAk ist ein zentraler Bestandteil der translationalen Forschung. Hierbei können grundsätzlich gezielte Veränderungen der Aminosäuresequenz (Fc Protein-Engineering) sowie der Glykosylierung (Fc Glyco-Engineering) voneinander unterschieden werden und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.1 Fc Protein-Engineering

Durch zahlreiche Studien konnten verschiedenste Aminosäuremutationen identifiziert werden, die zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens zwischen Fc-Region und Fc γ R auf den Immunzellen führen und darüber Effektormechanismen wie ADCC beeinflussen (35).

Beispielsweise zeigen Varianten von IgG1-Antikörpern, in denen die Aminosäuren Serin (S), Glutamat (E) und Lysin (K) an den Positionen 298, 333 und 334 mit Alanin (A) ausgetauscht wurden (S298A-E333A-K334A), eine gesteigerte Affinität zum aktivierenden Fc_YRIIIa auf NK-Zellen, Monozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie eine verminderte Affinität zum inhibierenden Fc_YRIIb auf B-Zellen und Makrophagen, woraus eine deutlich gesteigerte zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen durch NK-Zellen *in vitro* resultierte (36). Aus dem Austausch von Serin mit Asparaginsäure (D) an Position 239 sowie Isoleucin (I) mit Glutamat (E) an Position 332 (S239D-I332E) in den humanisierten, klinisch zugelassenen IgG1-Antikörpern Trastuzumab gegen Her2/neu und Alemtuzumab gegen CD52 resultierte ebenfalls eine, im Vergleich zu den nativen IgG1-Antikörpern, gesteigerte Affinität zum Fc_YRIIIa, die konsekutiv sogar zu einer noch stärkeren NK-Zell-vermittelten ADCC durch diese Varianten führte als die zuvor genannte Triple-Mutation (37). Auch der humanisierte IgG1 Tafasitamab (MOR208, XmAb5574), der gegen das auf B-Zellen vorkommende CD19 gerichtet ist, wurde durch die Aminosäuremutation S239D-I332EFc optimiert (38,39). Dies führte nicht nur zu einer signifikanten Inhibition humaner CD19-positiver Lymphomzellen im Mausmodell, sondern zeigte auch im präklinischen Affenmodell eine signifikante B-Zell-Depletion, was die Effektivität dieses Antikörpers gegen CD19-positive Zellen belegte (39,40). Tafasitamab (MOR208) wurde Ende 2019 von der FDA und im Juli 2020 von der EMA für die Behandlung des Diffus Großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) zugelassen, da klinische Studien für die mit dem Antikörper und Lenalidomid behandelten Patienten einen Überlebensvorteil belegen konnten (41).

Auch die CDC-Aktivität von IgG1-Antikörpern lässt sich mittels Fc Protein-Engineering beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäuren Lysin an Position 326 und Glutaminsäure an Position 333 durch Alanin (K326A-E333A) in der C_H2-Domäne der Fc-Region von Rituximab zu einer mehrfach erhöhten Bindungsaffinität für C1q führt und darüber die CDC-Aktivität deutlich gesteigert werden kann (42). Ein weiterer innovativer und insbesondere für die vorliegende Arbeit relevanter Ansatz zur Steigerung der CDC-Aktivität wurde von de Jong und Kollegen beschrieben. So können durch den Austausch von Glutaminsäure an den Positionen 345 bzw. 430 durch Lysin bzw. Glycin (E345K bzw. E430G), mAk hergestellt werden, die nach der Bindung an das Antigen auf der Zelloberfläche mit ihren Fc-Regionen Hexamere bilden, darüber deutlich effizienter C1q

binden und die klassische Komplementkaskade effektiver als die Wildtyp-IgG1-Antikörper aktivieren (43).

1.3.2 Fc Glyco-Engineering

Auch eine Modulation des Glykosylierungs-Profiles an bestimmten Aminosäuren in der Fc-Region mAk kann zu Veränderungen der Effektorfunktion führen. IgG beinhalten an Position 297 der Aminosäurekette zwischen C_H2-/C_H3-Domäne einen Asparagin-Rest, an den hochkonserviert zwei N-Acetylglucosamine, drei Mannosen und weitere Zuckerreste wie Fucose oder Sialylreste angeknüpft sind, die für die Bindung des Antikörpers an Fc_yR und C1q eine wichtige Rolle spielen (44). So führte z.B. eine Verminderung des Fucoseanteils zu einer Zunahme der Affinität für den aktivierenden Fc_yRIIIa auf NK-Zellen und konsekutiv zu einer Verbesserung der ADCC-Aktivität dieser Glyco-optimierten IgG1-Antikörper (45,46). Die Zunahme von Galaktose führte wiederum bei Rituximab zu einer verbesserten Bindung von C1q an die Fc-Region und konnte darüber die CDC durch diesen IgG1-Antikörper verstärken (47). Beispiele für Glyco-engineerte mAk ohne Fucose, die klinisch eingesetzt werden, sind Obinutuzumab und Mogamulizumab. Obinutuzumab, ein mAk gegen CD20, hat unter anderem eine Zulassung zur Behandlung der CLL (48). Mogamulizumab ist wiederum ein IgG1-Antikörper gegen den Chemokin-Rezeptor Typ 4 und kommt bei der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zum Einsatz (49).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fc Protein- sowie auch das Fc Glyco-Engineering großes Potential im Hinblick auf eine Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit mAk bergen. Gleichzeitig stellt aber auch die Suche nach neuen, möglichst tumorspezifischen Antigenen für die Immuntherapie mit mAk, die durch solche Optimierungsansätze eventuell noch potenter werden können, ein wichtiges Forschungsfeld dar.

1.4 Der chimäre EBU-141 Antikörper und sein Antigen CD75s

Den chimären IgG1 EBU-141 (chEBU-141) entwickelte unsere Arbeitsgruppe aus dem murinen IgM EBU-141. Dieser konnte 1991 von Gramatzki und Kollegen durch die Immunisierung von Mäusen mit der Myelomzelllinie U266 und der klassischen Hybridomtechnologie hergestellt werden (50). Als Antigen wurde CD75s (vormals CDw75) identifiziert, was α -2,6-verknüpfte, terminale Sialylreste an Galaktose-Zuckern von Membranproteinen oder -fetten sind, die sich vorrangig auf der Oberfläche von gesunden

und malignen B-Zellen finden (51). Damit wurde durch EBU-141 die Detektion reifer B-Zell-Neoplasien und Multipler Myelome durch Durchflusszytometrie und Immunhistochemie ermöglicht, die mittels anderer mAk nicht oder nur unbefriedigend erfasst werden konnten (50). Die α -2,6-Sialylierung von Lactosaminen wird von der β -Galaktose- α -2,6-Sialyltransferase (ST6Gal1) katalysiert, die zu einer Gruppe von etwa 20 Sialyltransferasen gehört, die im Rahmen der posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Apparat Sialylreste an Position α -2,3, α -2,6 (wie im Falle von CD75s) oder α -2,8 von Glykoproteinen und -lipiden knüpfen (52). Neuere Untersuchungen belegen zudem, dass CD75s neben den o.g. Entitäten auch auf anderen Tumorentitäten (z.B. Magen- und Prostatakarzinom) vorkommt und sich somit als Zielstruktur für Antikörper-basierte Therapien verschiedener Krebserkrankungen eignen könnte (53,54).

Bei der funktionellen Charakterisierung des murinen Hybridomantikörpers EBU-141 zeigte sich, dass sich CD75s-positive Tumorzellen sehr effektiv durch CDC mit humanem Serum lysieren lassen, aber keine Rekrutierung humaner Effektorzellen für ADCC und ADCP von CD75s-positiven Tumorzellen durch den Maus-IgM-Antikörper möglich ist (Doktorarbeit Malena Kristin Buck). Um den EBU-141, der sich aufgrund seines murinen Ursprungs nicht für eine Anwendung im Menschen eignet, therapeutisch anwendbar zu machen, wurde mithilfe der CD75s-bindenden V-Regionen aus dem ursprünglichen Hybridom, der chimäre IgG1-Antikörper chEBU-141 hergestellt (Doktorarbeit Malena Kristin Buck). Dieser im Vergleich zum decavalent (IgM-Pentamer mit 10 Fab-Regionen) nur noch bivalent (zwei Fab-Regionen) bindende mAk wies zwar eine potente ADCC-Aktivität gegen CD75s-positive Tumorzellen auf, zeigte aber einen bis zu 100-fachen Aviditätsverlust für das Antigen CD75s sowie einen kompletten Verlust der CDC-Aktivität im Vergleich zum ursprünglichen EBU-141 Maus-IgM-Antikörper (Doktorarbeit Malena Kristin Buck). Um den deutlichen Aviditätsverlust bei der CD75s-Bindung zu kompensieren, wurde in der Arbeitsgruppe zusätzlich eine tetravalente (vier Fab-Regionen) Variante des chEBU-141 IgG1-Antikörpers namens chEBU-141 Duo hergestellt. Dieser Antikörper hatte eine verbesserte Avidität für CD75s und zeigte auch eine verbesserte ADCC- und CDC-Aktivität als chEBU-141. Sowohl chEBU-141 als auch chEBU-141 Duo dienten als Basis für die vorliegende Arbeit.

1.5 Ziel der Arbeit

CD75s ist, im Gegensatz zu den meisten Antigenen, die für therapeutische Anwendungen als Zielstruktur dienen, kein Protein, sondern ein Zuckerrest, der vorrangig auf B-Zell-Neoplasien und Myelomzellen vorkommt und spezifisch durch den mAk EBU-141 gebunden wird. Aus dem ursprünglichen murinen IgM-Antikörper EBU-141 wurden in Vorarbeiten bereits zwei chimäre IgG1-Antikörpervarianten mit bivalenter (chEBU-141) oder tetravalenter (chEBU-141 Duo) CD75s-Bindung hergestellt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, zu überprüfen, ob mittels Fc Protein-Engineering die Fc-vermittelten Effektormechanismen, insbesondere ADCC und CDC, also die gleichzeitige effektivere Rekrutierung von NK-Zellen und Komplementfaktoren für die Tumorzelllyse von chEBU-141 und chEBU-141 Duo, verbessert werden können. Dazu sollten die Aminosäuremutationen S239D, I332E und E345K, unserem Wissen nach erstmalig zusammen, in die Fc-Region der beiden Antikörpervarianten integriert werden, um sowohl eine Verbesserung der Affinität zum Fc γ RIIIa als auch eine hexamere Konfiguration für die Komplementaktivierung durch C1q-Bindung auf der Tumorzelloberfläche durch die beiden chimären IgG1-Antikörper zu erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Fc-optimierten Varianten von chEBU-141 und chEBU-141 Duo durch molekularbiologische Methoden generiert, die Antikörper durch Kalziumphosphat-Transfektion von Säugerzellen hergestellt und biochemisch charakterisiert werden, bevor Bindungsanalysen und funktionelle Experimente zu direkten und Fc-vermittelten Effektormechanismen der Antikörper durchgeführt werden sollten. Ziel war es, die Eigenschaften der optimierten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng mit denen der nicht-optimierten Antikörper zu vergleichen und ihr Potential für einen therapeutischen Einsatz gegen reife B-Zell-Tumoren und das Multiple Myelom zu analysieren. Zu den reifen B-Zell-Neoplasien zählt z.B. die B-CLL, die gleichzeitig die häufigste Form der Leukämien in westlichen Staaten ausmacht (55). Die meisten mAk, die zur Behandlung der progredienten B-CLL zugelassen sind (z.B. Rituximab oder Obinutuzumab), haben CD20 als Zielantigen (56). Auch für die Behandlung des Multiplen Myeloms stehen mit Daratumumab gegen CD38 und Elotuzumab gegen CS1 IgG1-Antikörper zur Verfügung. Die von uns konstruierten und Fc-engineerten chEBU-141-Antikörper könnten mit ihrem Zielantigen CD75s hier entsprechend einen Beitrag zu Erweiterung des Therapiespektrums reifer B-Zell-Neoplasien und des Multiplen Myeloms leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 1 Geräte

Gerät (Herstellerbezeichnung)	Hersteller, Sitz
Autoklav (Systec 5075EL)	Systec, Linden
Brutschrank (HERA cell 240)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (Navios Flow Cytometer)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Elektroporator (MicroPulser)	BioRad, Hercules, USA
Gefrierschrank (Kendro Typ HFU 686 Top)	Heraeus, Hanau
Heizblock (block heater SBH130D)	Stuart, Staffordshire, UK
Kühlschrank (Kühl-Gefrierkombination NoFrost)	Liebherr, Bulle
Lichtmikroskop (Axiovert25)	Zeiss, Oberkochen
MicroBeta TriLux 1450 LSC & Luminescence Counter	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 (Reference)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus (pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt
Pumpe (laboport)	KNF Neuberger, Freiburg
Schüttelinkubator (HT Infors)	Infors HT, Einsbach
Schüttler (3006)	GFL, Burgwedel
Sterilbank (HERA Safe Typ HS18)	Heraeus, Hanau
Thermocycler (Peltier Thermal Cycler-/PTC-200)	BioRad, Hercules, USA
UV-Tisch	Syngene, Cambridge, UK

Tab. 2 Labormaterialien

Material	Hersteller, Sitz
96-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
1450 MicroBeta 96-well-Platte	Perkin Elmer, Watham, MA, USA
Bechergläser	Schott, Mainz
S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Dialysiermembran (Ausschlussgröße: 25 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegskalpell	Feather, Osaka, J
Elektroporationsküvetten für Bakterien	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flaschen	Schott, Mainz
Gel-Gieß-Vorrichtung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Glasplatten und Kämme	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Kanülen	Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
Kulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Messzylinder	Kartell, Noviglio, I
Neubauerzählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Poly-prep Säule	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für Zytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterilfilter (groß) 0,22 µm	Merck, Darmstadt
Sterilfilter (klein) 0,22 µm	Pall, Part Washington, NY, USA
Zellsieb	Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA
Küvetten	Eppendorf, Hamburg

Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Kits

Name	Hersteller, Sitz
100 bp DNA ladder	Carl Roth, Karlsruhe
100 bp DNA ladder, extended	New England Biolabs, UK
250 bp DNA ladder	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Merck, Darmstadt
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Lonza, Basel, CH
Albumin	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Aqua dest.</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Capture Select IgG-CH1 Affinity Matrix</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chloroquin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
⁵¹ Chrom (⁵¹ Cr)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Coomassie	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Lymphoflot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylenthylendiamin	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
<i>NucleoBond Xtra Maxi Kit</i>	Machery Nagel, Düren
<i>NucleoSpin Mini Kit</i>	Machery Nagel, Düren
<i>OptiPhase SuperMix</i>	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
<i>Pierce BCA Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Precision Plus Protein Dual Color Standard</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Venlo, NL
<i>Super Optimal Broth (SOC)-Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tab. 4 Gele

Name	Zusammensetzung bzw. Hersteller, Sitz
Agarosegel (1 %)	100 ml 1×TAE-Puffer, 1 g Agarose
Mini-PROTEAN® TGX™ Gel	BioRad Laboratories, CA, USA

Tab. 5 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung bzw. Hersteller, Sitz
2×HBS-Puffer (pH 7,5)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
Coomassie-Lösung	60 ml H ₂ O 20 ml Methanol 20 ml 5×Roti Blue
FACS-Puffer (PBA)	1×PBS 1 % BSA 0,1 % Natriumazid
MTS-Lösung (pH 6,5)	Roche, Basel
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (reduzierend)	0,313 g/mol TRIS HCl (pH 6,8) 10 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 0,5 g/mol DTT
SDS-PAGE Probenpuffer (nicht-reduzierend)	0,313 g/mol TRIS HCl (pH 6,8) 10 % SDS 0,05% Bromphenolblau 50 % Glycerin

Tab. 6 Zellmedien und Zellkulturmaterialen

Material	Zusammensetzung bzw. Hersteller, Sitz
<i>Accutase</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
D10 ⁺	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10 % FBS 1 % P/S (10000 Units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>Penicillin/Streptomycin (P/S)</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
R10 ⁺	RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™ 10 % FBS 1 % P/S (10000 Units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Tab. 7 Zelllinien

Zelllinie	Referenz, Bezugsquelle	Zelltyp	Medium	Kultur
BHK CD16a-158F und CD16a-158V	Glorius, et al. (2013) (57)	stabil transfizierte Babyhamster-Nieren-Zellen	R10 ⁺	Adhärent
Daudi	DSMZ	humane Burkitt-Lymphom-Zellen	D10 ⁺	Adhärent
Lenti-X 293T	Lonza	embryonale Nieren-Zellen	D10 ⁺	Adhärent
U266	K. Nilsson (Uppsala, Schweden)	humane Myelom-Zellen	R10 ⁺	Suspension

Tab. 8 Bakterien und Bakterienmedien

Bakterienstamm	Zusammensetzung bzw. Hersteller, Sitz
2×YT-Medium (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)
Elektrokompetente <i>E. coli</i> XL-1 Blue	Eigene Herstellung
One Shot Mach1-T1 chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tab. 9 Vektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz	Hersteller, Sitz
pEx-A258-EBU-141-Duo-VH	Ampicillin	Eurofins Scientific, Luxemburg
pSec-CD19-Fc opt	Ampicillin	zur Verfügung gestellt
pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-eng-HC	Ampicillin	eigene Herstellung
pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-eng-HC	Ampicillin	eigene Herstellung
pSec-EBU-141-VH-wt-IgG1-HC	Ampicillin	zur Verfügung gestellt
pSec-EBU-VL-kappa-LC-Full	Ampicillin	zur Verfügung gestellt

Tab. 10 Enzyme

Enzyme	Puffer	Hersteller, Sitz
BspQI	NEB 3.1	NEB, Ipswich, MA, USA
Nhel	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
PpuMI	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
T4-Ligase	Ligase-Puffer	Hoffmann-La Roche, Basel, CH

Tab. 11 Antikörper

Antikörper	Antigen	Isotyp	Referenz/Hersteller, Sitz
chEBU-141	CD75s/CDw75	chimärer IgG1	nicht publiziert
chEBU-141 Duo	CD75s/CDw75	chimärer IgG1	nicht publiziert
chEBU-141 Fc eng	CD75s/CDw75	chimärer IgG1	nicht publiziert
chEBU-141 Duo Fc eng	CD75s/CDw75	chimärer IgG1	nicht publiziert
Cetuximab (Erbitux)	EGFR	chimärer IgG1	UKSH Apotheke
EBU-141	CD75s/CDw75	muriner IgM	Gramatzki, et al. (1991) (50)
<i>FITC-conjugated AffiniPure F(ab')2 fragment Goat Anti-Human IgG</i>	human IgG	F(ab')2 (Ziege)	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
<i>Goat Anti-Mouse IgM-FITC</i>	murine IgM	polyklonale Ak (Ziege)	Caltag Laboratories Carlsbad, USA
<i>Purified Mouse IgM, κ Isotype Control</i>	-	muriner IgM	BD Biosciences, Bedford, USA
Rituximab (Rituxan)	CD20	chimärer IgG1	UKSH Apotheke

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide für die Fc-engineerten chimären EBU-141

Antikörper

Um das Expressionsplasmid für die schwere Kette des Fc-optimierten chEBU-141 IgG1-Antikörpers chEBU-141 Fc eng herzustellen, wurde zunächst die CD19-bindende V_H im Plasmid *pSec-CD19-Fc opt* (*pSec*-Vektor) gegen die CD75s-bindende V_H von chEBU-141 (chEBU-141 V_H) aus dem Plasmid *pSec-EBU-141-VH1-wt-IgG1-HC* ausgetauscht. Der *pSec*-Vektor enthielt die genetische Information für die C_{H1} - bis C_{H3} -Domäne eines humanen IgG1 mit den Aminosäuremutationen S239D, I332E und E345K. Beide Vektoren wurden einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *PpuMI* für 16 h bei 37°C unterzogen (Tab. 12). Für die Herstellung des Plasmides für die schwere Kette des Fc-optimierten, tetravalenten chEBU-141 Duo Fc eng wurde die DNA-Sequenz (zwei über einen kurzen Linker verbundene V_H-C_{H1} -Fragmente) von der Firma Eurofins synthetisiert und mit einem Doppelverdau mit *NheI* und *BspQI* aus dem Plasmid *pEx-A258-EBU-141-Duo-VH* ausgeschnitten. Der *pSec-CD19-Fc opt*-Vektor wurde identisch behandelt. Dieser Restriktionsverdau wurde bei 37°C für 4 h und anschließend für 16 h bei 50°C im Heizblock durchgeführt. Die Restriktionsansätze sind in Tab. 12 aufgeführt. Das Plasmid für die Expression der leichten Kette ($V_L + C_L$) von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng wurde vom Labor zur Verfügung gestellt (*pSec-EBU-141-VL-kappa-LC-Full*) und unterscheidet sich zwischen den optimierten und nicht-optimierten Varianten der chEBU-141-Antikörper nicht.

Tab. 12 Restriktionsansätze

<i>pSec-CD19-Fc opt</i> (<i>pSec</i> -Vektor)	<i>pSec-EBU-VH-wt-IgG1-HC</i>
42,7 µl <i>Aqua dest.</i>	42,7 µl <i>Aqua dest.</i>
5 µl 10×CutSmart Puffer	5 µl 10×CutSmart Puffer
0,3 µl DNA (7 µg/µl)	0,3 µl DNA (6,8 µg/µl)
1 µl <i>NheI</i>	1 µl <i>NheI</i>
1 µl <i>PpuMI</i>	1 µl <i>PpuMI</i>

<i>pEx-A258-EBU-141-Duo-VH</i>
42 µl <i>Aqua dest.</i>
5 µl 10×NEB 3.1 Puffer
1 µl DNA (2 µg/µl)
1 µl <i>NheI</i>
1 µl <i>BspQI</i>

Für die Isolierung der benötigten DNA-Fragmente wurden die Restriktionsansätze in einer 1 %igen Agarosegelelektrophorese für 1 h bei 120 V in 1xTAE-Puffer ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wurde ein Reaktionsgemisch aus jeweils 50 µl des Doppelverdaus mit 10 µl 6×*Loading Dye* (NEB) versetzt und zusammen mit einem Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden anschließend für 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Einwegskalpells unter Zuhilfenahme von UV-Licht ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Protokoll aus dem Gel eluiert. Für die Ligation der DNA-Fragmente wurden je 7 µl *pSec*-Vektor, 2 µl *Ligation Buffer* und 1 µl *T4 DNA Ligase* mit 10 µl chEBU-141 V_H (Vector-to-Insert-Ratio 1:3) oder 1 µl chEBU-141 Duo V_H (Vector-to-Insert-Ratio 1:1) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 16 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation von je 4 µl der Ligationsansätze mittels Hitzeschock in je 50 µl chemisch kompetente *E. coli* nach Protokoll des Herstellers. Daraufhin wurden je 100 µl der transformierten Zellen auf 2×YT_{Amp}-Platten ausgestrichen und 16 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 10 *E. coli*-Klone gepickt und in je 5 ml 2xYT-Medium mit jeweils 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Nach erneuter 16-stündiger Inkubation bei 37°C im Schüttler (200 rpm) wurde die Plasmid-DNA mittels *NucleoSpin Plasmid DNA purification Kit* (Macherey-Nagel) nach Protokoll aus den *E. coli* isoliert. Um die Expressionsplasmide (*pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-opt-HC* und *pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-opt-HC*) initial zu überprüfen, wurden Kontrollverdaue mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *PpuMI* durchgeführt (Tab. 13).

Tab. 13 Restriktionsansatz für Kontrollverdau

16,5 µl <i>Aqua dest.</i>
2,5 µl 10× <i>CutSmart</i> Puffer
5 µl DNA
0,5 µl <i>NheI</i>
0,5 µl <i>PpuMI</i>

Je zwei positive *E. coli*-Klone, die die erwarteten Fragmentgrößen bei der anschließenden Agarosegelelektrophorese der Kontrollverdaue zeigten, wurden ausgewählt und 200 ml 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit diesen Klonen angeimpft. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 200 rpm im Schüttler wurden die Plasmide mit dem *NucleoBond Xtra Maxi-Kit* (Macherey-Nagel) nach Protokoll aus den *E. coli* isoliert. Die DNA-

Konzentration wurde mittels photometrischer Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die Reinheit der doppelsträngigen DNA wurde aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ermittelt, wobei die Werte bei allen Proben zwischen 1,8-2,0 lagen und somit als rein eingestuft werden konnten.

2.2.2 Sequenzierung der Expressionsplasmide

Um die korrekte Basenabfolge der Sequenzen in den Expressionsplasmiden zu überprüfen und unerwünschte Punktmutationen auszuschließen, wurden die Proben im Zentrum für Molekulare Biowissenschaften der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel einer Sequenzierung nach Sanger unterzogen. Die Sequenzierungsansätze setzten sich aus 3 µl (300 ng) Plasmid-DNA (*pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-eng-HC* und *pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-eng-HC*) sowie je 1 µl (4,8 µM) der Primer *pSec CMV (forward)*, *pSec CH1 (forward)*, *pSec back1 (reverse)*, *pSec back2 (reverse)* oder *pSec Reverse* (alle Sigma-Aldrich) zusammen. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit der *Vector NTI Software* (Thermo Fisher Scientific).

2.2.3 Antikörperexpression und -aufreinigung

2.2.3.1 Expression in Lenti-X 293T-Zellen durch Kalziumphosphat-Transfektion

Sowohl für die Expression des chEBU-141 Fc eng als auch des chEBU-141 Duo Fc eng wurden Lenti-X 293T-Zellen verwendet. Es wurden 3×10^6 Lenti-X 293T-Zellen auf 100 sterile 12 cm-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO₂ inkubiert, sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine optimale Zelldichte von 50 % hatten. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 8 ml frisches D10⁺-Medium auf jede Platte pipettiert. Im nächsten Schritt wurden zwei DNA-Ansätze mit Volumina von je 5x20 ml, bestehend aus jeweils 500 µg Plasmid-DNA für die schwere Kette (*pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-eng-HC* bzw. *pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-eng-HC*) und 500 µg *pSec-EBU-141-VL-kappa-LC-Full* für die leichte Kette von chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo Fc eng, 250 µl Chloroquin, 5 ml Kalziumchlorid sowie 45,6 ml *Aqua dest.*, tropfenweise im Verhältnis 1:1 zu je 5x20 ml 2xHBS-Puffer pipettiert, während gleichzeitig mit einer zweiten Pipette Luft in den Ansatz gegeben wurde. Im nächsten Schritt wurden pro Platte tropfenweise jeweils 2 ml des DNA-Gemisches gleichmäßig auf den Lenti-X 293T-Zellen verteilt. Nach 8-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde der Überstand abgesaugt und durch 15 ml frisches Medium pro Platte ersetzt. Nach 3 und nach 6 Tagen

wurden die Zellkulturüberstände in sterilen 2 l-Flaschen gesammelt und die Platten dann entsorgt. Nach demselben Protokoll wurden zur Kontrolle auch die nicht-optimierten chEBU-141 und chEBU-141 Duo IgG1-Antikörper mit bereitgestellten Plasmiden produziert.

2.2.3.2 Aufreinigung der Antikörper

Vor der eigentlichen Aufreinigung wurden die im Überstand noch vorhandenen Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (4000 rpm, 4°C, 20 min) entfernt und anschließend der pH-Wert der Überstände mittels 3 M NaOH auf 8,0 eingestellt. Als nächstes wurden die Zellkulturüberstände mit den darin enthaltenen Antikörpern steril filtriert und die *Capture Select IgG-CH1 Affinity Matrix* im Verhältnis 1:1000 für 16 h bei 4°C eingerührt. Die *Beads* mit den gebundenen Antikörpern wurden danach bei 2000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Die *Beads* wurden in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt und bis zu drei Mal in 50 ml kaltem 1xPBS bei 1600 rpm und 4°C für 10 min gewaschen bis der Überstand klar und keine sichtbaren Reste von Medium mehr erkennbar waren. Die *Beads* mit den gebundenen Antikörpern wurden dann in einer Poly-Prep-Säule gesammelt und nochmal mit 10 ml kaltem 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper mit Hilfe von 6 ml 0,1 M Glycin (pH 3,0) in ein 15 ml-Röhrchen, in dem 1,2 ml 0,1 M TRIS (pH 8,0) zuvor hinzugefügt worden war, von der Säulenmatrix bzw. den *Beads* eluiert. Der nächste Schritt beinhaltete die Dialyse des Eluats. Hierfür wurde das Eluat in eine Dialysiermembran (Ausschlussgröße: 25 µm) pipettiert, die zuvor in 1xPBS eingeweicht worden war. Die Antikörper wurden im Anschluss für drei Tage gegen je 5 l steriles 1xPBS bei 4°C dialysiert, wobei ein täglicher Wechsel des Dialysepuffers erfolgte. Zum Schluss wurden die dialysierten Antikörper in ein 6 ml Vivaspin-Röhrchen gefüllt und bei 4000 rpm zentrifugiert, bis das Volumen auf etwa 1 ml eingeengt war. Danach wurden die Antikörper erneut steril filtriert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay, SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Um die Konzentration der aufgereinigten Antikörper zu bestimmen, wurde zunächst der BCA-Test nach Smith (58) mit dem *Pierce BCA Assay Kit* entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte in 96-well-Platten mit dem *Sunrise Remote Reader* und die Auswertung mit der *Magellan-Data Analysis Software* (beides Tecan). Als Referenz diente eine Standardkurve mit bovinem Serumalbumin in definierten Konzentrationen von 25 bis 2000 µg/ml. Die produzierten Antikörper wurden für die Messungen jeweils 1:2 und 1:10 verdünnt und die Konzentrationen mithilfe der

Standardkurve aus Triplikaten ermittelt. Anschließend wurden unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden Verdünnungen des CD20-Antikörpers Rituximab mit definierten Konzentrationen zusammen mit den zu testenden chimären IgG1-Antikörpern chEBU-141, chEBU-141 Duo, chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng zur Abschätzung der Proteinkonzentration und Reinheit mit einem reduzierenden oder nicht-reduzierenden Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden je 10 µl auf ein 4-15 %iges *Mini-PROTEAN® TGX*-Gel der Firma Bio Rad aufgetragen. Zur Größenabschätzung diente der *Precision Plus Protein Dual Color Standard*. Die Gelelektrophorese wurde für 5 min bei 100 V und anschließend für weitere 60 min bei 120 V in SDS-PAGE Laufpuffer durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine im Gel mittels Coomassie-Lösung für 16 h bei Raumtemperatur angefärbt und die Gele anschließend über mehrere Stunden in Leitungswasser wieder entfärbt.

2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen

Um die Bindung der Antikörper an das Zielantigen CD75s sowie die Bindung der Fc-Region an den Fc_YRIIIa zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Messungen mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml 1xPBS gewaschen und für 5 min bei 1600 rpm und 21°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und eine Zählung der Zellen mit Trypanblau vorgenommen, die dann mittels kaltem FACS-Puffer (1x PBS + 1 % BSA + 0,1 % Natriumazid) auf 5x10⁶/ml eingestellt wurden. Danach wurden 100 µl bzw. 500.000 Zellen auf Eis in FACS-Röhrchen pipettiert und mit den zu untersuchenden Antikörpern in den im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit 3 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen sowie zwischen den Waschschritten für 5 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets abschließend in je 50 µl FACS-Puffer mit dem Sekundärantikörper *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')2 fragment Goat Anti-Human IgG* (1:20 verdünnt) resuspendiert und erneut für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wie zuvor beschrieben gewaschen, in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit dem *Navios Flow Cytometer* gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der *Kaluza Analysis Software Version 1.3* (Beckman Coulter).

2.2.5 MTS-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität

Der MTS-Assay wird zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen verwendet. Dabei wird die Zellvitalität mit der Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinat-Dehydrogenase korreliert. In stoffwechselaktiven Zellen (z.B. Tumorzellen) ist dieses Enzym in der Lage, das gelbliche Tetrazoliumsalz in das braune, unlösliche Formazan zu reduzieren (59). Kommt die Stoffwechselaktivität zum Erliegen, ist diese Reaktion nicht mehr möglich. Die Versuche wurden in einem finalen Volumen von 200 µl pro well in 96-well-Zellkulturplatten durchgeführt. Pro well wurden hierbei 20.000 Zielzellen in ihrem entsprechenden Zellkulturmedium mit den Antikörpern in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Als Kontrolle dienten Medium- sowie Zellwerte ohne Antikörper. Die Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert und 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 25 µl MTS-Lösung pro well hinzugegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung des Prozentsatzes lebender Zellen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenz-Wellenlänge 650 nm) mit dem *Sunrise Remote Photometer* (Tecan) gemessen, die Triplikate gemittelt und anschließend das Verhältnis lebender, behandelter Zellen nach unten stehender Formel in Relation zur Absorption lebender, unbehandelter Zellen gesetzt.

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

2.2.6 Zytotoxizitätsversuche (⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche)

2.2.6.1 Aufreinigung der Effektorzellen

Entsprechend der Deklaration von Helsinki wurden alle Versuche mit humanen Zellen nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Ethikvotum AZ.: D467/15; siehe Anhang unter Punkt 7) und dem schriftlichen Einverständnis der Personen durchgeführt. Um periphere mononukleäre Zellen (MNC) als Effektorzellen für die Zytotoxizitätsversuche zu erhalten, wurden *Leukocyte-Reduction-System-Chambers* (LRSC-Kammern) als Abfallprodukte bei der Bluttransfusionsherstellung des UKSH-Blutspendezentrums von schriftlich aufgeklärten und einverstandenen, pseudonymisierten Spendern verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden die LRSC-Kammern geöffnet und der Inhalt (ca. 10 ml) in ein 50 ml-Röhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden mit 1xPBS auf 40 ml aufgefüllt. Anschließend wurden je 15 ml

Lymphoflot (Ficoll-Dichtegradienten-Lösung) in vier 50 ml-Röhrchen vorgelegt und mit je 10 ml verdünntem Inhalt der LRSC-Kammern vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden anschließend für 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse und 21°C einer Dichtegradientenzentrifugation zugeführt. Die MNC-Schicht wurde vorsichtig abgesaugt und in ein steriles Röhrchen überführt. Die MNC wurden mit 1xPBS gewaschen, für 5 min bei 1600 rpm und 21°C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss entfernt. Um eventuell verbliebene Erythrozyten zu entfernen, wurde 45 ml kaltes destilliertes Wasser zugegeben und die Zellen für 30 s darin inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 ml 10xPBS beendet. Die Proben wurden zweimal für 5 min bei 1600 rpm gewaschen, der Überstand entfernt und die so erhaltenen MNCs in 25 ml R10⁺-Medium resuspendiert und gezählt. Je 100 Mio. MNC wurden in 20 ml R10⁺-Medium über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, um am nächsten Tag für die ⁵¹Chrom-Freisetzungsversuche (Punkt 2.2.6.2) verwendet zu werden. MNCs von Lymphompatienten, die 94-98 % Tumorzellen enthielten und in einigen Versuchen als Zielzellen dienten, wurden aus dem peripheren Blut (EDTA-Röhrchen) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und entweder direkt verwendet oder kryokonserviert gelagert.

2.2.6.2 Messung der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC)

Für die ADCC-Versuche wurden 400.000 MNCs mit 5.000 Zielzellen in einer *effector-to-target-ratio* (E/T-Ratio) von 80:1 in einem Gesamtvolumen von 200 µl R10⁺-Medium pro well in einer 96-well-Platte inkubiert. Die Zielzellen wurden zuvor mit 100 µCi ⁵¹Cr für 2 h bei 37°C inkubiert und dreimal mit R10⁺-Medium gewaschen (Zentrifugationen bei 1600 rpm und 21°C für 5 min), um freies ⁵¹Cr zu entfernen, bevor sie mit den Effektorzellen und den Antikörpern in Triplikaten für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 2000 rpm, woraufhin 25 µl Überstand zu 150 µl *OptiPhase SuperMix* in eine *1450 MicroBeta* 96-well-Platte pipettiert wurden. Der *OptiPhase SuperMix* diente dabei zur Umwandlung der radioaktiven Strahlung des freigesetzten ⁵¹Cr lysierter Zellen in messbare Lumineszenzsignale, die mit dem *MicroBeta TriLux 1450 Counter* gemessen werden konnten. Die Antikörper-abhängige Lyse wurde nach der unten angegebenen Formel berechnet. Mittels Zugabe von 1 % v/v Triton X-100 zu den Zielzellen wurden die maximalen *counts per minute* (cpm) bestimmt. Für die Bestimmung der basalen cpm wurden Zielzellen ohne Antikörper und Effektoren verwendet.

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle cpm} - \text{Basale cpm}}{\text{Maximale cpm} - \text{Basale cpm}} \times 100$$

2.2.6.3 Messung der Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC)

Nach schriftlicher Aufklärung und Einwilligung wurde für die Analyse der CDC-Aktivität frisches humanes Serum von gesunden Spendern oder B-CLL-Patienten verwendet, das mittels Serum-Blutentnahmeröhrchen gewonnen wurde. Das Serum wurde 30 min bei 4°C inkubiert, anschließend für 20 min bei 3000 rpm zentrifugiert, steril abgenommen und mit einem Volumen von 50 µl pro well (25 % v/v) als Quelle für humane Komplementfaktoren in den Chrom-Freisetzungsversuchen anstelle der MNCs (Punkt 2.2.6.2) verwendet.

2.2.7 Statistische Analysen

Zur grafischen und statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde das Programm *GraphPad PRISM 8.0* (GraphPad Software) verwendet. Für die Berechnung der Signifikanzwerte (*p*-Werte) wurde der *one-way analysis of variance (ANOVA)* genutzt, wobei die Nullhypothese für *p* < 0,05 verworfen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Fc-optimierten IgG1 Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng

3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Um die Expressionsplasmide für die Produktion von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng herzustellen, wurde die genetische Information für die V_H von chEBU-141 aus dem Plasmid *pSec-EBU-141-VH-wt-IgG1-HC* (*pSec-EBU-VH*, Abb. 2A) und die genetische Information für die zwei über einen kurzen Linker verbundenen V_H-C_{H1} -Domänen von chEBU-141 Duo aus dem Plasmid *pEx-A258-EBU-141-Duo-VH* (*pEx-EBU-Duo-VH*, Abb. 2A), wie im Methodenteil unter Punkt 2.2.1 beschrieben, mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *PpuMI* bzw. *NheI* und *BspQI* geschnitten, um sie anschließend in einen jeweils identisch geschnittenen *pSec*-Vektor zu klonieren, der bereits die genetische Information für die restlichen konstanten Bereiche der schweren Kette eines humanen IgG1 mit den Aminosäuremutationen S239D, I332E und E345K enthielt. Durch Agarosegelektrophorese wurden die entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. In Abb. 2A sind die DNA-Fragmente mit den erwarteten Größen (chEBU-141 V_H : 428 bp; chEBU-141 Duo- V_H : 1258 bp; *pSec*-Vektor: 6600 bp), die anschließend aus den Gelen ausgeschnitten und miteinander ligiert wurden (chEBU-141 V_H bzw. chEBU-141 Duo- V_H in den *pSec*-Vektor), durch Pfeile gekennzeichnet. Die Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und die Sequenzen abschließend mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Für die Herstellung der Antikörper standen somit die Expressionsplasmide *pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-eng-HC* und *pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-eng-HC* für die schweren Ketten und *pSec-EBU-141-VL-kappa-LC-Full* für die leichte Kette (vom Labor zur Verfügung gestellt) zur Verfügung. In Abb. 2B sind schematisch die Fc-engineerten IgG1-Antikörper chEBU-141 Fc eng (I) und chEBU-141 Duo Fc eng (II) mit den durch einen Stern markierten Aminosäuremutationen in der C_{H2} - und C_{H3} -Domäne dargestellt.

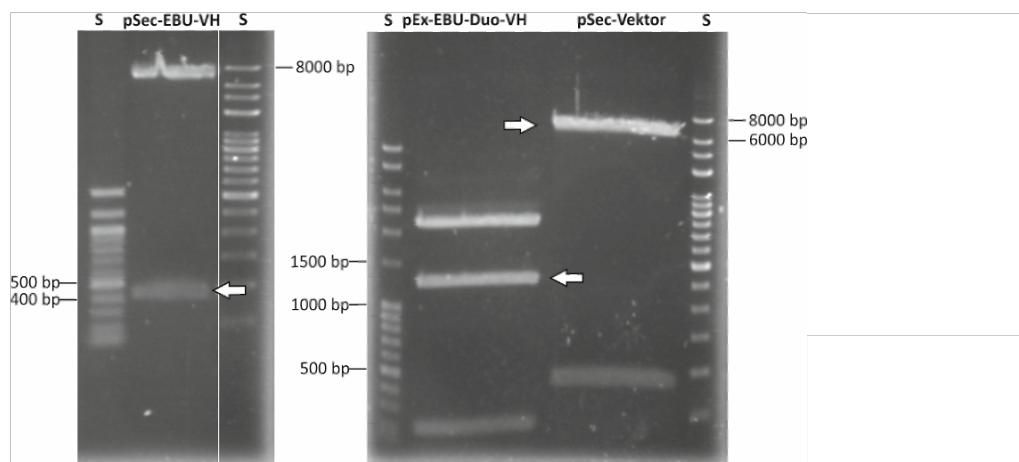
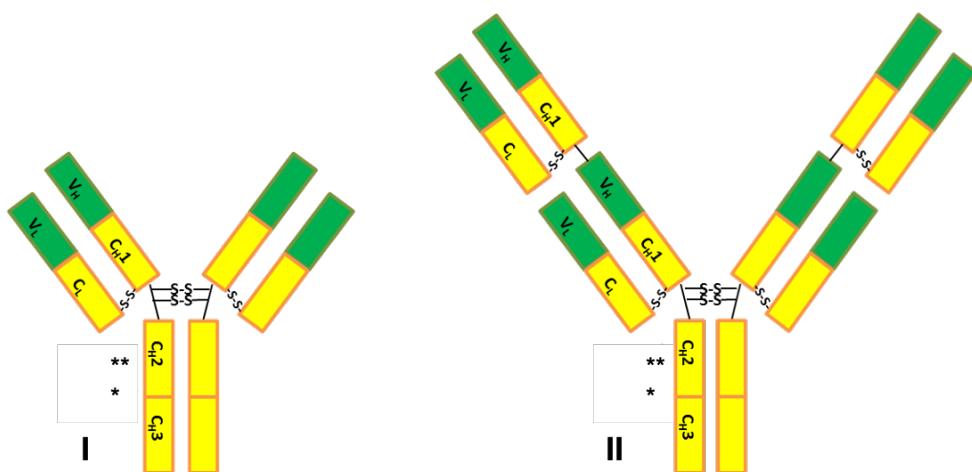
A**B**

Abb. 2. Herstellung der Expressionsplasmide für die Fc-optimierten chEBU-141-Antikörper. (A) Gezeigt sind die Agarosegele der „Ursprungsplasmide“ nach Restriktionsverdau wie im Material und Methodenteil beschrieben. Die für die Herstellung der Expressionsplasmide verwendeten DNA-Fragmente (die V_H von chEBU-141 (links), die V_H - C_H1 -Domänen von chEBU-141 Duo (Mitte) und der *pSec*-Vektor, der die genetische Information für die fehlenden konstanten Domänen der schweren Kette eines IgG1-Antikörpers mit den Aminosäuremutationen S239D, I332E und E345K enthielt (rechts)), sind mit Pfeilen gekennzeichnet. S = Größenstandard. **(B)** Schematische Darstellung der Fc-engineerten IgG1-Antikörper chEBU-141 Fc eng (I; links) und chEBU-141 Duo Fc eng (II; rechts) mit den ungefähren Positionen der Aminosäuremutationen S239D-I332E-E345K in den C_H2 - und C_H3 -Domänen (*). S-S = Disulfidbrücken.

3.1.2 Herstellung der Antikörper

Die Fc-optimierten Antikörper wurden durch Kalziumphosphat-Transfektion einer 1:1 Mischung der Expressionsplasmide *pSec-EBU-141-VH-IgG1-Fc-eng-HC* bzw. *pSec-EBU-141-Duo-VH-IgG1-Fc-eng-HC*, die für die schwere Kette von chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo Fc eng kodieren, mit *pSec-EBU-141-VL-kappa-LC-Full* für die leichte Kette in Lenti-X-293T-Zellen exprimiert. Mit vom Labor zur Verfügung gestellten Plasmiden wurden in identischer Weise auch die nicht-optimierten IgG1-Antikörper chEBU-141 und chEBU-141

Duo hergestellt. Nach der affinitätschromatografischen Aufreinigung mittels *Capture Select IgG-CH1 Affinity Matrix* und Dialyse der exprimierten chimären IgG1-Antikörper chEBU-141, chEBU-141 Fc eng, chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng, wurde die Konzentration und Reinheit in den finalen Proteinpräparationen überprüft. Als Referenz dienten Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen von Rituximab, einem chimären IgG1-Antikörper gegen CD20. Die Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay ergab Proteinkonzentrationen von ca. 1 mg/ml für alle Antikörper, womit im Durchschnitt aus 1 l Überstand 1 mg Antikörper gewonnen werden konnten. Zusätzlich wurden SDS-PAGE-Analysen unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt (Abb. 3A und 3B). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wandern die Antikörper in ihrer Gesamtheit durch das elektrische Feld und zeigen das erwartete Molekulargewicht von 150 kDa im Falle der IgG1-Antikörper chEBU-141 und chEBU-141 Fc eng, das dem Molekulargewicht des Kontroll-IgG1-Antikörpers Rituximab entspricht, sowie ein Molekulargewicht von 250 kDa im Falle der um jeweils zwei Fab-Fragmente größeren IgG1-Antikörper chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng (Abb. 3A). Unter reduzierenden Bedingungen werden die Disulfidbrücken (Abb. 2) durch das DTT im Puffer „gespalten“, wodurch die Antikörper in ihre schweren und leichten Ketten zerfallen und die einzelnen Bestandteile entsprechend ihres Molekulargewichts durch das elektrische Feld wandern. Die leichten Ketten von IgG1-Antikörpern haben ein Molekulargewicht von 25 kDa, die schweren Ketten von 50 kDa. Bei den Duo-Antikörpern besitzt die modifizierte schwere Kette ein Molekulargewicht von 75 kDa. Wie in Abb. 3B zu sehen, finden sich die leichten Ketten aller Antikörper, inklusive des Kontroll-Antikörpers Rituximab, wie erwartet bei 25 kDa. Die schweren Ketten von Rituximab, chEBU-141 und chEBU-141 Fc eng zeigen das erwartete Molekulargewicht von 50 kDa und die von chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng das erwartete Molekulargewicht von 75 kDa (Abb. 3B). Da in den Coomassie-Gelen keine weiteren Banden sichtbar sind, weisen die aufgereinigten Antikörper keine Verunreinigungen durch andere Proteine auf. Zudem konnte mit Hilfe der Verdünnungsreihen von Rituximab eine Konzentration von ca. 1,25 mg/ml für den chEBU-141 Fc eng und ca. 1 mg/ml chEBU-141 Duo Fc eng sowie ca. 0,5 mg/ml für den chEBU-141 und chEBU-141 Duo ermittelt werden. Im Zusammenschaublick mit den ermittelten Proteinkonzentrationen aus dem BCA-Assay, wurden finale Konzentrationen von 1 mg/ml für

den chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng sowie 0,75 mg/ml für den chEBU-141 und chEBU-141 Duo bestimmt.

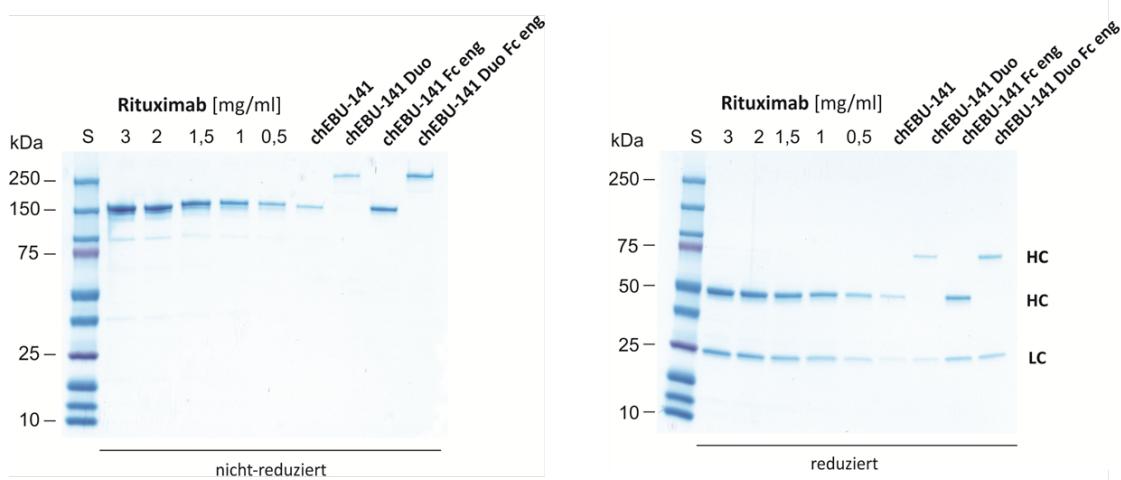


Abb. 3. Coomassie-Gele zur Überprüfung des Molekulargewichts, der Reinheit und Konzentration der chEBU-141-Antikörper. Die Antikörper chEBU-141, chEBU-141 Duo, chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng wurden mit definierten Konzentrationen von Rituximab unter nicht-reduzierenden (links) und reduzierenden (rechts) Bedingungen durch SDS-PAGE Analysen entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt und die Proteine mit anschließender Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. kDa = Kilodalton. S = Größenstandard. HC = *heavy chain* (schwere Kette), LC = *light chain* (leichte Kette).

3.1.3 Analysen des Bindungsverhaltens der bi- oder tetravalenten Varianten von chEBU-141

Um zu überprüfen, ob die zusätzliche Integration zweier Fab-Fragmente in den chEBU-141 Duo-Antikörper zu einer verbesserten Bindung an das Antigen CD75s im Vergleich zum bivalent bindenden chEBU-141-Antikörper führt, wurden durchflusszytometrische Analysen mit der CD75s-positiven Myelom-Zelllinie U266 durchgeführt, die ursprünglich auch für die Herstellung des Hybridom-Antikörpers EBU-141 verwendet worden war (50). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind in Abb. 4A dargestellt. Sowohl für den chEBU-141 Fc eng als auch den chEBU-141 Duo Fc eng konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an die U266-Zellen gemessen werden, wohingegen ein chimärer IgG1-Kontrollantikörper keine Bindung zeigte. Im Vergleich zum chEBU-141 Fc eng kann beim tetravalenten chEBU-141 Duo Fc eng eine doppelt so hohe Fluoreszenzintensität bei identischen Konzentrationen festgestellt werden, was auf eine verbesserte Avidität des chEBU-141 Duo-Antikörpers für CD75s hinweist (Abb. 4A). Diese Daten sind vergleichbar mit den Bindungsanalysen der nicht-optimierten Antikörper chEBU-141 und chEBU-141 Duo auf

U266-Zellen, die schon in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Die Berechnung der halbmaximalen Konzentration (EC_{50}) war für chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng nicht möglich, da beide Antikörper auch mit 500 µg/ml nicht die Sättigung erreichten.

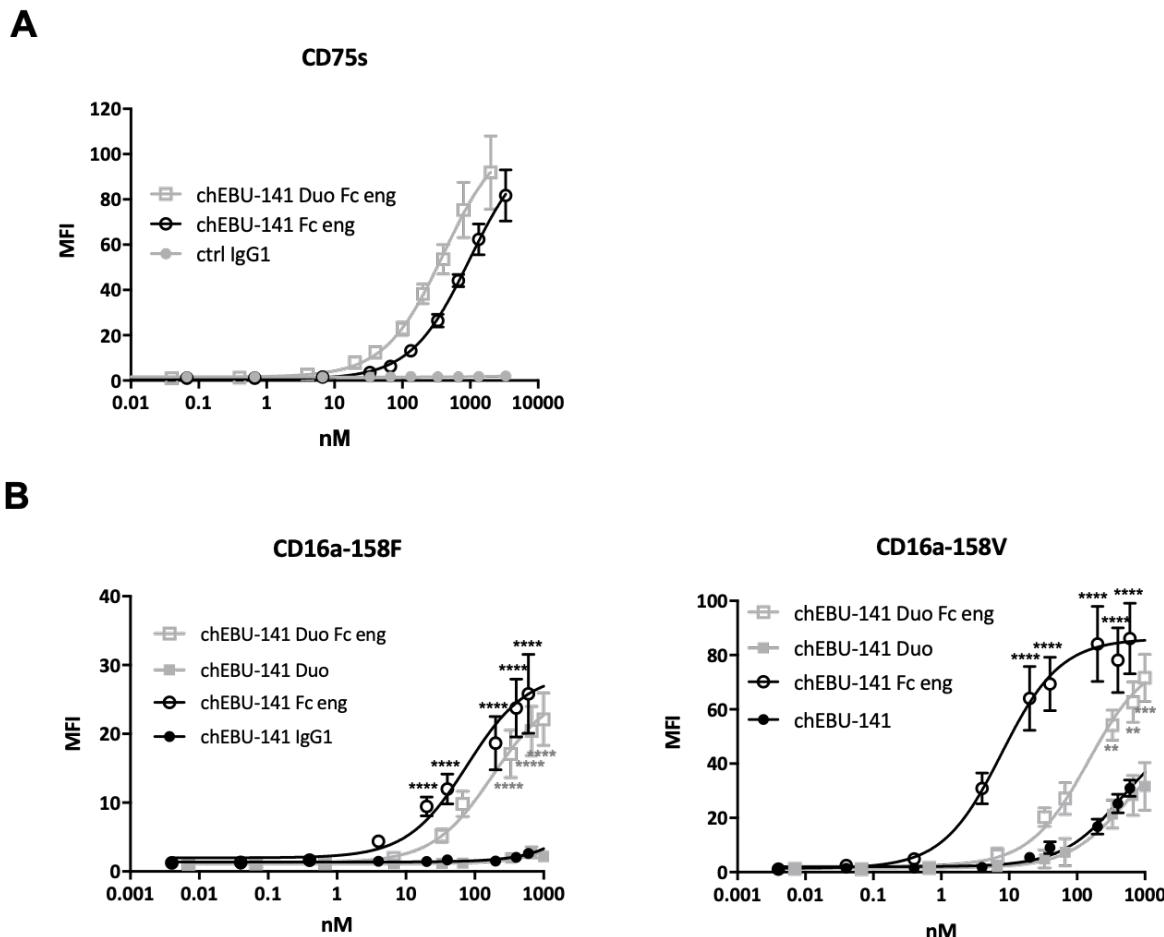


Abb. 4. Analyse der Antigen- und Fc γ RIIIa-Bindung der chEBU-141-Antikörpervarianten. Durchflusszytometrische Bindungsanalysen mit steigenden Konzentrationen von chEBU-141 Fc eng (o), chEBU-141 Duo Fc eng (□) und einer IgG1-Isotypkontrolle (●) mit der CD75s-positiven Myelom-Zelllinie U266 (A) bzw. von (B) chEBU-141 (●), chEBU-141 Duo (□), chEBU-141 Fc eng (o) sowie chEBU-141 Duo Fc eng (□) mit stabil transfizierten BHK-Zellen, die entweder die niedrig-affine Phenylalanin- (CD16a-158F; links) oder die hoch-affine Valin-Variante (CD16a-158V; rechts) des Fc γ RIIIa exprimieren. Für alle Färbungen wurden je 500.000 Zellen und als Sekundärantikörper *FITC-conjugated AffiniPure F(ab')2 fragment Goat Anti-Human IgG* verwendet. MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität. nM = Nanomolar. ** = p≤0,01 chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. *** = p≤0,001 chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. **** = p≤0,0001 chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Messungen.

Um festzustellen, ob die Aminosäureaustausche S239D und I332E in den Fc-Regionen des chEBU-141 Fc eng und des chEBU-141 Duo Fc eng zu einer verbesserten Bindung im Vergleich zu den chEBU-141 und chEBU-141 Duo IgG1-Antikörpern an den aktivierenden Fc γ RIIIa (CD16a) führen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit stabil transfizierten BHK-Zellen durchgeführt, die entweder die niedrig-affine Phenylalanin-Variante an Position

158 (CD16a-158F) oder die hoch-affine Valin-Variante des Fc γ RIIIa (CD16a-158V) exprimieren. Wie in Abb. 4B zu erkennen, zeigen chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zu den Wildtyp-Antikörpern chEBU-141 und chEBU-141 Duo eine signifikant stärkere Fc γ RIIIa-Bindung und zwar sowohl bei den durchflusszytometrischen Messungen mit der hoch- als auch niedrig-affinen Rezeptorvariante. Die EC₅₀-Werte von chEBU-141 und chEBU-141 Duo konnten nicht ermittelt werden, da die Bindung der Antikörper nicht in die Sättigung geht. Für chEBU-141 Fc eng konnten EC₅₀-Werte von 77,34 nM für CD16a-158F und 7,75 nM für CD16a-158V und für chEBU-141 Duo Fc eng EC₅₀-Werte von 181,8 nM für CD16a-158F und 147,4 nM für CD16a-158V ermittelt werden. Die Ergebnisse bestätigen eine höhere Affinität von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng für den Fc γ RIIIa. Interessanterweise hat der chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zum chEBU-141 Fc eng eine schwächere Affinität für beide Varianten des Fc γ RIIIa, obwohl die Mutationen identisch sind und keine weiteren Veränderungen im Fc-Teil der beiden Antikörper vorgenommen wurden. Die Bindungskurven für die nicht-optimierten chEBU-141 und chEBU-141 Duo IgG1-Antikörper und somit die Affinitäten dieser Antikörper für den Fc γ RIIIa sind annähernd deckungsgleich (Abb. 4B). Weiterhin binden alle chEBU-141-Antikörpertypen mit höherer Affinität an die BHK-Zellen mit der hoch-affinen Valin-Variante des Rezeptors als an die BHK-Zellen mit der niedrig-affinen Phenylalanin-Variante und bestätigen somit die unterschiedliche Affinität von IgG1-Antikörpern für diesen Fc γ RIIIa-Polymorphismus (60).

3.1.4 chEBU-141-Antikörper hemmen nicht die Proliferation CD75s-positiver Tumorzellen

Um direkte, wachstumsinhibierende Effekte der Antikörper auf CD75s-positive Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Aktivität mitochondrialer Enzyme und damit die Proliferation von Burkitt-Lymphom (Daudi)-Zellen und U266-Myelomzellen mittels 72 h MTS-Assay bestimmt. Weder durch die Inkubation mit Konzentrationen von 100 µg/ml des ursprünglichen Maus-IgM-Antikörpers EBU-141 noch mit den chimären IgG1-Antikörpern chEBU-141, chEBU-141 Fc eng, chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng, kam es zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 5). Diese Ergebnisse bestätigen vorige Untersuchungen (Doktorarbeit Malena Kristin Buck) und belegen, dass die CD75s-bindenden EBU-141-Antikörper keinen direkten Einfluss auf die Zellviabilität von Lymphom- und Myelomzellen haben.

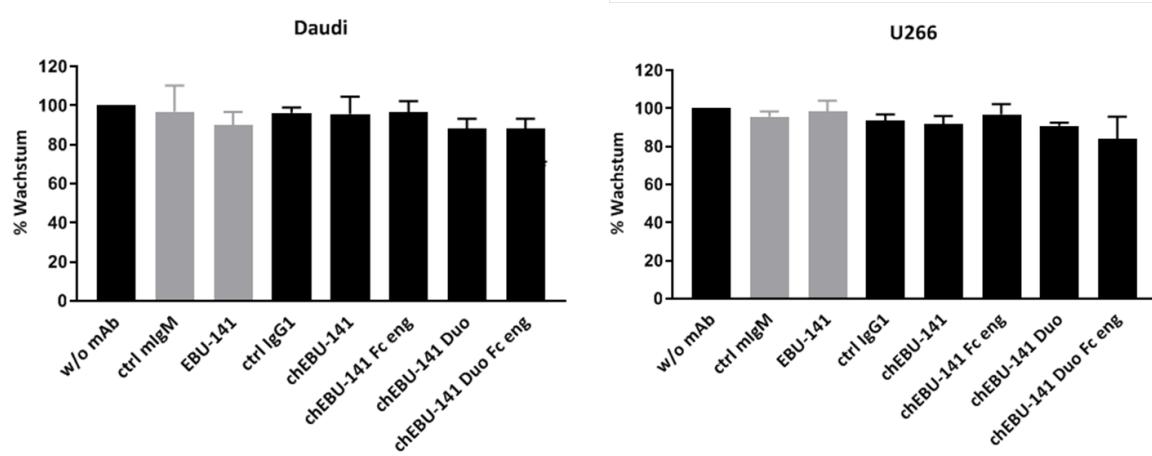


Abb. 5. Ergebnisse von MTS-Assays mit Daudi- und U266-Zellen zur Überprüfung proliferationsinhibierender Effekte der chEBU-141-Antikörper. Prozentuales Wachstum von CD75s-positiven Daudi Lymphomzellen (links) bzw. U266 Myelomzellen (rechts) nach 72 h Inkubation mit je 100 µg/ml EBU-141 (grau), chEBU-141, chEBU-141 Fc eng, chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng (alle schwarz) bzw. der entsprechenden humanen IgG1-(ctrl IgG1; schwarz) oder murinen IgM-Isotypkontrolle (ctrl IgM; grau) in Relation zu unbehandelten Zellen ohne Antikörper (w/o mAb; schwarz). Angegeben sind Mittelwerte ± SEM von drei individuellen Versuchen mit Triplikaten mit je 20.000 Zellen.

3.1.5 Analyse der ADCC- und CDC-Aktivität der Fc-egnineerten chEBU-141-Antikörper

3.1.5.1 Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität

Die Aminosäuremutationen S239D und I332E in den Fc-Regionen des chEBU-141 Fc eng und des chEBU-141 Duo Fc eng führen zu einer verbesserten Bindung der Fc-engineerten Antikörper an den aktivierenden FcγRIIIa (Abb. 4B), der in der Regel als einziger FcγR von NK-Zellen exprimiert wird. Um nun festzustellen, ob die höhere Affinität zum FcγRIIIa konsekutiv zu einer effektiveren Antikörper-abhängigen Lyse von Tumorzellen durch die Fc-optimierten Antikörper im Vergleich zu den nicht-optimierten Antikörpervarianten führt, wurden die Antikörper in klassischen ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen mit MNC von gesunden Spendern (5-30 % NK-Zellen) als Effektorzellen und Daudi- bzw. U266-Tumorzellen in einer E/T-Ratio von 80:1 verglichen. Vergleicht man den EC₅₀-Wert und die mittlere maximale Zelllyserate ± SEM von chEBU-141 (EC₅₀-Wert: 32,12 nM; max. Zelllyserate: $40,12 \pm 4,8\%$) bei einer maximal getesteten Konzentration von 100 µg/ml (670 nM) mit chEBU-141 Duo (EC₅₀: 2,82 nM max. Zelllyserate: $39,03 \pm 4,7\%$) bei einer maximalen Konzentration von 50 µg/ml (200 nM) gegen Daudi-Zellen (Tab. 14), so ist festzustellen, dass der tetravalente chEBU-141 Duo 11,4-fach geringere Konzentrationen zum Erreichen des halbmaximalen Effekts benötigt als der chEBU-141 bei vergleichbaren maximalen Lyseraten. Dies deutet darauf hin, dass mittels verbesserter Avidität zu CD75s durch den tetravalenten Ansatz des chEBU-141 Duo

geringere Konzentrationen an Antikörpern für vergleichbare Effekte vonnöten sind. Betrachtet man im Vergleich dazu die EC₅₀-Werte und die mittleren maximalen Zelllyseraten ± SEM der Fc-engineerten Antikörper chEBU-141 Fc eng (EC₅₀-Wert: 0,11 nM; max. Zelllyserate: 49,4 ± 5,2 %) und chEBU-141 Duo Fc eng (EC₅₀-Wert: 0,08 nM; max. Zelllyserate: 49,03 ± 5,5 %) bei einer maximal getesteten Konzentrationen von 10 µg/ml (67 bzw. 40 nM) in den Versuchen mit der Daudi-Zelllinie (Tab. 14), so ist festzustellen, dass die Fc-engineerten Antikörpervarianten signifikant höhere Zelllyseraten (Abb. 6A) und 292-fach (chEBU-141 Fc eng vs. chEBU-141) bzw. 35-fach (chEBU-141 Duo Fc eng vs. chEBU-141 Duo) geringere EC₅₀-Werte aufweisen. Auffällig ist, dass die, durch die tetravalente Bindung des chEBU-141 Duo, bereits verbesserte halbmaximale ADCC-Aktivität durch das Fc Protein-engineering nicht weiter verbessert werden konnte als die des bivalenten, Fc-optimierten chEBU-141 Fc eng und sich ebenfalls im picomolaren Bereich befindet (Tab. 14 und Abb. 6A). Insgesamt führt die höhere Affinität zum FcγRIIIa konsekutiv zu einer effektiveren ADCC von Daudi-Lymphomzellen durch die Fc-optimierten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zu den nicht-optimierten Antikörpervarianten.

Mit der Myelom-Zelllinie U266 erzielt sowohl der chEBU-141 Fc eng (max. Zelllyserate: 41,56 ± 0 %) im Vergleich zum chEBU-141 (max. Zelllyserate: 23,65 ± 3,3 %) als auch der chEBU-141 Duo Fc eng (max. Zelllyserate: 43,64 ± 5,9 %) im Vergleich zum chEBU-141 Duo (max. Zelllyserate: 27,61 ± 4,7 %) signifikant höhere mittlere maximale Zelllyseraten ± SEM bei maximal getesteten Konzentrationen von 100 µg/ml bzw. 670 nM (chEBU-141 Fc eng und chEBU-141) und 50 µg/ml bzw. 200 nM (chEBU-141 Duo Fc eng und chEBU-141 Duo) (Abb. 6A). Bei Betrachtung der EC₅₀-Werte ist weiterhin festzustellen, dass der chEBU-141 Fc eng (EC₅₀: 1,85 nM) 58,5-fach und der chEBU-141 Duo Fc eng (EC₅₀: 1,68 nM) 10,4-fach geringere Konzentrationen im Vergleich zu den nicht Fc-engineerten IgG1 chEBU-141 (EC₅₀: 108,2 nM) und chEBU-141 Duo (EC₅₀: 17,54 nM) zum Erreichen des halbmaximalen Effekts benötigen (Tab. 14). Auch hier kann somit festgestellt werden, dass die höhere Affinität zum FcγRIIIa konsekutiv zu einer effektiveren ADCC von U266-Myelomzellen durch die Fc-optimierten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zu den nicht-optimierten Antikörpervarianten führt. Auch die Beobachtung, dass der tetravalente chEBU-141 Duo (EC₅₀: 17,54 nM) geringere Konzentrationen zum Erreichen des halbmaximalen Effekts benötigt als der chEBU-141 (EC₅₀: 108,2 nM) bei vergleichbaren maximalen Zelllyseraten, aber es beim chEBU-141 Duo Fc eng zu keiner weiteren Verbesserung der

halbmaximalen ADCC-Aktivität durch das Fc Protein-Engineering kommt, bestätigt den Trend aus den Analysen mit den Daudi-Lymphomzellen zuvor. Dies unterstützt somit die Vermutung, dass eine Verbesserung der Avidität zum Zielantigen zu einer besseren ADCC-Aktivität des chEBU-141 Antikörpers führt, aber das der Fc Protein-engineerte, bivalent bindende chEBU-141 Fc eng genauso effektiv ist wie der tetravalent bindende chEBU-141 Duo Fc eng.

Um zu überprüfen, ob die CD75s-Antikörper auch effektiv gegen primäre Tumorzellen von Patienten sind, wurden ADCC-Experimente mit MNC gesunder Spender als Effektorzellen und B-CLL-Zellen von Patienten als Zielzellen (94-98 % Tumorzellen in den MNC; Daten aus diagnostischen Messungen vom Entnahmetag), die aus peripheren Blutproben von Non-Hodgkin-Lymphompatienten isoliert worden waren, durchgeführt (Abb. 6B). Sowohl mit den Fc-optimierten als auch den nicht Fc-optimierten chEBU-141-Antikörpern konnten die primären Tumorzellen von vier verschiedenen B-CLL-Patienten lysiert werden, wobei konzentrationsabhängig höhere maximale Zelllyseraten und EC₅₀-Werte durch chEBU-141 Fc eng (EC₅₀: 3,69 nM; max. Zelllyserate: 38,74 ± 3,5 %) und chEBU-141 Duo Fc eng (EC₅₀: 5,04 nM; max. Zelllyserate: 41,18 ± 4 %) im Vergleich zu chEBU-141 (EC₅₀: 18,61 nM; max. Zelllyserate: 17,53 ± 2,7 %) und chEBU-141 Duo (EC₅₀: 31,14 nM; max. Zelllyserate: 14,44 ± 2 %) erreicht werden konnten (Tab. 15). Die Daten aus den Zellkulturexperimenten, die zeigen, dass die Fc-engineerten Varianten Tumorzellen effektiver lysieren, bestätigte sich somit auch für primäre Tumorzellen von Patienten. Allerdings waren die maximalen Lyseraten insgesamt geringer und interessanterweise konnte die effizientere Vermittlung der ADCC durch den tetravalenten chEBU-141 Duo im Vergleich zum bivalent bindenden chEBU-141 mit den Patientenzellen nicht erzielt werden. Durch das Fc Protein-Engineering erreichten aber sowohl der chEBU-141 Fc eng als auch der chEBU-141 Duo Fc eng 5- bzw. 6,2-fach niedrigere EC₅₀-Werte als ihre nicht-optimierten Varianten.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass U266-Myelomzellen, Daudi Burkitt-Lymphomzellen und primäre Lymphomzellen effektiv durch ADCC und die Rekrutierung von NK-Zellen über alle chimären chEBU-141-Antikörper lysiert werden können und das durch das Fc Protein-Engineering eine deutlich verstärkte ADCC-Aktivität der bi- und tetravalent bindenden Varianten erreicht werden konnte.

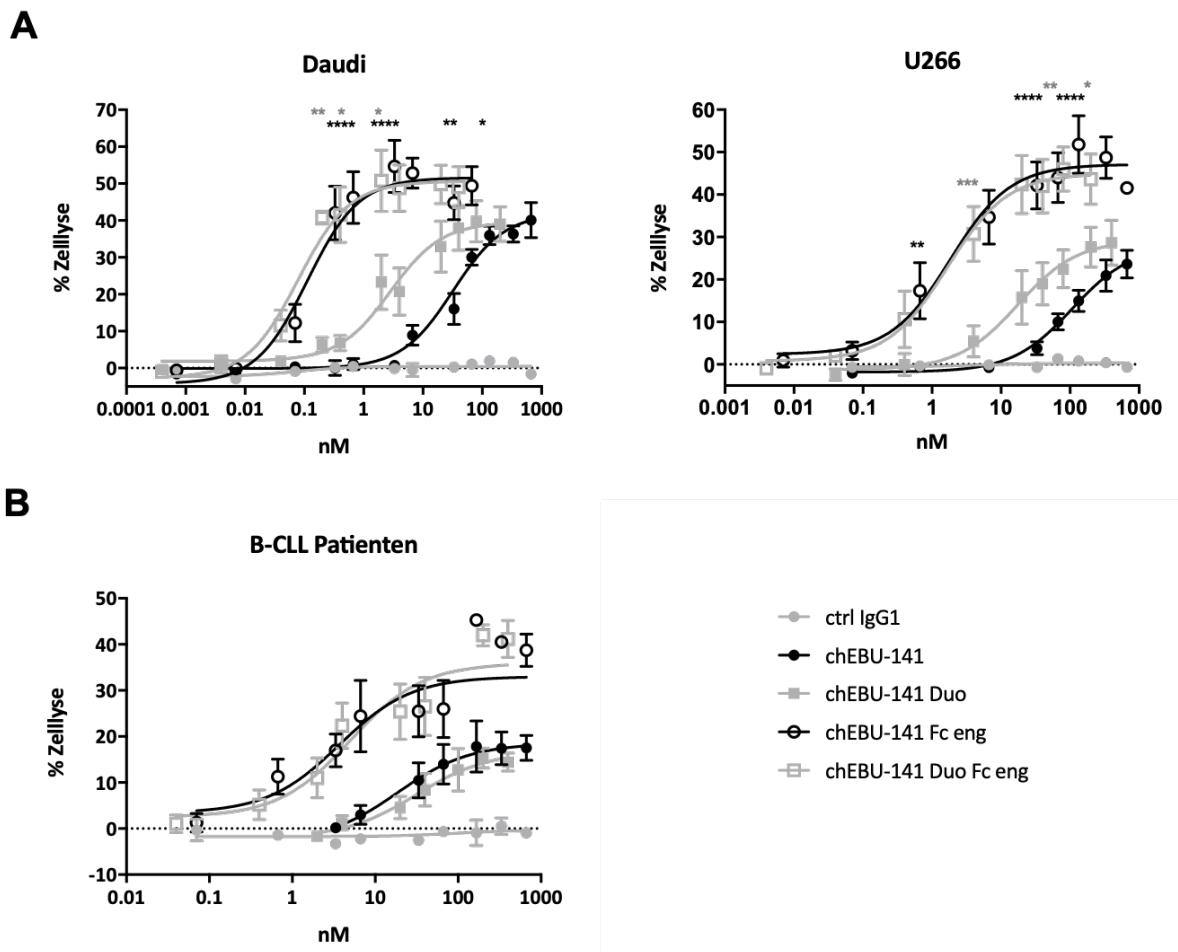


Abb. 6. Untersuchungen zur ADCC-Aktivität der chEBU-141-Antikörpervarianten. Prozentuale Zelllyseraten von (A) Daudi Lymphomzellen (links) und U266 Myelomzellen (rechts) und (B) primären B-CLL-Zellen von vier Patienten nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von chEBU-141 (●), chEBU-141 Duo (-), chEBU-141 Fc eng (○) und chEBU-141 Duo Fc eng (□) bzw. eines Kontrollantikörpers (●; ctrl IgG1) und MNC gesunder Spender (E/T-Ratio von 80:1) in ^{51}Cr -Freisetzungsversuchen. */* = p≤0,05 chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. **/** = p≤0,01 chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. **** = p≤0,0001 chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von jeweils 2 (B-CLL), 3 (Daudi) und 4 (U266) unabhängigen Messungen.

Tab. 14 EC₅₀-Werte und maximale Zelllyseraten mit Daudi- und U266-Tumorzellen

Antikörper	Daudi (EC ₅₀ in nM)	Daudi (max. Zelllyserate ± SEM in %)	U266 (EC ₅₀ in nM)	U266 (max. Zelllyserate ± SEM in %)
chEBU-141	32,12	40,12 ± 4,8 %	108,2	23,65 ± 3,3 %
chEBU-141 Fc eng	0,11	49,4 ± 5,2 %	1,85	41,56 ± 0 %
chEBU-141 Duo	2,82	39,03 ± 4,7 %	17,54	27,61 ± 4,7 %
chEBU-141 Duo Fc eng	0,08	49,03 ± 5,5 %	1,68	43,64 ± 5,9 %

Tab. 15 EC₅₀-Werte und maximale Zelllyseraten mit B-CLL-Patientenproben

Antikörper	EC ₅₀ in nM	max. Zelllyserate ± SEM in %
chEBU-141	18,61	17,53 ± 2,7 %
chEBU-141 Fc eng	3,69	38,74 ± 3,5 %
chEBU-141 Duo	31,14	14,44 ± 2 %
chEBU-141 Duo Fc eng	5,04	41,18 ± 4 %

3.1.5.2 Komplement-abhängige Zytotoxizität

Für den Austausch der Aminosäure Glutamat durch Lysin an Position 345 (E345K) in der CH₃-Domäne von IgG1-Antikörpern ist beschrieben worden, dass die Bildung einer Hexamer-Konfiguration auf der Zelloberfläche nach Antigenbindung von IgG1-Antikörpern die effektivere Rekrutierung von C1q und die Aktivierung der Komplementkaskade sowie konsekutiv die CDC-Aktivität der so Fc-engineerten Antikörpertypen optimiert (43). Um den Einfluss dieser Aminosäuremutation auf die CDC-Aktivität von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng zu untersuchen, wurden ⁵¹Cr-Freisetzungstests mit humanem Serum gesunder Spender als Quelle für Komplementfaktoren durchgeführt. Als Zielzellen dienten erneut Daudi- sowie U266-Zellen. Die Fc-engineerten Varianten chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng zeigen eine maximale Zelllyserate ± SEM bei einer maximal getesteten Konzentration von 100 µg/ml (670 bzw. 400 nM) von 46,15 ± 6,3 % (chEBU-141 Fc eng) bzw. 45,56 ± 2,9 % (chEBU-141 Duo Fc eng) der Daudi-Tumorzellen (Abb. 7A). Die maximale Lyse ± SEM durch die nicht-optimierten chEBU-141 und chEBU-141 Duo liegen bei 17,6 ± 2,2 % (chEBU-141) und 11,77 ± 2 % (chEBU-141 Duo) bei einer maximal getesteten Konzentration von 100 µg/ml (670 bzw. 400 nM). Interessanterweise ist die halbmaximale CDC-Aktivität des Fc-optimierten, tetravalent bindenden chEBU-141 Duo Fc eng (EC₅₀: 399,8 nM) im Vergleich zum Fc-optimierten, bivalent bindenden chEBU-141 Fc eng (EC₅₀: 81,31 nM) schlechter, was einen Unterschied zur vergleichbar guten ADCC-Aktivität beider Antikörpertypen darstellt. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch in den Versuchen mit der U266-Myelomlinie. Hier ist lediglich der chEBU-141 Fc eng noch in der Lage signifikant bessere Zelllyserate von 20,47 ± 3,2 % im Vergleich zum chEBU-141 (max. Zelllyserate: 0,3 ± 0,5 %) bei der maximal getesteten Konzentration von 100 µg/ml (670 nM) zu erzielen. Zwischen dem chEBU-141 Duo Fc eng, der bei der maximal getesteten Konzentration von 100 µg/ml (400 nM) eine Lyserate von 5,17 ± 2,4 % erzielt, und chEBU-141 Duo, der wie der

chEBU-141 und der Kontroll-IgG1-Antikörper keine CDC-Aktivität gegen U266-Zellen besitzt, besteht kein signifikanter Unterschied mehr (Abb. 7A).

Ob die Antikörper auch effektiv CDC von Tumorzellen von Patienten mit autologem Serum vermitteln können, wurde in ^{51}Cr -Freisetzungstests mit B-CLL-Zellen von zwei Non-Hodgkin-Lymphompatienten (96 % und 98 % CD19-positive B-CLL-Zellen in den MNC der Patienten; Angaben aus diagnostischen Messungen vom Versuchstag) aufgrund des limitierten Probenmaterials mit fixen Konzentrationen von 100 µg/ml der nicht-optimierten und Fc-optimierten Antikörper überprüft (Abb. 7B). Der pentamere EBU-141 Maus-IgM-Antikörper, der wie Vorarbeiten gezeigt haben (Doktorarbeit Malena Kristin Buck), sehr effektiv CDC von Tumorzellen induziert, führt auch in diesen Versuchen zu einer potenteren Aktivierung der Komplementkaskade mit einer maximalen Tumorzelllyse von $39,5 \pm 11,8\%$. Zudem vermittelt auch der humane, Fc-engineerte IgG1-Antikörper chEBU-141 Fc eng, der sich auch in den vorigen Versuchen mit den Tumorzelllinien als der effektivste erwiesen hat, CDC von $34,0 \pm 19,2\%$ der B-CLL-Zellen mit dem autologen Plasma der Patienten. Im Gegensatz dazu führt weder der chEBU-141 Duo Fc eng noch der chEBU-141 oder der chEBU-141 Duo zu einer effektiven Aktivierung der Komplementkaskade und zu einer Lyse der B-CLL-Zellen der Patienten (Abb. 7B). Die Potenz der chEBU-141-Antikörper hinsichtlich ihrer CDC-Aktivität gegenüber primären reifen B-Zell-Tumorzellen entspricht der zuvor ermittelten Potenz (chEBU-141 Fc eng > chEBU-141 Duo Fc eng > chEBU-141 = chEBU-141 Duo) gegenüber Daudi-Burkitt-Lymphomzellen und U266-Myelomzellen. Insgesamt lassen sich Myelomzellen und primäre Lymphomzellen deutlich schlechter durch CDC und die chEBU-141-Antikörper lysieren als die Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi, aber insbesondere der Fc-optimierte chEBU-141 Fc eng war gegen alle Tumorzellen sehr effektiv.

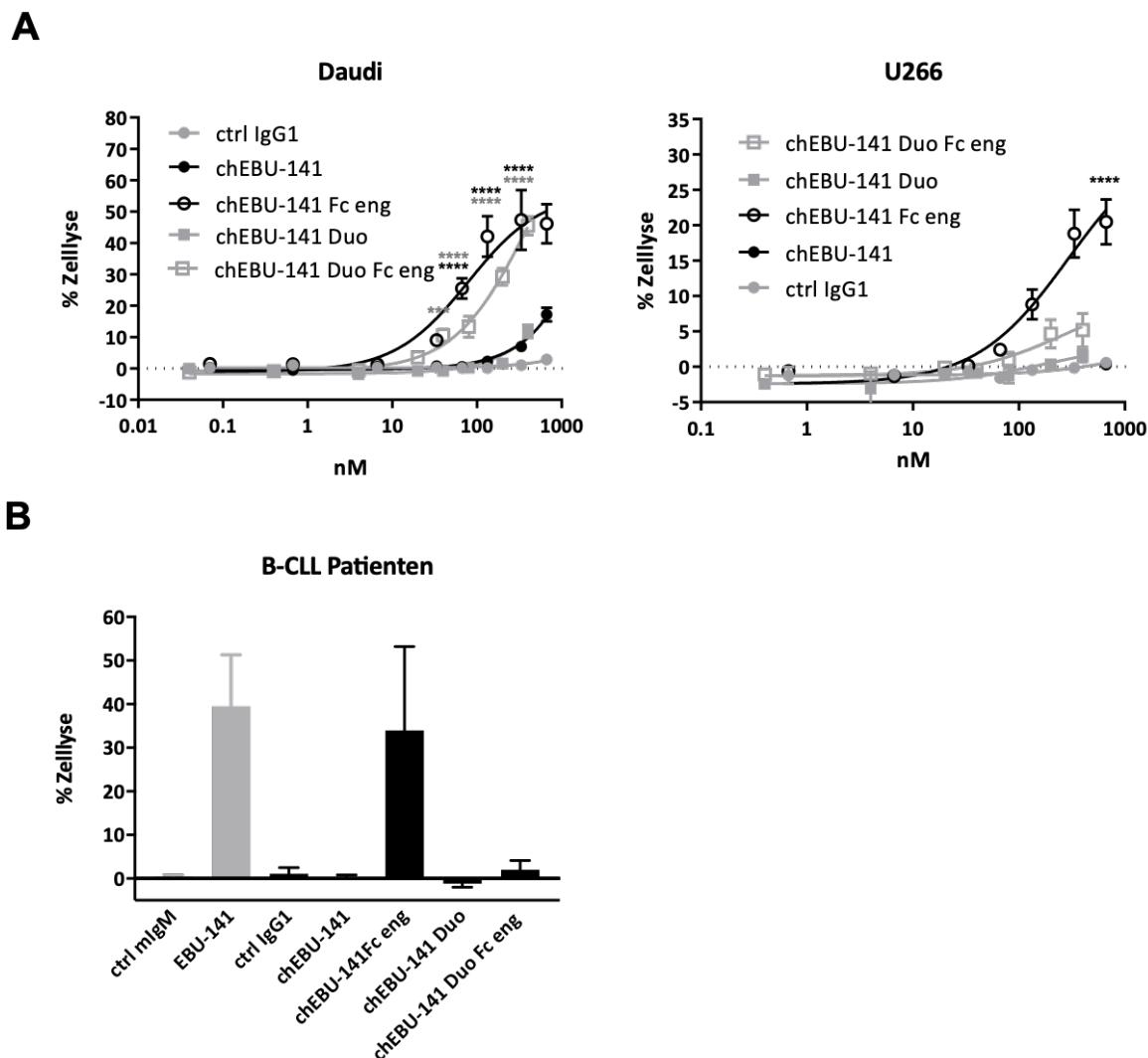


Abb. 7. Untersuchungen zur CDC-Aktivität der chEBU-141-Antikörpervarianten. Prozentuale Zellyseraten von (A) Daudi Lymphomzellen (links) und U266 Myelomzellen (rechts) und (B) Prozentuale Zellyseraten von Komplement in humanem Serum von zwei B-CLL-Patienten nach Inkubation von jeweils 5000 Zellen mit 100 µg/ml IgG1-Isotypkontrolle (ctrl IgG1; schwarz) und muriner IgM-Isotypkontrolle (ctrl mlgM; grau) sowie EBU-141 (grau), chEBU-141, chEBU-141 Duo, chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng (alle schwarz). */* = $p \leq 0,05$ chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. **/** = $p \leq 0,01$ chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. *** = $p \leq 0,001$ chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. ****/**** = $p \leq 0,0001$ chEBU-141 vs. chEBU-141 Fc eng bzw. chEBU-141 Duo vs. chEBU-141 Duo Fc eng. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 (Daudi) und 4 (U266, B-CLL) unabhängigen Messungen.

Die Daten belegen, dass die Aminosäuremutation E345K auch bei den CD75s-bindenden chEBU-141-Antikörpern zu einer effizienteren Bindung von C1q, einer effektiveren Aktivierung der Komplementkaskade und damit zu erhöhter CDC-Aktivität der Fc-engineerten Antikörpervarianten chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zu den nicht-optimierten IgG1-Antikörpern chEBU-141 und chEBU-141 Duo führt. Darüber

hinaus zeigen diese Daten erstmalig, dass die E345K Mutation zusammen mit S239D und I332E in IgG1-Antikörpern sowohl die CDC- als auch die ADCC-Aktivität verstärken kann.

In Tab. 16 sind alle Ergebnisse aus den Bindungsanalysen sowie die Analyse der ADCC und CDC-Aktivität überblickhaft dargestellt.

Tab. 16 Ergebnisse im Überblick

Antikörper	CD75s-Bindung	CD16a-Bindung	ADCC	CDC
chEBU-141			↑	∅
chEBU-141 Fc eng		↑↑	↑↑↑	↑↑↑
chEBU-141 Duo	↑		↑↑	∅
chEBU-141 Duo Fc eng	↑	↑	↑↑↑	↑

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir neue Fc-engineerte chimäre IgG1-Antikörper (chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng) konstruiert, die bi- bzw. tetravalent an CD75s auf der Oberfläche von Tumorzellen binden und, im Vergleich zu den nicht Fc-engineerten IgG1-Antikörpertypen chEBU-141 und chEBU-141 Duo, verbesserte Fc-vermittelte Effektorfunktionen (ADCC und CDC) gegen B-Zell-Lymphomzellen und Tumorzellen des Multiplen Myeloms aufweisen.

Durchflusszytometrische Analysen haben bestätigt, dass sowohl der neu generierte chEBU-141 Fc eng als auch der chEBU-141 Duo Fc eng konzentrationsabhängig CD75s binden, wobei der chEBU-141 Duo Fc eng über eine, im Vergleich zur bivalenten Antikörpertypen, 2-fach bessere Avidität zum Antigen verfügt - also wahrscheinlich tetravalent an CD75s bindet. Anders als die meisten therapeutisch zugelassenen mAk, die sich gegen Proteine als Zielstrukturen auf der Oberfläche maligne entarteter Zellen richten, haben die chEBU-141-Antikörpertypen mit CD75s (α -2,6-sialylierte Lactosamine, vormals CDw75) eine Zuckerstruktur auf der Oberfläche von B-Zell-Neoplasien und Myelomzellen als Zielantigen (50). Nur wenige andere mAk wie z.B. mAb216 gegen N-Acetyllactosamine (z.B. auf B-Zellen und verschiedenen Epithelzellen) haben Zuckerstrukturen als Target (61). CD75s findet sich aber auch auf der Oberfläche von epithelialen Tumoren wie etwa dem des Magen- sowie Prostatakarzinoms und des kolorektalen sowie des hepatzellulären Karzinoms, wodurch auch weitere Indikationen für den Einsatz der chEBU-141-Antikörpertypen denkbar wären (53,54,62,63). Sialylsäurereste, wie α -2,6-sialylierte Lactosamine, finden sich auch auf gesunden Zellen und übernehmen hier eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems. Sialylsäurereste können von *immunglobulin-like lectins* (Siglecs) auf der Oberfläche von Immunzellen (z.B. NK-Zellen) gebunden werden, was zu einer Phosphorylierung von ITIMs dieser Siglecs führt und wiederum immunsuppressive Effekte in den Immunzellen auslöst (64). Entartete Zellen nutzen diesen physiologischen Prozess hingegen, um sich vor der Erkennung durch Immunzellen zu schützen. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte Malignome (z.B. das kolorektale Karzinom) eine gesteigerte Expression und Aktivität von Sialyltransferasen wie ST6Gal1, die α -2,6-Sialylsäurereste an Proteine und Fette knüpft, besitzen (65). Daher wird die Hypersialylation, wie auch andere Veränderungen der Glykosilierung entarteter Zellen, zu den erweiterten *hallmarks of cancer*

gezählt (66,67). Antikörper wie chEBU-141, die solche sialylierten Zuckerstrukturen erkennen, könnten somit über die Blockade der Interaktion zwischen *Siglecs* und sialylierten Zuckerstrukturen oder durch Opsonisierung die Tumorzellen wieder für das Immunsystem sichtbar machen und einen innovativen und vielversprechenden Ansatz für die Antikörpertherapie darstellen.

Da sich murine Antikörper, wie der ursprüngliche EBU-141 Maus-IgM-Antikörper (50), aufgrund von Immunreaktionen gegen das nicht-menschliche Eiweiß, kurzen Halbwertszeiten und potentiell schlechter Gewebepenetration nicht für den Einsatz im Menschen eignen (3), wurde in der Arbeit von Malena Kristin Buck der chimäre IgG1-Antikörper chEBU-141 generiert und charakterisiert. Anschließend wurde in der Arbeitsgruppe eine tetravalente Variante des chEBU-141 namens chEBU-141 Duo hergestellt, um den aufgetretenen Aviditätsverlust für CD75s vom pentameren murinen IgM-Antikörper EBU-141 hin zum bivalenten chEBU-141 etwas auszugleichen. Beide Antikörper sind chimäre IgG1 und besitzen Fc-vermittelte Effektorfunktionen wie ADCC. Um die Fc-vermittelten Effektorfunktionen der chEBU-141-Antikörper weiter zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit Fc-optimierte Antikörper hergestellt und anschließend funktionell charakterisiert. Um die Bindung an den aktivierenden Fc_YRIIIa auf NK-Zellen, die als wichtige Effektorzellpopulation für die Antikörpertherapie gelten (68,69), zu verbessern, wurden gezielt die Mutationen S239D und I332E durch Fc Protein-Engineering in den Fc-Teil von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng integriert. Lazar und Kollegen konnten zeigen, dass diese Mutationen in verschiedenen mAk (z.B. Alemtuzumab) zu einer verbesserten Bindung an den Fc_YRIIIa führen und dadurch effektiver ADCC von Antigen-positiven Tumorzellen vermitteln (37). Die Bindungsanalysen der Fc-optimierten chEBU-141-Antikörper konnten eine verbesserte Fc_YRIIIa-Bindung von chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zu den Wildtyp-IgG1-Antikörpern chEBU-141 und chEBU-141 Duo bestätigen und somit die Funktionalität der Aminosäureaustausche. In der Bevölkerung existieren hoch- und niedrigaffine Allelvarianten des Fc_YRIIIa, die in verschiedenen klinischen Studien mit dem Ansprechen von Patienten auf eine Immuntherapie mit IgG1-Antikörpern korrelieren. So konnte gezeigt werden, dass in Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen die Wirksamkeit von Rituximab mit dem Fc_YRIIIa-Polymorphismus korrelierte (60). Hier zeigten diejenigen Patienten, die eine homozygote Expression der hochaffinen Valin-Variante an Position 158 (158V/V) aufwiesen, ein deutlich besseres Ansprechen als diejenigen mit der

homozygoten niedrigaffinen Phenylalanin-Variante (158F/F). Darüber hinaus wiesen in klinischen Studien mit Patienten, die an einem refraktären Multiplen Myelom litten, diejenigen, die homozygot für die hochaffine Variante des Fc_YRIIIa waren, ebenfalls signifikant bessere Überlebensraten bei der Behandlung mit dem humanisierten IgG1 Elotuzumab auf (70). Die in dieser Arbeit durchgeföhrten Bindungsanalysen, bestätigen insgesamt eine geringere Fc-/Fc_YRIIIa-Interaktion aller chEBU-141-Antikörper mit der niedrigaffinen Phenylalanin-Variante im Vergleich zur hochaffinen Valin-Variante des Fc_YRIIIa. Die schlechtere Bindung des Fc-optimierten chEBU-141 Duo Fc eng im Vergleich zum chEBU-141 Fc eng an beide Fc_YRIIIa-Polymorphismen war nicht zu erwarten und bedarf weiterer Analysen. Die Sequenzierung der Expressionsplasmide ergab keine zusätzlichen Mutationen in den schweren (und auch leichten) Ketten aller chEBU-141-Antikörper. Darüber hinaus zeigten sich bei der biochemischen Charakterisierung keine Verunreinigungen in den Antikörperpräparationen. Auch hatten alle chEBU-141-Antikörper das erwartete Molekulargewicht von 150 kDa im Falle der IgG1-Antikörper chEBU-141 und chEBU-141 Fc eng sowie ein Molekulargewicht von 250 kDa im Falle der um jeweils zwei Fab-Fragmente größeren IgG1-Antikörper chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng.

Die verbesserte Affinität der Fc-engineerten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng zum Fc_YRIIIa führte im Vergleich zu den Wildtyp-Antikörpern chEBU-141 und chEBU-141 Duo zu einer deutlich effektiveren Lyse von CD75s-positiven humanen Lymphom- und Myelomzellen durch die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen, wobei EC₅₀-Werte bis in den picomolaren Bereich erreicht werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Daten von Lazar und Kollegen, die die Wirkung der Aminosäuremutationen S239D und I332E und ihren positiven Effekt auf die ADCC von unterschiedlichen mAk wie dem HER2/neu-Antikörper Trastuzumab, dem CD20-Antikörper Rituximab oder Alemtuzumab gegen CD52 im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-IgG1-Antikörpern gegen Antigen-exprimierende Tumorzellen belegen konnten (37). Es zeigte sich bei diesen Antikörpern eine 100- bis 1000-fach verbesserte Potenz zur Induktion von ADCC, die mit unseren erzielten Resultaten, einer bis zu ca. 290-fachen Verbesserung der ADCC-Potenz der Fc-engineerten chEBU-141-Antikörper im Vergleich zu den Wildtyp-chEBU-141-Antikörpern, vergleichbar ist. Auch eigene Arbeiten konnten zeigen, dass bei dem IgG1-Antikörper CD19-DE die Aminosäuremutationen S239D und I332E zu einer deutlich effektiveren ADCC der kindlichen B-Zell-ALL im Vergleich zum Wildtyp-CD19-Antikörper führte (71). Generell waren die Daudi-

Lymphomzellen sensitiver als die U266-Myelomzellen für ADCC durch die chEBU-141-Antikörper, was möglicherweise darauf hindeuten könnte, dass B-Zell-Neoplasien eine höhere CD75s-Antigendichte auf ihrer Oberfläche haben als Myelomzellen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Bindungsanalysen des chEBU-141 mit U266- und Daudi-Zellen aus der Doktorarbeit von Malena Kristin Buck, in denen sich ein verstärktes durchflusszytometrisches Signal in den Messungen mit den Daudi-Zellen im Vergleich zu den Myelomzellen zeigte. Auch in der initialen Arbeit von Gramatzki und Kollegen wurden alle primären reifen B-Zell-Tumoren, aber nur 7 von 12 Multiplen Myelomen von EBU-141 gebunden (50). Dies bedarf aber noch weiterer Untersuchungen.

Interessanterweise führte die Kombination von Fc-engineering und einer Erhöhung der Avidität für CD75s durch die tetravalente Bindung nicht zu einer weiteren Verbesserung der maximalen und halbmaximalen Tumorzelllyse durch den chEBU-141 Duo Fc eng. Sowohl der chEBU-141 Duo Fc eng als auch der bivalente chEBU-141 Fc eng sind sehr potente Antikörper, die bereits sehr niedrige EC₅₀-Werte aufweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die FcγRIIIa-Bindung und NK-Zellaktivierung bereits bei dem Fc-optimierten, bivalenten chEBU-141 Fc eng-Antikörper so effektiv ist, dass keine weitere Steigerung der Aktivierung und damit Tumorzelllyse mit dem Fc-optimierten, tetravalenten chEBU-141 Fc eng-Antikörper mehr möglich ist. Das die Aktivierung von NK-Zellen über den FcγRIIIa durch therapeutische IgG1-Antikörper an ein oberes Limit stoßen kann, lassen Versuche vermuten, bei denen die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen nur durch die Kombination eines IgG1-Antikörpers mit einem Immunliganden gegen einen weiteren aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen erhöht werden konnte, nicht aber durch die Kombination von zwei IgG1-Antikörpern oder einem Immunliganden, der denselben Signalweg wie der FcγRIIIa aktiviert (72). Dies bedarf allerdings weiterer Analysen.

Häufig kommt es im Rahmen der Erstlinientherapien von Malignomen zur Ausbildung von Resistenzmechanismen und konsekutiv zur Therapierefrakterität. Ein möglicher Mechanismus, der für die Resistenz gegenüber CD20-Antikörpern verantwortlich gemacht wird, ist bspw. die Tropozytose, hierbei kommt es zum Verlust von CD20 auf der Oberfläche von B-Zell-Neoplasien und infolge dessen zum Wirkverlust von Rituximab oder Obinutuzumab (73). Auch für mit Daratumumab behandelte Myelompatienten ist der Verlust von CD38 beschrieben (74). Hier könnten unsere neuen CD75s-Antikörper eine mögliche Therapiealternative darstellen. Praktische Studien zu Rituximab, Daratumumab und

Elotuzumab zeigen eine potente ADCC-Aktivität all dieser IgG1-Antikörper gegen verschiedene Lymphom- und Myelomzelllinien (75-77). Mit Obinutuzumab ist bereits ein Fc Glyco-optimierter Antikörper für die Therapie der B-CLL klinisch im Einsatz, der in präklinischen Studien sehr effektiv zu einer B-Zell-Depletion führte (78). Bislang ist aber kein Protein Fc-optimierter IgG1-Antikörper für die Behandlung dieser Erkrankungen zugelassen, sodass insbesondere chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng eine Erweiterung des Therapieansatzes darstellen könnten.

Unseres Wissens nach erstmalig wurden die Mutationen S239D und I332E mit der Aminosäuremutation E345K in die CH₃-Domäne unserer Fc-engineerten chEBU-141-Antikörper kombiniert, um gleichzeitig, wie von de Jong und Kollegen gezeigt, eine hexamere Konfiguration von IgG1-Antikörpern nach Antigenbindung auf der Tumorzelloberfläche und eine daraus resultierende effektivere Bindung von C1q sowie potentere Lyse von Tumorzellen durch CDC zu induzieren (43). Dies sollte den Verlust der CDC-Aktivität, der durch die Chimärisierung des murinen EBU-141 aufgetreten war (Doktorarbeit Malena Kristin Buck), kompensieren. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die Fc-engineerten mAk chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng deutlich effektiver und z.T. hochsignifikant CDC der CD75s-positiven Lymphom- und Myelom-Zelllinien induzieren als die Wildtyp-chEBU-141-Antikörper. Insbesondere der bivalent bindende, Fc-optimierte Antikörper chEBU-141 Fc eng induziert effizient Komplement-vermittelte Lyse von Lymphom- und Myelomzellen, wobei sogar Tumorzellen von zwei B-CLL-Patienten durch chEBU-141 Fc eng mit autologem Plasma über CDC lysiert werden konnten. Die geringere bzw. fehlende CDC-Aktivität des chEBU-141 Duo und chEBU-141 Duo Fc eng könnte unserer Annahme nach darauf beruhen, dass die zusätzlichen zwei Fab-Regionen zu einer sterisch bedingten erschwerten Anlagerung von C1q führen bzw. eine größere Distanz zur Zelloberfläche entsteht, die die Bildung des Membranangriffskomplexes am Ende der Komplementkaskade behindern könnte. Die tendenziell effektivere Lyse der Lymphom- im Vergleich zu den Myelom-Zellen könnte durch die unterschiedliche Expression komplementinhibitorischer Proteine wie z.B. CD55 oder CD59 erklärt werden, die die CDC von verschiedenen Tumorentitäten durch mAk beeinflussen (79). Ob ein mAk CDC induziert, hängt zudem von dem Antigen-Epitop ab. So sind z.B. Typ I CD20-Antikörper wie Rituximab in der Lage, CDC von CD20-positiven Lymphomzellen zu induzieren (80), wohingegen Typ II CD20-Antikörper (z.B. Obinutuzumab), die ein anderes Epitop von CD20 binden, nur eine

geringe Potenz in der Induktion von CDC aufweisen (81). Dass CDC eine relevante Bedeutung für die Wirksamkeit mAk hat, konnte eindrucksvoll in Mausmodellen gezeigt werden, in denen es zu einem Verlust der therapeutischen Wirksamkeit von Rituximab durch C1q-Knockout kam (82). Darüber hinaus wurde in Patienten ein rascher Verbrauch von Komplement während einer Rituximab-Infusion sowie ein Anstieg von dessen therapeutischer Wirksamkeit bei einer Applikation von Plasma mit darin enthaltenen Komplementfaktoren beobachtet (83,84). Allerdings stellen die Daten aus Tiermodellen anderer Arbeitsgruppen z.T. auch die Relevanz von Komplement für die Wirksamkeit von CD20-Antikörpern in Frage (85) und prinzipiell bleibt der Stellenwert Komplement-vermittelter Effekte für den Erfolg einer Antikörpertherapie im Patienten ein Gegenstand aktueller Forschung. Dennoch könnte CDC ein relevanter Mechanismus für therapeutische mAk sein und seine Optimierung – zusätzlich zur Erhöhung der ADCC-Aktivität – daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit von mAk darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD75s-gerichteten chEBU-141-Antikörper und insbesondere ihre Fc-enigeerten Varianten potente neue Antikörper gegen eine Zuckerstruktur auf reifen B-Zell-Neoplasien darstellen, die eine vielversprechende Erweiterung des aktuellen Therapiespektrums zur Behandlung von B-Zell-Neoplasien und Myelomen darstellen könnten.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Fc-vermittelten Effektorfunktionen ADCC und CDC der mAk chEBU-141 und chEBU-141 Duo gegen CD75s auf der Oberfläche von reifen B-Zell-Neoplasien sowie des Multiplen Myeloms mittels Fc Protein-Engineering zu verbessern. Hierfür wurden bislang erstmals die Aminosäuremutationen S239D, I332E und E345K zusammen in die C_H2-/C_H3-Domäne der IgG1-Antikörper integriert. Die in dieser Arbeit hergestellten Fc-optimierten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng binden CD75s auf Lymphom- sowie Myelom-Zelllinien, wobei die Avidität zum Zielantigen CD75s von chEBU-141 Duo Fc eng, aufgrund der tetravalenten Konstruktion, um das 2-Fache höher ist als die des bivalenten Antikörpers chEBU-141 Fc eng. Wie beabsichtigt, konnte durch die Punktmutationen S239D und I332E eine verbesserte Affinität der Fc-engineerten mAk im Vergleich zu den Wildtyp-IgG1-Antikörpern chEBU-141 und chEBU-141 Duo für den aktivierenden FcγRIIIa erreicht werden, durch die eine deutlich verbesserte ADCC der Fc-optimierten Antikörper von Lymphom- sowie Myelom-Zellen durch NK-Zellen erzielt wurde. Die Punktmutation E345K resultierte in einer gleichzeitigen Verbesserung der CDC-Aktivität der Fc-optimierten Antikörper chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng gegenüber CD75s-positiven Lymphom- und Myelom-Zelllinien. Zudem konnte auch eine potente Vermittlung von ADCC und CDC insbesondere des Fc-engineerten chEBU-141 Fc eng gegenüber primären B-CLL-Zellen von Patienten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass mittels Fc Protein-Engineering eine gleichzeitige Verbesserung der CDC sowie auch eine Optimierung der ADCC-Aktivität von IgG1-Antikörpern gegen eine Zuckerstruktur möglich ist, was einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit von mAk für die Tumorthерапie darstellen könnte. Die Fc-optimierten mAk chEBU-141 Fc eng und chEBU-141 Duo Fc eng, deren Zielantigen CD75s eine Zuckerstruktur auf verschiedenen Tumorentitäten ist, könnten zukünftig einen vielversprechenden Beitrag zur Verbesserung der Behandlung von B-Zell-Neoplasien und dem Multiplen Myelom, aber eventuell auch solider Tumoren leisten.

6 Literaturverzeichnis

1. Ehrlich, P. Collected studies on immunity. 1906.
2. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-497.
3. Newsome BW, Ernstoff MS. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(1):6-19.
4. LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, et al. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(11):4220-4224.
5. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):715-725.
6. Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, et al. Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):85-99.
7. A, Molina. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med*. 2008;59:237-250.
8. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005;23(9):1147-1157.
9. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *MAbs*. 2020;12(1):1703531.
10. Zolot RS, Basu S, Million RP. Antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(4):259-260.
11. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2453-2463.
12. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-1791.
13. DM, Pardoll. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264.
14. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723.
15. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(9):836-847.
16. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359(6382):1361-1365.
17. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448.
18. Bouchkouj N, Kasamon YL, de Claro RA, et al. FDA Approval Summary: Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(6):1702-1708.
19. Ludwig DL, Pereira DS, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P. Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):9097-9106.
20. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91(5):1644-1652.
21. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-1417.
22. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*. 1995;1(11):1311-1318.
23. Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med*. 1987;166(5):1351-1361.
24. Wang SY, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(6):759-768.
25. Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS. The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*. 1995;86(2):319-324.

26. **Ghetie V, Ward ES.** Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:739-766.
27. **Nimmerjahn F, Ravetch JV.** Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):34-47.
28. **Billadeau DD, Leibson PJ.** ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest.* 2002;109(2):161-168.
29. **Hayes JM, Wormald MR, Rudd PM, Davey GP.** Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J Inflamm Res.* 2016;9:209-219.
30. **Treffers LW, van Houdt M, Bruggeman CW, et al.** Fc γ RIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. *Front Immunol.* 2019;9:3124.
31. **de Haij S, Jansen JH, Boross P, et al.** In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res.* 2010;70(8):3209-3217.
32. **Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV.** Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(2):652-656.
33. **Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV.** Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6(4):443-446.
34. **Nimmerjahn F, Ravetch JV.** Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 2005;310(5753):1510-1512.
35. **Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, Klausz K, Peipp M.** Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother.* 2017;44(5):327-336.
36. **Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al.** High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6591-6604.
37. **Lazar GA, Dang W, Karki S, et al.** Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(11):4005-4010.
38. **Kellner C, Zhukovsky EA, Pötzke A, et al.** The Fc-engineered CD19 antibody MOR208 (XmAb5574) induces natural killer cell-mediated lysis of acute lymphoblastic leukemia cells from pediatric and adult patients. *Leukemia.* 2013;27(7):1595-1598.
39. **Horton HM, Bennett MJ, Pong E, et al.** Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res.* 2008;68(19):8049-8057.
40. **Zalevsky J, Leung IW, Karki S, et al.** The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fc gamma receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood.* 2009;113(16):3735-3743.
41. **Jurczak W, Zinzani PL, Gaidano G, et al.** Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2018;29(5):1266-1272.
42. **Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, et al.** Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol.* 2001;166(4):2571-2575.
43. **de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, et al.** A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biol.* 2016;14(1):e1002344.
44. **Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T.** IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
45. **Ferrara C, Grau S, Jäger C, et al.** Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc gamma RIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(31):12669-12674.
46. **Shields RL, Lai J, Keck R, et al.** Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 2002;277(30):26733-26740.
47. **Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD.** Fc-Galactosylation of Human Immunoglobulin Gamma Isotypes Improves C1q Binding and Enhances Complement-Dependent Cytotoxicity. *Front Immunol.* 2017;8:646.
48. **Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G.** A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. *Adv Ther.* 2017;34(2):324-356.

49. Ollila TA, Sahin I, Olszewski AJ. Mogamulizumab: a new tool for management of cutaneous T-cell lymphoma. *Onco Targets Ther.* 2019;12:1085-1094.
50. Gramatzki M, Burger R, Kraus J, et al. 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.* 1991;63(1):20-26.
51. Keppler OT, Moldenhauer G, Oppenländer M, et al. Human Golgi beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase generates a group of sialylated B lymphocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol.* 1992;22(11):2777-2781.
52. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 2001;83(8):727-737.
53. Shen L, Li HX, Luo HS, et al. CDw75 is a significant histopathological marker for gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(11):1682-1685.
54. Liu AY, Roudier MP, True LD. Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1543-1556.
55. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:16096.
56. Rai KR, Jain P. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol.* 2016 Mar;91(3):330-40.
57. Glorius P, Baerenwaldt A, Kellner C, et al. The novel tribody [(CD20)(2)xCd16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. *Leukemia.* 2013;27(1):190-201.
58. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
59. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991;3(7):207-212.
60. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic Activity of Humanized anti-CD20 Monoclonal Antibody and Polymorphism in IgG Fc Receptor FcgammaRIIIa Gene. *Blood.* 2002;99(3):754-758.
61. Liedtke M, Twist CJ, Medeiros BC, et al. Phase I trial of a novel human monoclonal antibody mAb216 in patients with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2012;97(1):30-37.
62. Costa-Nogueira C, Villar-Portela S, Cuevas E, Gil-Martín E, Fernández-Briera A. Synthesis and expression of CDw75 antigen in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:431.
63. Souady J, Hülsewig M, Distler U, et al. Differences in CD75s- and iso-CD75s-ganglioside content and altered mRNA expression of sialyltransferases ST6GAL1 and ST3GAL6 in human hepatocellular carcinomas and nontumoral liver tissues. *Glycobiology.* 2011;21(5):584-594.
64. Büll C, Heise T, Adema GJ, Boltje TJ. Sialic Acid Mimetics to Target the Sialic Acid-Siglec Axis. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(6):519-531.
65. Gessner P, Riedl S, Quentmaier A, Kemmner W. Enhanced activity of CMP-NeuAc:Galβ1-4GlcNAc:α2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett.* 1993;75(3):143-149.
66. Büll C, den Brok MH, Adema GJ. Sweet escape: sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(1):238-246.
67. Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(23):35478-35489.
68. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med.* 2019;7(5):105.
69. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc γ RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood.* 2007;110(7):2561-2564.
70. Jakubowiak A, Offidani M, Pégourie B, et al. Randomized phase 2 study: elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood.* 2016;127(23):2833-2840.
71. Schewe DM, Alsadeq A, Sattler C, et al. An Fc-engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood.* 2017;130(13):1543-1552.

72. **Peipp M, Derer S, Lohse S, et al.** HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*. 2015;6(31):32075-32088.
73. **Skopelja-Gardner S, Jones JD, Hamilton BJ, Danilov AV, Rigby WFC.** Role for ZAP-70 Signaling in the Differential Effector Functions of Rituximab and Obinutuzumab (GA101) in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *J Immunol*. 2017;199(4):1275-1282.
74. **Nijhof IS, Casneuf T, van Velzen J, et al.** CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*. 2016;128(7):959-970.
75. **Manches O, Lui G, Chaperot L, et al.** In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101(3):949-954.
76. **Tai YT, Dillon M, Song W, et al.** Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood*. 2008;112(4):1329-1337.
77. **de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, et al.** Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*. 2011;186(3):1840-1848.
78. **Mössner E, Brünker P, Moser S, et al.** Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-4402.
79. **Wang Y, Yang YJ, Wang Z, et al.** CD55 and CD59 expression protects HER2-overexpressing breast cancer cells from trastuzumab-induced complement-dependent cytotoxicity. *Oncol Lett*. 2017;14(3):2961-2969.
80. **Pawluczkowycz AW, Beurskens FJ, Beum PV, et al.** Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol*. 2009;183(1):749-758.
81. **Klein C, Lammens A, Schäfer W, et al.** Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs*. 2013;5(1):22-33.
82. **Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al.** Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003;171(3):1581-1587.
83. **Klepfish A, Schattner A, Ghoti H, Rachmilewitz EA.** Addition of fresh frozen plasma as a source of complement to rituximab in advanced chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):361-362.
84. **Xu W, Miao KR, Zhu DX, et al.** Enhancing the action of rituximab by adding fresh frozen plasma for the treatment of fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2011;128(9):2192-2201.
85. **Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, et al.** The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*. 2004;199(12):1659-1669.

7 Anhang

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



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 0431 / 597-1609
Telefax 0431 / 597-5333
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 anzugeben 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. Pt. M. Mündörn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Alexandra Pries
Geschäftsstelle der Ethik-Kommission

8 Publikationen/zitierfähige Abstracts

Klausz, K., Karimzadeh-Tabrizi, A., Buck, M., Krohn, S., Otte, A., Kellner, C., Croci, G. A., Klapper, W., Peipp, M., Gramatzki, M. (2018). Der tetravalente Antikörper „chEBU-141 Tetra-IgG“ bindet das tumorassoziierte Glyko-Antigen CD75s und vermittelt Zytotoxizität gegen reife B-Zell-Tumoren.

Poster auf der *Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO)* in Wien (28.09.2018-02.10.2018)

Klausz, K., Karimzadeh-Tabrizi, A., Buck, M., Krohn, S., Otte, A., Kellner, C., Croci, G. A., 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 (ASH)* in San Diego, USA (01.-04.12.2018)

Klausz, K., Karimzadeh-Tabrizi, A., Buck, M., Krohn, S., Otte, A., Kellner, C., Croci, G. A., 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, Amir Karimzadeh, 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.

Hamburg,

Amir Karimzadeh

10 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Peipp für die Überlassung der Fragestellung sowie die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Gramatzki für die Möglichkeit der Mitarbeit am Klinikum für Innere Medizin II des UKSH Kiel in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie.

In besonderer Weise gilt mein Dank Frau Dr. Katja Klausz für die immer strukturierte Betreuung bei der Erarbeitung der Fragestellung und der sorgfältigen Durchsicht meiner Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Kathrin Richter, die durch Ihre professionelle Anleitung und immerwährende Hilfestellung in der Laborarbeit, einen wesentlichen Beitrag zur Fertigstellung dieser Dissertation geleistet hat.

Meiner Familie danke ich für Ihre Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt.