

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

## **Optimierung monoklonaler Antikörper am Beispiel von Rituximab**

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

Vorgelegt von  
**Tim Hendrik Wirt**  
aus Hamburg

Kiel 2021

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Denis Schewe, Klinik für Kinder und Jugendmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.06.2022

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Therapeutische Antikörper in der Behandlung maligner Erkrankungen .....	1
1.2	Effektormechanismen therapeutischer Antikörper .....	5
1.3	Fc-optimierte Antikörper .....	8
1.4	Effektormechanismen von CD20-Antikörpern .....	10
1.5	Ziel der Arbeit .....	12
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Materialien .....	14
2.1.1	Zelllinien .....	14
2.1.2	Monoklonale Antikörper .....	15
2.1.3	Chemikalien .....	15
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	16
2.2	Methoden .....	18
2.2.1	Transiente Antikörper-Expression in Lenti-X Zellen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion .....	18
2.2.2	Stabile Expression der Antikörper in CHO/Lec13 nach Transfektion mit Lipofectamin .....	19
2.2.3	Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie .....	20
2.2.4	Massenabschätzung der Proteine .....	20
2.2.5	Gelelektrophorese .....	21
2.2.6	Coomassie-Färbung von Proteingelen .....	21
2.2.7	Western Transfer .....	21

2.2.8	Lectin-Blot .....	22
2.2.9	Durchflusszytometrische Methoden .....	22
2.2.10	Isolation der Effektorzellen aus Vollblut und Präparation von Plasma .....	23
2.2.11	Analyse der Zytotoxizität im 51 Chrom-Freisetzungsexperiment.....	23
2.2.12	Statistische und grafische Auswertung .....	24
3	Ergebnisse .....	25
3.1	Herstellung der optimierten Antikörper .....	25
3.2	Herstellung einer doppelt-Fc-optimierten Variante des Antikörpers Rituximab .....	28
3.3	Analyse der Bindung an CD20-positive Zielzellen .....	31
3.4	Analyse der CDC-Aktivität.....	33
3.5	Lyse durch ADCC .....	39
4	Diskussion .....	44
4.1	Optimierung monoklonaler Antikörper durch Fc-Engineering .....	44
4.2	Die Rolle der ADCC und der CDC in der Antikörpertherapie .....	44
4.3	Parallele Optimierung der ADCC und CDC .....	47
4.4	Andere CD20-Antikörper.....	49
5	Zusammenfassung .....	52
6	Literaturverzeichnis.....	53
7	Anhang.....	60
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	60
7.2	Tabellenverzeichnis.....	61
7.3	Danksagung.....	62
7.4	Publikationen .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

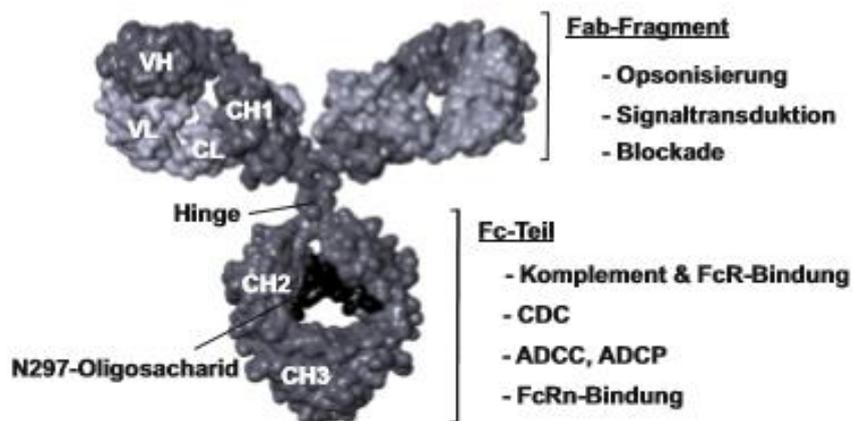
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, <i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	antikörperabhängige zelluläre Phagozytose, <i>antibody dependent cellular phagocytosis</i>
BiTE	<i>bispecific T cell engager</i>
BR	<i>basal release</i>
BsAbs	bispezifische Antikörper
CAR	chimärer Antigen-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
CH	konstante Region der schweren Kette
CL	konstante Region der leichten Kette
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FcR	Fc-Rezeptor

FcyR	Fc-Gamma-Rezeptor
Fuc	Fucose
Ig	Immunglobulin
MCL	Mantelzell-Lymphom
mCRP	membrangebundene komplementregulierende Proteine
MNC	mononuclear cells, mononukleäre Zellen
MR	maximal mögliche Rate, <i>maximum release</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PCD	programmierter Zelltod, <i>programmed cell death</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>rounds per minute</i>
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, <i>standard error of the mean</i>
VL	variable Region der leichten Kette
VH	variable Region der schweren Kette
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Therapeutische Antikörper in der Behandlung maligner Erkrankungen

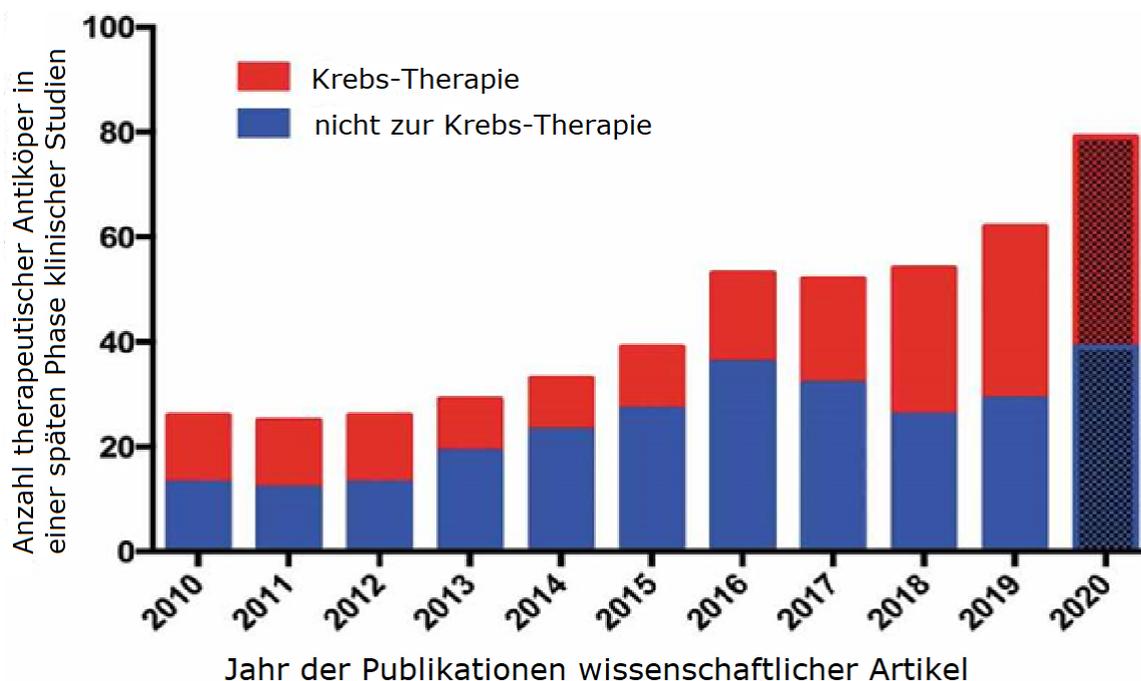
Therapeutischen Antikörpern ist in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle als Behandlungsoption in der Tumorthherapie zugekommen (1-3). Aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Gliederung in unterschiedliche Domänen können therapeutische Antikörper vielfältige Effektorfunktionen vermitteln und Tumorzellen auf unterschiedliche Art und Weise beseitigen (Abb. 1)(4).



**Abbildung 1. Aufbau und Funktionen therapeutischer IgG1-Antikörper.** Das Modell zeigt einen IgG1-Antikörper mit seinen verschiedenen Domänen. Rechts sind die Fab- und Fc-vermittelten Funktionen zusammengefasst. Der Antikörper besteht aus zwei gleichen schweren Ketten (CH mit Teil 1, 2 und 3) und zwei leichten Ketten (CL). Am N-Terminus des Fab-Fragments befindet sich eine variable Region aus einer variablen schweren Kette (VH) und einer variablen leichten Kette (VL). In der Hinge-Region (Gelenkregion) sind die Teile der schweren Ketten CH2 und CH1 mit Disulfidbrücken kovalent verbunden. N297-Oligosaccharid (Asparagin 297) stellt die Bindestelle für die Zuckerkette dar. Aus Kellner 2017, mit freundlicher Genehmigung des Verlags S. Karger.

So können sie durch Stimulierung von Antigenfunktionen, durch die Blockade von Rezeptor-Liganden-Interaktionen oder durch Aktivierung des Immunsystems wirken. Antikörper können auch als Vehikel eingesetzt werden, um in Form von Immunkonjugaten einen gezielten Transport

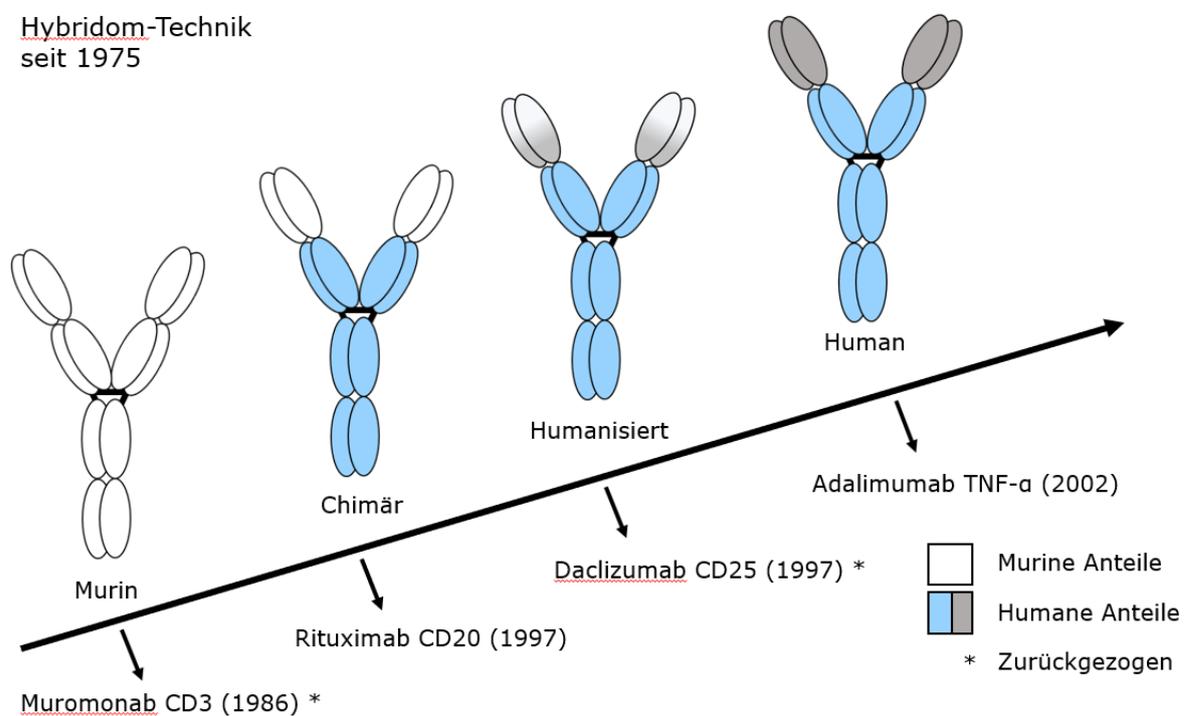
zytotoxischer Stoffe zu den Zielzellen zu ermöglichen. Der erste Antikörper, der zur Behandlung hämatoonkologischer Krankheiten zugelassen wurde, war im Jahr 1997 der CD20-Antikörper Rituximab. Aufgrund der breiten Einsatzmöglichkeiten und der nebenwirkungsarmen Wirkmechanismen der Antikörpertherapie werden Jahr für Jahr mehr Antikörper entwickelt (Abb. 2)(5). Das gilt sowohl für die Tumorthherapie als auch für weitere Erkrankungen, Entwicklungen für die Tumorthherapie nehmen davon einen großen Teil ein.



**Abbildung 2. Zunehmende Bedeutung therapeutischer Antikörper in klinischen Studien von 2010 bis 2020.** Die Auszählung wissenschaftlicher Publikationen zeigt, wie viele neu entwickelte therapeutische Antikörper sich in den letzten zehn Jahren in einer späten Phase klinischer Studien befunden haben. Dabei wird differenziert zwischen Antikörpern, die für die Krebstherapie entwickelt wurden (rot), und Antikörpern, die für alle anderen Therapien außer zur Tumorthherapie bestimmt sind (blau). Aus Kaplon et al. 2019.

Ein wichtiger Schritt zur Herstellung therapeutischer Antikörper war die Entwicklung der Hybridomtechnologie im Jahre 1975, mit der murine Antikörper mit genau definierter Zielspezifität, hoher Reinheit und mit reproduzierbarer Qualität hergestellt werden können (6). Murine Antikörper waren jedoch immunogen im Menschen und vermittelten oft nur unzureichende therapeutische Effekte, vermutlich deshalb, weil sie schwach mit Komponenten des humanen Immunsystems interagieren. Die Limitationen durch diese Immunisierungseffekte konnten überwunden werden, indem man Verfahren fand, mit denen chimäre, humanisierte und schließlich humane Antikörper hergestellt werden können (7, 8). Bei diesen Verfahren wurden die konstanten Regionen muriner Antikörper durch die entsprechenden humanen konstanten Regionen ersetzt, es wurde also ein chimärer Antikörper hergestellt (9, 10), bei dem die Immunogenität im Menschen entsprechend reduziert ist. Der erste für den Einsatz in der Tumorthherapie zugelassene Antikörper dieser Art war Rituximab (Abb. 3). Er ist beispielsweise zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms Mittel der Wahl (11). Um die Immunogenität von Antikörpern noch weiter zu senken, wurden in den variablen Regionen die murinen Gerüstregionen gegen die entsprechenden humanen ausgetauscht, sodass in den resultierenden humanisierten Antikörpern nur noch die hypervariablen Regionen (*complementarity determining regions*, CDR) murinen Ursprungs übrig blieben (12, 13). Inzwischen können durch verschiedene Techniken humane Antikörper hergestellt werden. Dafür werden transgene Tiere immunisiert, deren B-Zellen Gen-Loci von humanen Immunglobulinen tragen (14-17). Phagen-Display ist eine weitere neue Technik, bei der neue Antikörper ohne vorherige Immunisierung von Tieren komplett *in vitro* hergestellt werden können (18). Bei dieser Technik können z.B. beliebige DNA-Sequenzen in ein Phagen-genom integriert werden, dadurch werden dann komplette Proteine oder Antikörperfragmente, die in der DNA-Sequenz codiert sind, auf deren Oberfläche präsentiert und binden an bestimmte Moleküle. Durch Antikörper-Phagen-Display können vergleichsweise kostengünstig große Bibliotheken an Antikörpern für bestimmte Antigene entstehen, die dann

auf ihre Affinität zu dem Antigen getestet und isoliert werden können, ein sogenanntes *Biopanning*. So erreicht man, dass schnell eine hoch spezifische und hoch effektive Variante eines Antikörpers entwickelt werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass auch Antikörper für nicht immunogene Ziele entwickelt werden können (19). Es gibt bereits einige Antikörper, die durch die Phagen-Display-Technik hergestellt und für eine Therapie zugelassen wurden, wie zum Beispiel Adalimumab, Belimumab und Ranibizumab (20).



**Abbildung 3. Entwicklung therapeutischer Antikörper.** Vier Beispiele, die zwischen 1986 und 2002 eine Zulassung erhielten, zeigen, wie sich seit der Entwicklung der Hybridomtechnologie der murine Anteil (weiß) in therapeutischen Antikörpern immer mehr zugunsten des humanen Anteils (blau und grau) verringert hat. Abgewandelt nach Kellner und Peipp 2013.

## 1.2 Effektormechanismen therapeutischer Antikörper

Antikörper können über direkte oder indirekte Fc-vermittelte Effektormechanismen wirken. Als direkt werden Effekte an den Tumorzellen bezeichnet, die durch die Bindung des Fab-Fragments des Antikörpers ausgelöst werden. Dazu gehören Rezeptorblockaden und Apoptose. Fc-vermittelte Effekte entstehen zum Beispiel durch die Aktivierung von weiteren Effektorzellen, indem sie für die Tumorbekämpfung rekrutiert werden, und Kaskaden, die durch die Antikörper ausgelöst werden. Zu indirekten Effekten kommt es aufgrund einer ganzen Reihe verschiedener Mechanismen, durch die monoklonale Antikörper gegen ihre Zielzellen wirken können. Eine Option ist die Aktivierung des Komplementsystems und damit der Einleitung der komplementabhängigen Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Hierbei wird eine Kaskade ausgelöst, bei der Bestandteile im Blutplasma zytotoxisch gegen die Zielzellen wirken. Eine weitere indirekte Wirkmöglichkeit besteht darin, Effektorzellen zu rekrutieren, entweder für sogenannte antikörperabhängige Zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) oder durch antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (*antibody-dependent phagocytosis*, ADCP), indem Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) aktiviert werden. Die Effektorfunktionen von Antikörpern variieren in Abhängigkeit von Zielantigenen, Epitopen und Isotypen (2, 21).

Monoklonale therapeutische Antikörper können, wie oben dargestellt, auf sehr vielfältige Weise einen pharmazeutischen Effekt erfüllen. Es ergibt sich daraus eine Reihe von unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten in der Tumorheilkunde. Zum einen können Antikörper, zum Beispiel Vaskularisationshemmer wie Bevacizumab (anti-VEGF), gelöste Antigene binden und verhindern so die Kommunikation mit deren Rezeptoren, sie unterbinden also die Vaskularisierung der Tumorzellen (22). Zum anderen gibt es auch tumorgerichtete Antikörper wie zum Beispiel Cetuximab und Panitumumab (anti-EGFR), die die Bindung mit den passenden Liganden blockieren (23, 24). Des Weiteren gibt es sogenannte Immun-Checkpoint-

Inhibitoren. Diese Antikörper können zum Beispiel an spezielle inhibierend wirkende Liganden von bestimmten auf Tumorzellen exprimierten Liganden wie PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) oder auf T-Zellen exprimierten inhibitorischen Rezeptoren wie zum Beispiel CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) binden. PD-L1 und CTLA4 regulieren die T-Zell-Antwort herunter. Durch die Bindung der Antikörper wird also verhindert, dass T-Zellen durch die Liganden deaktiviert werden, und es wird eine Stärkung der endogenen Tumorabwehr erreicht (25). Der erste zugelassene Antikörper dieser Art, Ipilimumab, ist gegen CTLA4 gerichtet und wird seit 2011 in der Therapie von Melanomen eingesetzt. Atezolizumab war der erste Immun-Checkpoint-Inhibitor, der für die Behandlung von metastasierenden nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) sowie des Urothelkarzinoms zugelassen wurde. Atezolizumab bindet als *anti-programmed death-ligand 1* an den Liganden PD-L1 (26-28).

Die meisten zurzeit zugelassenen Antikörper in der Tumorthherapie sind wie das 1997 zugelassene Rituximab IgG-Antikörper. Inzwischen gibt es weiterentwickelte Antikörper und neue Konstrukte, um die Effektivität zu verbessern. Es handelt sich unter anderem um Immunkonjugate und bispezifische Antikörper.

Mit Immunkonjugaten wurde eine attraktive Strategie weiterentwickelt, die bereits Paul Ehrlich 1913 mit dem Konzept der *magic bullets* (Zauberkekeln) entworfen hatte, um Tumoren zu behandeln (29). Beim Einsatz von Immunkonjugaten wird darauf abgezielt, zytotoxische Stoffe mit einem für den Tumor spezifischen Antikörper zu verbinden und so, anders als bei einer Chemotherapie, nur die Zielzellen zu schädigen. Immunkonjugate sind Konstrukte aus einem spezifischen Antikörper, einem Linker und einem Zellgift wie beispielsweise bakterielle Toxine oder Mitosegifte, die gegen den Tumor wirken (30, 31).

Parallel zu den Fortschritten in der Entwicklung monoklonaler Antikörper mit einer sehr hohen Spezifität wurde auch ein breites Spektrum an

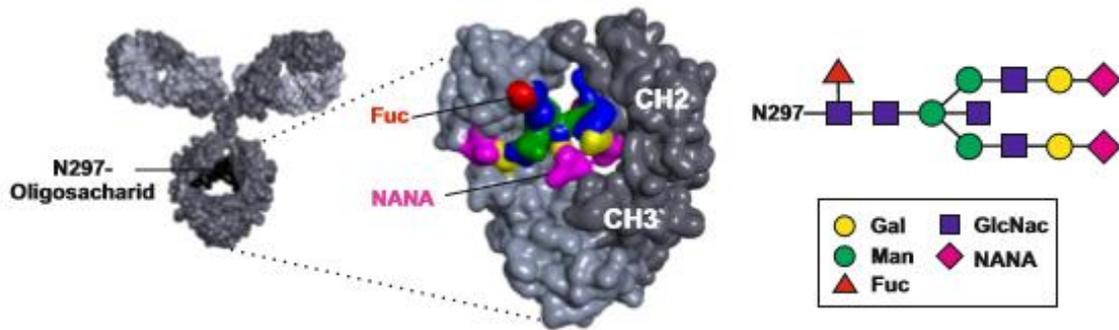
bispezifischen Antikörpern (BsAbs) entwickelt. Mithilfe dieser Art von Antikörpern werden andere Triggermoleküle adressiert. BsAbs vereinen zwei Bindungsstellen von zwei Antikörpern unterschiedlicher Spezifität in einem Molekül und ermöglichen nicht nur, ausschließlich spezielle Zielzellen anzugreifen, sondern erlauben es auch, einzelne Zelltypen wie natürliche-Killer(NK)-Zellen, T-Zellen, Granulozyten oder Monozyten als Effektorzellen zu rekrutieren. Mithilfe von BsAbs können also auch Effektorzellen stimuliert werden, die keine Fc-Rezeptoren tragen, vor allem T-Zellen. In der Tumorthherapie werden klinisch zurzeit lediglich bispezifische Antikörper der Klasse *bispecific T cell engager* (BiTE) zur Therapie eingesetzt. Diese bestehen aus einer Bindestelle für das aktivierende CD3-Antigen auf T-Zellen und einer zweiten Bindungsdomäne für Proteine auf der Zelloberfläche einer malignen Zelle. Sie rekrutieren also im klinischen Einsatz ausschließlich T-Zellen zur Tumorlyse (32-36).

Chimäre Antigenrezeptoren, kurz CARs, sind zwar keine Antikörper, sie stellen jedoch ebenfalls einen weiteren bedeutenden Ansatz in der Tumorthherapie dar und sollen deshalb hier mit erwähnt werden. CARs sind synthetische Rezeptoren, die die Spezifität, Funktion von behandelten T-Zellen beeinflussen können (37). Ihre Wirkweise basiert auf genetisch modifizierten autologen T-Zellen, die einen chimären Antigenrezeptor exprimieren. Dieser Rezeptor ermöglicht die Erkennung von Antigenen auf Zelloberflächen von Tumorzellen. CARs sind konstruiert aus einer komprimierten Zieldomäne (*single chain fragment variable*, scFv) und einer Signaldomäne bestimmter auf T-Zellen exprimierter Rezeptoren (38-41).

### 1.3 Fc-optimierte Antikörper

Der Einsatz von therapeutischen Antikörpern als Monotherapie ist häufig nicht ausreichend, und nicht alle Patienten profitieren von der im allgemein nebenwirkungsarmen Therapie mit Antikörpern. Außerdem bleiben Rückfälle ein ernst zu nehmendes Problem. Die Weiterentwicklung und Verbesserung von Antikörpern ist auch insofern ein wichtiges Thema der aktuellen Forschung. Die Erforschung der Effektorfunktionen haben uns tiefere Einblicke in das Potenzial von Antikörpern geliefert. Durch die Änderung von Details der Antikörper wie zum Beispiel Glyko-Engineering zur gesteigerten ADCC und Protein-Engineering zur Steigerung der CDC konnten bestimmte Wirkmechanismen in ihrer Effektivität verbessert und zielgerichtet für eine therapeutische Funktion entwickelt werden (1, 2, 42, 43).

Eine Optimierung der Fc-Domäne, die die Bindung zu den FcγR und zu dem Komplementfaktor C1q verbessert, könnte eine vielversprechende Methode sein, um die Effizienz der Antikörpertherapie weiter zu steigern. Davon ausgehend, dass die ADCC und CDC wichtige Antikörperfunktionen sind, ist die höhere Affinität zu FcγR und C1q durch Fc-Optimierungen von großem Interesse. Zwei verschiedene Technologien, die Optimierung der Glykosylierung und Veränderungen der Aminosäuresequenz (Proteinoptimierung), sind gängige Methoden der Effizienzsteigerung von Antikörpern. Glyko-Optimierung wird angewendet, um die ADCC-Fähigkeiten zu steigern. Bei Antikörpern, die Glyko-optimiert sind, ist das an Asparagin N297 gebundene Oligosaccharid zum Beispiel ohne Fucose (Abb. 4). Diese Manipulation wurde gezielt eingesetzt, um die Affinität zum FcγRIIIa zu erhöhen und damit die Effizienz der ADCC durch NK-Zellen zu steigern (44-46). Mit Obinutuzumab wurde z.B. ein erster Glyko-optimierter Antikörper zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zugelassen (47-49).



**Abbildung 4. Darstellung der an Asparagin (N297) gebundenen Oligosacharidkette.** In der Mitte, wo sich die Bindung von Oligosacharid an Asparagin (N297) befindet, wird das Fc-Teil vergrößert dargestellt. Die Anordnung der Oligosacharidkette ist rechts schematisch dargestellt. Gal = Galactose (gelb); Man = Mannose (grün); Fuc = Fucose (rot); GlcNac = N-Acetylglucosamin (blauviolett); NANA = N-Acetylneuraminsäure (pink). Aus Kellner et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags s. Karger.

Veränderungen in der Proteinstruktur wurden zur Steigerung der Affinität zu C1q oder zu FcγR durchgeführt (42). Es wurden bereits eine ganze Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen Aminosäuren manipuliert wurden. Diese zeigten auch merkbare Erfolge hinsichtlich einer gesteigerten Effektivität der ADCC und der ADCP (50, 51). In anderen Studien wurden auch mit spezifischen Proteinmanipulationen Versuche gemacht, um die Aktivität bei der CDC zu steigern (52, 53). Außerdem gab es Versuche, die CDC-Aktivität durch gemischte Isotypen zwischen IgG1 und IgG3 von Rituximab oder durch Herstellung von IgG3-Varianten von Antikörpern zu steigern (54, 55). Mit einem weiteren Ansatz wurde die CDC-Fähigkeit verbessert, indem bestimmte Aminosäuren ausgetauscht (Mutation E345R, Glu<sup>345</sup> → Arg), wurden, die eine Hexamerisierung der Antikörper nach Antigenbindung auf der Zelloberfläche fördern (56). Obwohl inzwischen mehrere Optimierungen bekannt sind, die die CDC- oder ADCC-Aktivitäten steigern, bleibt die simultane Steigerung beider Effektorfunktionen durch den Austausch von Aminosäuren schwierig. Ursache dieser Schwierigkeit ist vermutlich eine Überlappung an der Bindestelle zu C1q (57) und der Bindestelle zu FcγR (58, 59). Einige CDC-optimierte Varianten zeigten sogar eine schwächere Fähigkeit der Zelllyse durch ADCC im Vergleich zum

Wildtyp (52). Um diesen Verlust wieder gutzumachen, waren zusätzliche Veränderungen nötig, zum Beispiel eine Afucosylierung zur Optimierung der ADCC-Aktivität (60).

#### 1.4 Effektormechanismen von CD20-Antikörpern

Besonders CD20-Antikörper sind sehr gut in der Tumorthherapie etabliert. Inzwischen sind neben Rituximab drei weitere CD20-Antikörper für die Therapie von B-Zell-Lymphomen oder Leukämien zugelassen: Obinutuzumab, Ofatumumab, Ocaratuzumab (nur USA) (61).

CD20 ist ein Oberflächenprotein auf der Zelloberfläche von B-Zellen, dessen Struktur zwar bekannt ist, zu dessen Funktion aber noch einige Fragen offen sind (62). Zurzeit besteht bezüglich der Funktion von CD20 die Annahme, dass das Protein eine Rolle beim Transport von Calcium durch die Zellmembran spielt (63). CD20 ist weit verbreitet auf B-Zellen zu finden, und man geht davon aus, dass es aus vier Transmembranhelices mit zwei extrazellulären Loops (ECL1 und ECL2) besteht, die mit einer Disulfidbrücke verbunden sind (64).

Rituximab ist der CD20-Antikörper, der als erster zugelassen wurde. Inzwischen gibt es auch weitere zugelassene CD20-Antikörper der zweiten Generation wie Ofatumumab und Obinutuzumab. Obinutuzumab ist ein humanisierter Typ-II-CD20-Antikörper mit niedrigem Fucosegehalt im Fc-Teil, der zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie und einem folliculären Lymphom eingesetzt werden kann. Obinutuzumab kann sowohl stärkere ADCP als auch stärkere ADCC auslösen (47, 65). Ofatumumab ist ein humaner IgG1-Antikörper, der zugelassen ist zur Behandlung von chronisch lymphatischer Leukämie. Ofatumumab bindet an ein anderes Epitop von CD20 als Rituximab, und zwar sowohl an den *small loop* als auch an den *big loop*, während Rituximab nur an den *big loop* von CD20 bindet. Zusätzlich wird Ofatumumab langsamer abgebaut als Rituximab, bindet besser an C1q, und kann so das Komplementsystem besser aktivieren (66).

Es gibt zwei verschiedene Typen von CD20-Antikörpern, Typ I und Typ II. Beide Typen haben gute Fähigkeiten, zellabhängige Lyse (ADCC) einzuleiten, während die Fähigkeit, durch das Komplementsystem (CDC) oder durch direkte Lyse Zellen zu töten, von Typ zu Typ variiert. Rituximab ist ein Typ-I-Antikörper und besitzt als solcher gute Fähigkeiten, eine effiziente Aktivierung des Komplementsystems und ADCC einzuleiten. Der Nachteil von Typ-I-Antikörpern gegenüber Typ-II-Antikörpern ist, dass sie nur ganz schwach den direkten Zelltod triggern können. Typ-II-Antikörper wie z.B. Obinutuzumab können Tumorzellen sehr effektiv direkt lysieren. Dafür besitzen sie aber kaum die Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems. In vivo ist die Situation noch wesentlich komplexer und die Wirkung der verschiedenen Antikörper-Funktionen ist noch nicht komplett erforscht. Versuche mit Tiermodellen haben gezeigt, dass die Funktionen, die durch die *fragment crystallizable* (Fc) *region* vermittelt werden, wie CDC und die Rekrutierung von Effektorzellen, die Wirksamkeit der Antikörper stark beeinflussen (67-70).

Es gibt auf den Immuneffektorzellen verschiedene Fc $\gamma$ -Rezeptoren, CD64, CD32 und CD16, an die der Antikörper mit dem Fc-Teil bindet. Bis auf Fc $\gamma$ RIIb, der inhibierend wirkt, sind alle anderen Typen aktivierende Fc $\gamma$ Rs. Der Fc $\gamma$ RIIIa, dem eine bedeutende Rolle bei der Antikörpertherapie zugeschrieben wird, werden zwei unterschiedliche Allelvarianten mit unterschiedlicher Affinität zu den Fc-Teilen der Antikörper beschrieben. Fc $\gamma$ RIIIa 158-V (Valin) hat eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit zum Fc-Teil als Fc $\gamma$ RIIIa 158-F (Phenylalanin). Patienten mit einer homozygoten Expression des Allels Fc $\gamma$ RIIIa 158-V, welches die Fc-Domäne des Antikörpers mit höherer Affinität bindet, zeigten eine bessere Reaktion auf eine Therapie mit Rituximab und anderen therapeutischen Antikörpern im Vergleich zu Patienten, die homozygot das Allel Fc $\gamma$ RIIIa 158-F mit einer niedrigeren Affinität zum Fc-Teil tragen (71-75). Fc $\gamma$ RIIIa wird auf natürlichen Killerzellen (NK), Makrophagen und Monozyten exprimiert. Somit sind die genannten Immuneffektorzellen bei der Antikörpertherapie

wahrscheinlich von großer Bedeutung. Weitergehend wurde die Aktivierung von NK-Zellen durch eine Gabe von Rituximab an einem Patienten mit einem hochaffinen FcγRIIIa-Polymorphismus gezeigt (76). Diese Resultate legen nahe, dass die FcγR-Bindung der Effektorzell-Aktivierung eine Schlüsselrolle einnimmt (77). Die Rolle der Lyse durch das Komplementsystem (CDC) ist als weiterer indirekter Wirkmechanismus therapeutischer Antikörper ebenfalls von Bedeutung. Unterschiedliche Studien, bei denen gezeigt wurde, dass durch Gabe von Rituximab das Komplementsystem verbraucht wurde und dass Patienten von Plasmagaben als Quelle für Komplement profitiert haben könnten, legen eine Wirkung von Rituximab durch CDC nahe (78, 79). Zusätzlich wurde in weiteren Studien gezeigt, dass nach einer Rituximab-Behandlung bei antikörperresistenter CLL die Expression von inhibitorischen Membran-gebundenen komplementregulierenden Proteinen (mCRP) CD59 der Patienten gestiegen ist (80, 81).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Fc-vermittelte Effektormechanismen spielen eine wichtige Rolle für die therapeutische Wirksamkeit monoklonaler Antikörper. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die ADCC- und CDC-Aktivität simultan gesteigert werden können. Dies sollte durch parallele Protein-Optimierung und Glyko-Optimierung realisiert werden. Dafür wurde die Fc-Domäne des IgG1-Isotyps an fünf Aminosäurepositionen manipuliert (S267E/H268F/S324T/G236A/I332E, EFTAE-Variante) und in den Hintergrund des CD20-Antikörpers Rituximab eingebracht. Antikörper mit dieser Mutation zeigten bereits in vorherigen Versuchen eine erhöhte Fähigkeit der CDC, ohne die ADCC-Fähigkeit von nativen IgG1-Antikörpern zu beeinflussen (52). Davon abgeleitet wurden fucosylierte und afucosylierte Varianten von Rituximab mit und ohne die EFTAE-Mutation hergestellt und die unterschiedlichen Varianten auf ihre

Bindungsfähigkeiten mit Effektor- und Zielzellen und auf ihre Fähigkeiten, in vitro Tumorzellen durch CDC und durch ADCC zu lysieren, getestet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> nach Empfehlung der Hersteller kultiviert. Stabil transfizierte Zelllinien wurden mit entsprechenden Selektionsmedien kultiviert. Bei der Zelllinie CHO-K1 [43] wurde Geneticin (1 mg/ml) zum Standardmedium gegeben (Tabelle 1).

Name	Zelltyp	Medium	Quelle
MEC-2	Chronische B-Zell-Leukämie	D10 <sup>+</sup>	DSMZ
GRANTA-519	B-Zell-Lymphom	D10 <sup>+</sup>	DSMZ
Ramos	Burkitt-Lymphom	R10 <sup>+</sup>	DSMZ
CHO-K1	Ovarzellen des chinesischen Hamsters	R10 <sup>+</sup>	DSMZ
Lec13	CHO-Mutante	R10 <sup>+</sup>	*
Lenti-X	HEK293T-Sublinie	D10 <sup>+</sup>	DSMZ

1

**Tabelle 1. Verwendete Zelllinien.** R10<sup>+</sup>: RPMI 1640 Medium, 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penizillin-Streptomycin; D10<sup>+</sup>: DMEM Medium, 10 % FCS, 1 % Penizillin/Streptomycin. Bei der Zelllinie CHO-K1-[43] wurde Geneticin (1 mg/ml) zum Standardmedium gegeben. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland); \*LEC13-Zellen wurden freundlicherweise von Professor Pamela Stanley (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, New York, NY, USA) zur Verfügung gestellt.

## 2.1.2 Monoklonale Antikörper

**Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper.**

Name	Spezifität	Format	Quelle/ Hersteller
Rituximab	CD20	IgG1 (chimärisiert)	Ref / Roche
Trastuzumab	HER2	IgG1 (humanisiert)	Ref / Roche
C2B8	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert
C2B8 (Fuc <sup>-</sup> )	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert
C2B8-EFTAE	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert
C2B8-EFTAE (Fuc <sup>-</sup> )	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert
C2B8 (GNT-III )	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert
C2B8-DE	CD20	IgG1 (chimärisiert)	unpubliziert

## 2.1.3 Chemikalien

Alle genutzten Chemikalien, Puffersubstanzen, Antibiotika, Lösungsmittel etc. stammen von den Firmen Qiagen (Hilden), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München), Merck

(Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), PAA Laboratories (Pasching), Biochrom (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Biotest (Dreieich) und Dianova (Hamburg). Für Lösungen und Verdünnungen wurde ohne Ausnahme Wasser mit einem spezifischen Widerstand von  $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^2$  aus der Deionisationsanlage MilliQ der Firma Milipore (Eschborn) benutzt.

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### Transfektion

<b>Waschlösung</b>	1x PBS	
<b>Puffer-Ansatz 2XHBS pH7,05</b>	HEPES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
<b>DNA-Ansatz</b>	DNA	0 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg
	CaCl <sub>2</sub>	100 µl
	Chloroquin	5 µl
	MQ H <sub>2</sub> O	895 µl

### Reinigung über Kappa/CH1

<b>Waschpuffer</b>	Glycin	pH 3, 0.1 M
<b>Elutionspuffer</b>	1x PBS	pH 7,5
<b>IgG-CH1 Affinity Matrix</b>		

### Lectin-Blot

<b>Waschpuffer</b>	Tris	1 M
	NaCl	5 M
	CaCl <sub>2</sub>	0,5 M
<b>Blockierungspuffer</b>	Tris	1 M
	NaCl	5 M
	CaCl <sub>2</sub>	0,5 M
	Tween 20	500 µl
	BSA	5 g
	H <sub>2</sub> O steril	ad 1 L

### Gelelektrophorese

<b>Laufpuffer SDS-Page</b>	Tris	25 Mm
	Glycin	192 Mm
	SDS pH8,3	0,1 %

## Coomassie

<b>Coomassie</b>	H <sub>2</sub> O	60 ml
<b>Färbelösung</b>		
	Methanol	20 ml
	Roti-Blue	20 ml
<b>Waschlösung</b>		
	MeOH 99.8 %	25 ml
	H <sub>2</sub> O	75 ml

Wenn nicht spezifisch beschrieben, sind alle Lösungen und Puffer aus bekannten Protokollsammlungen Sambrock and Russel entnommen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transiente Antikörper-Expression in Lenti-X Zellen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion

Es wurden vier verschiedene Versuche mit je 25 Platten parallel angesetzt. Einen Ansatz ohne DNA und Ansätze mit 5 µg, 10 µg und 15 µg GNT-III-DNA. Am ersten Tag wurden die Lenti-X-Zellen mit Trypsin abgelöst. Dann mit 1x PBS gewaschen, gefärbt und gezählt. Pro Platte wurden  $3 \times 10^6$  Lenti-X-Zellen pro Platte ausgesät und gut verteilt, nachdem 10 ml D10+ (+L-Glutaminen) vorgelegt wurden. Über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Danach wurden die DNA-Ansätze in 50 ml Falcons fertig präpariert. Die drei Ansätze bestanden pro Platte aus 1,5 und 10 µg DNA, 100 µl CaCl<sub>2</sub>, 5 µl Chloroquin und wurde mit destilliertem Wasser auf 1 ml

aufgefüllt. Dafür wurde unter Blubbern mit 2x HBS mittels einer 5-ml-Pipette die DNA so langsam wie möglich aus einer 10-ml-Pipette dazugetropft. Dann wurden je 2 ml der DNA-Ansätze tropfenweise auf die Platten pipettiert. Daraufhin wurden die Platten geschwenkt, bis die DNA gut verteilt war. Dann wurden die Platten für 9 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurde wieder das Medium gewechselt, bevor die Zellen noch einmal 48 h bei 37 °C inkubiert wurden.

Danach wurde jeden Tag der Überstand abgenommen und gesammelt, bis sich die Zellen aufgrund der Zelldichte von dem Boden lösten.

### 2.2.2 Stabile Expression der Antikörper in CHO/Lec13 nach Transfektion mit Lipofectamin

Es wurden  $2 \times 10^6$  CHO-K1-Zellen oder  $2 \times 10^6$  Lec13-Zellen pro Platte ausgesät. Pro Platte wurden 5 µg des Plasmids eingesetzt. Die stabile Transfektion erfolgte unter Verwendung des Amaxa Nucleofectionssystems (Lonza, Köln) und des Transfektionskits V nach Herstellervorgaben für CHO-Zellen und Lec13-Zellen (82). Nach 48 h wurde ein neues Medium mit 500 µg/ml Hygromycin auf die Zellen gegeben. Als Vektoren wurden für die leichte Kette (LC) pSectag2-4D5-LC (nicht publizierte Daten) gewählt, für die schwere Kette (HC) pSec-tag2-HygroC (kodiert eine native IgG1-Fc-Domäne) und für die Mutation pSec-HC-EFTAE (kodiert die engineerete Fc-Domäne mit den Aminosäure-Substitutionen S267E/H268F/S324T/G236A/I332E; Daten nicht publiziert). Die Richtigkeit der geklonten Sequenzen in den finalen Konstrukten wurde mithilfe der DNA-Sequenzierung nach Sanger bestätigt. Die Durchlasszellen wurden für zwei Wochen unter selektivem Druck mit Hygromycin B 500 µg/ml gelagert. Dadurch wurden die Zellen, die nicht den Selektionsmarker enthielten, eliminiert. Der Überstand der gemischten Zellklone enthält rekombinante Proteine. Für größere Proteinmengen wurden einzelne Subklone mit mittelmäßiger bis guter Proteinproduktion reduziert und verdünnt. Um die

Subklone mit guten Produktionsraten zu identifizieren, wurde der Überstand durchflusszytometrisch untersucht.

### 2.2.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie

Die selektierten Antikörper aus dem Überstand wurden mit CaptureSelect™ IgG-CH1 Affinity Matrix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung von Schwerkraftsäulen (*gravity flow columns*; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) streng nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Die Überstände wurden in sterilen Flaschen gesammelt. Die Flaschen wurden 45 min bei 7000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit einem pH-Meter der pH-Wert bestimmt. Werte zwischen 7,9 und 8,1 wurden akzeptiert, ansonsten wurde der pH eingestellt. Danach wurde der Überstand durch einen Filter in eine andere sterile Flasche übertragen. Anschließend wurden 1 ml/L IgG-CH1 Affinity Matrix dazugegeben, und die Flasche wurde über Nacht unter Rühren mit einem Magneten bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Überstände in 50-ml-Falcons umgefüllt und mehrfach zentrifugiert, bis 800 ml zu 20 ml mit konzentrierterem Protein wurden. Diese 20 ml liefen in 15 Fraktionen durch eine Matrix. Danach wurde das Protein noch 2-mal mit 10 ml PBS (4 °C) gewaschen. Schließlich wurde 1 ml 0,1-molares Glycin mit pH3 pro Fraktion dazugegeben, nachdem 1 ml TRIS vorgelegt wurde, um den pH-Wert auszugleichen.

### 2.2.4 Massenabschätzung der Proteine

Die Menge der Proteine wurde durch den Experion Chip Pro 260 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, United Kingdom) bestimmt. Die Durchführung wurde streng nach Anleitung mit den Produkten des Experion-Kits durchgeführt.

### 2.2.5 Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit 4-mal NuPAGE LDS *Sample Buffer* (Thermo Fisher, Vereinigte Staaten von Amerika) gemischt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt, bevor die Geltaschen mit den Proben beladen wurden. Es wurden 12 % NuPage SDS-Page-Gele (Life Science, Freiburg, Deutschland) mit 0,75 mm Dicke zum Auftrennen der Proteine verwendet. Die Beladung der Gele erfolgte nach dem Standardprotokoll von Laemmli 1970. Während der ersten 10 min lief die Gelelektrophorese bei 120 V. Danach erfolgte für weitere 50 min der Durchlauf bei 150 V.

### 2.2.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Das Gel wurde mit colloidalem Coomassie Brilliant Blue (Roth, Karlsruhe) auf einem Horizontalschüttler für mehrere Stunden gefärbt. Danach wurde das Gel mit Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

### 2.2.7 Western Transfer

Zum Übertragen der Proteine auf eine PVDF-Membran (Hersteller) wurde das Gel, nachdem die Proteine hindurchgelaufen waren, 5 min in Transferpuffer gelagert. Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Gelelektrophorese in einer Semi-Dry Blotkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung wurde bei 1 mA/cm<sup>2</sup> in einer Stunde durchgeführt. Danach wurde die Membran mit den Proteinen mit TBS/3 % BSA für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler blockiert.

Anschließend wurde die Membran 3-mal für 10 min auf dem Horizontalschüttler mit TBS-Tween gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-human IgG Fab<sub>2</sub>-FITC, Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten von Amerika). Er wurde in TBS/10 % Magermilchpulver

1 : 5000 verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Danach folgte dreimaliges Waschen in TBS-Tween. Um ein Foto der Proteine auf der Membran machen zu können, wurde ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescence*, von Pierce) auf der Membran verteilt. Anschließend wurde ein digitales Foto im Bio-Rad-System aufgenommen.

### 2.2.8 Lectin-Blot

Für den Lectin-Blot wurde die PVDF-Membran nach dem Western-Blot über Nacht in Puffer A geblockt. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur in Puffer A und 10 µg/ml Lectin für 2 h inkubiert. Anschließend wurde das Lectin in 3 Waschgängen à 10 min mit Puffer B entfernt. Danach wurde die Membran in Puffer A mit 0,05 % Tween 20 und 1 µg/ml Neutravidin-HRP für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut mit Puffer B gewaschen, zunächst 3-mal jeweils 10 min lang und danach 7-mal jeweils 4 min. Schließlich wurde wie beim Western-Blot ECL-Substrat auf die Membran gegeben, und es wurde im Bio-Rad-System eine Aufnahme gemacht.

### 2.2.9 Durchflusszytometrische Methoden

Es wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen je Probe eingesetzt und mit FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Proben bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die jeweiligen Antikörper wurden in FACS-Puffer auf 50 µg/ml verdünnt. Das Zellpellet wurde in 50 µl Antikörper-Verdünnung aufgenommen und für 30 min auf Eis gelagert. Nach erneutem Waschen in FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 20 µl Sekundärantikörper (anti-human IgG Fab<sub>2</sub>-FITC, Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten von Amerika) aufgenommen und für eine weitere halbe Stunde im Dunklen auf Eis gelagert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Proben in 500 µl FACS-

Puffer aufgenommen. Die Proben wurden weiter auf Eis gelagert, während sie für die Auswertung bereitstanden.

### 2.2.10 Isolation der Effektorzellen aus Vollblut und Präparation von Plasma

Für die Isolation der Effektorzellen aus Vollblut wurden 9 ml Zitratblut auf 6 ml 63-%iger Percoll-Lösung geschichtet. Anschließend wurden die Ansätze bei 2500 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Danach konnten das Plasma und die mononukleären Zellen (MNC) abpipettiert und gesammelt werden. Das Plasma wurde auf Eis gelagert und die mononukleären Zellen wurden für 5 min mit PBS gewaschen. Reste von Erythrozyten wurden durch eine hypotone Lyse mit kaltem destilliertem Wasser entfernt. Abschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in R10-Medium in einer Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen.

### 2.2.11 Analyse der Zytotoxizität im 51 Chrom-Freisetzungsexperiment

Alle ADCC- und CDC-Versuche wurden nach publizierten Protokollen von Elsasser et al. 1996 ausgeführt.

Für diese Versuche wurden Mikrotiterplatten mit 96 Bohrungen (Sarstedt) verwendet. Für jeden Ansatz wurden Triplets pipettiert. Das Verhältnis zwischen den Effektor- und Zielzellen in den ADCC-Versuchen war 40 : 1 (200 000 Effektorzellen : 5000 Zielzellen). Bei den CDC-Versuchen wurden 25 % Plasma eingesetzt. Die eingesetzten Antikörper wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l pro Bohrung zugegeben. In jeder Bohrung wurde die Menge auf 200  $\mu$ l mit dem Medium R10 aufgefüllt. Zum Berechnen der maximalen möglichen Lyse wurde ein Ansatz mit 50  $\mu$ l Zielzellen, 50  $\mu$ l Medium und 100  $\mu$ l Perchlorsäure (Triton X) pro Platte pipettiert (*maximum release*, MR). Die minimale Lyse wurde durch einen Ansatz mit 50  $\mu$ l

Zielzellen und 150 µl Medium bestimmt (*basal release*, BR). Außerdem wurde noch ein Ansatz mit 50 µl Zielzellen, 50 µl Effektorzellen (ADCC) oder Plasma (CDC) und 100 µl Medium pipettiert.

Es wurden  $1,5 \times 10^6$  Zielzellen pro ml abgezählt und mit 150 µl  $^{51}\text{Chrom}$  (GE Healthcare, München) für 2 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  markiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit Medium gewaschen und auf  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt.

Die Platten wurden für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Platten 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 25 µl Überstand auf eine Reader-Platte (Perkin-Elmer, Waltham USA) übertragen. In alle Bohrungen der Reader-Platte kamen zusätzlich noch 150 µl SuperMix Scintillation Liquid (Perkin-Elmer). Zur Auswertung kamen die Reader-Platten in einen Beta-Counter, der die Ergebnisse in *counts per minute* (cpm) angab.

Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{X \text{ cpm} - \text{BR cpm}}{\text{MR cpm} - \text{BR cpm}} \times 100$$

## 2.2.12 Statistische und grafische Auswertung

Mit Vorliegen der Ergebnisse aus dem Beta-Counter konnte die spezifische Lyse ermittelt werden. Statistisch und grafisch wurden die Versuche mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Es wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p$ -Werte  $< 0,5$ ) wurden mithilfe von Student's-t- oder two-way-ANOVA-Tests mit Bonferroni Post-hoc-Test errechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung der optimierten Antikörper

Das Ziel der Arbeit war es, durch Manipulation der Fc-Teile von Rituximab-Antikörpervarianten deren ADCC- und deren CDC-Fähigkeit zu verbessern. Dazu sollte Rituximab als Wildtypvariante mit IgG1-Fc und EFTAE-Fc sowohl als fucosylierte Variante als auch mit reduziertem Fucosegehalt hergestellt werden. Dabei sollten die EFTAE-Austausche im Fc-Teil zur Steigerung der CDC-Aktivität führen und ein reduzierter Fucosegehalt die Steigerung der ADCC-Aktivität bewirken. Die entsprechenden DNA-Konstrukte lagen zu Beginn der Arbeit vor.

Um das Projekt zu realisieren, musste zunächst eine Technik etabliert werden, den Fucosegehalt in IgG-Antikörpern zu reduzieren. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um afucosylierte Antikörper herzustellen. In dieser Arbeit wurden zwei Strategien getestet.

In dem ersten Ansatz wurde durch eine Überexpression von Beta-1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) die Afucosylierung des Fc-Teils angestrebt. Bei dieser Strategie wird durch Einbau eines sogenannten *bisecting sugar* verhindert, dass sich Fucose an das Oligosacharid an Position Asn-297 in der Domäne CH2 des Fc-Teils anlagert. Die Modifikation gelang durch Calcium-Phosphat-Transfektion des Gens des Glykosylierungsenzyms GnT-III aus der Ratte.

In einem zweiten Ansatz für die Herstellung afucosylierter Fc-Teile wurden die Antikörper in Lec13-Zellen exprimiert. Da Lec13-Zellen keine Fucose-Vorläufer herstellen können, sind die in ihnen exprimierten Antikörper afucosylierte Proteine.

Um die beiden Strategien zu vergleichen, wurden Expressionsvektoren, die die cDNA-Sequenz für Rituximab codieren, zum einen transient in Lenti-X 293T-Zellen zusammen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das die Beta-1-4-N-acetylglucosaminyltransferase III codiert, und zum anderen

wurden parallel die Rituximab-codierenden Vektoren in Lec13-Zellen transfiziert.

Aus dem Überstand der transfizierten Zellen wurden die Antikörper durch Affinitätschromatografie gereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurde die zytotoxische Aktivität der Antikörperpräparationen im Chromfreisetzungsexperiment analysiert.

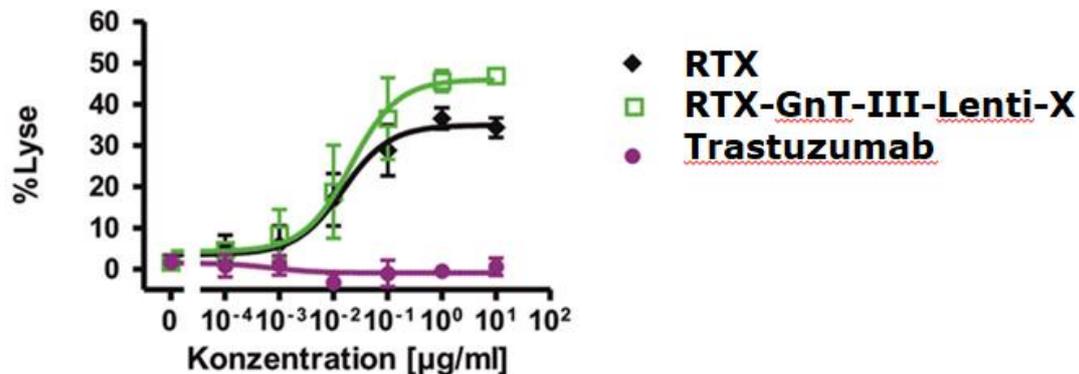
Den Effekt der GnT-III-Modifikation sollte die Analyse der Zytotoxizität in einem Chromfreisetzungsexperiment zeigen (Abb. 5). Dafür wurden die Antikörperkonstrukte RTX-GnT-III-Lenti-X in Drei-Stunden-Chrom-Freisetzungsexperimenten auf ihre Fähigkeit untersucht, die Tumorzellen durch ADCC zu lysieren (Abb. 5a). Als Zielzellen wurden MEC2-Zellen, eine B-CLL-Zelllinie, gewählt. Als Effektorzellen wurden MNCs aus Vollblut von verschiedenen Probanden isoliert und genutzt. Jedes Experiment wurde in drei Versuchen durchgeführt, die unabhängig voneinander stattfanden. Das Verhältnis von Effektor- zu Tumorzellen betrug bei allen Versuchen 40 : 1.

Die Experimente zeigen, dass die ADCC-Aktivität des RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörpers durch die Veränderungen verbessert wurde. Die Lyserate durch ADCC des RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörpers sind im Vergleich zu einem nativen Rituximab-Antikörper nicht statistisch signifikant verbessert. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Lysefähigkeit durch ADCC in der höchsten Konzentration von 2 µg/ml eingesetztem Antikörper im Schnitt um 12,58 % höher ist als die des nativen IgG1-Antikörpers Rituximab.

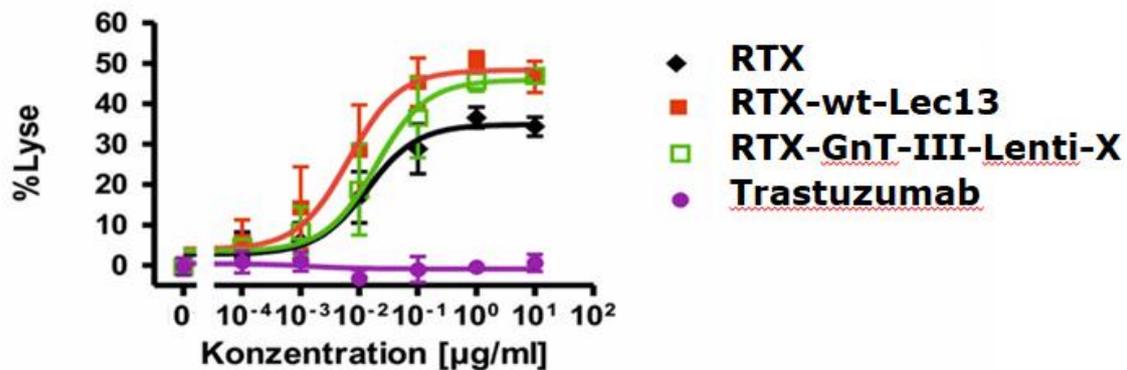
In einem weiteren Versuch wurden RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörper mit der anderen afucosylierten Variante RTX-wt-Lec13-Antikörper verglichen (Abb. 5B). Der Antikörper RTX-wt-Lec13 besaß eine halbmaximal effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) von 0,015 µg/ml und zeigte eine höhere Effektivität als der RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörper ( $EC_{50}$ ). Der RTX-wt-Lec13-Antikörper ist im Vergleich zu dem RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörper in allen drei Versuchen effizienter gewesen. Aufgrund der besseren Ergebnisse im Chromfreisetzungsexperiment mit den RTX-wt-Lec13-Antikörpern wurde der

Ansatz zur Afucosylierung für die doppelt engierte Antikörpervariante im Verlauf weiter verfolgt.

**A**



**B**

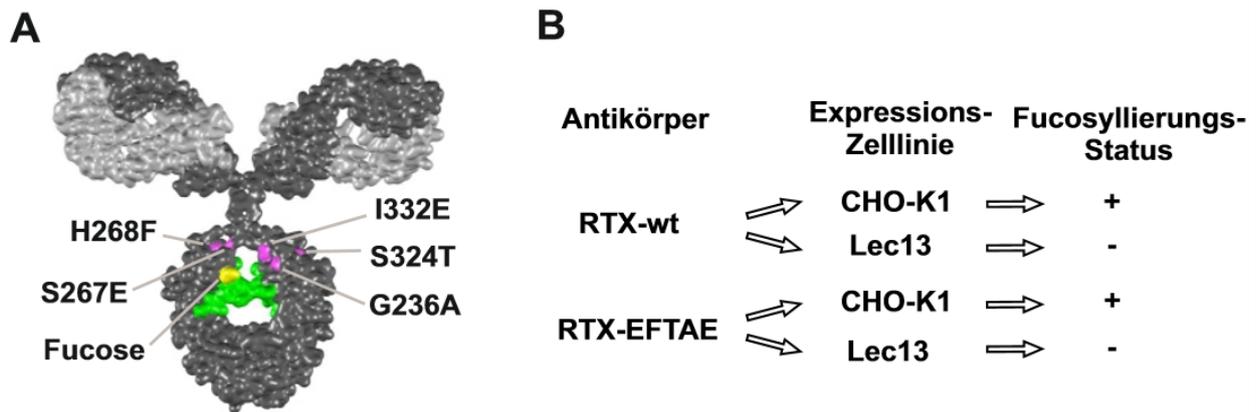


**Abbildung 5. Vergleich der ADCC-induzierten Chromfreisetzung von unterschiedlichen glyko-optimierten Antikörpern und nativem Typ.** Bei den Versuchen wurden als Tumorzellen (T) MEC-2-Zellen einer B-CLL-Zelllinie gewählt. Als Effektorzellen wurden MNCs aus Vollblut von Probanden gewonnen. Das Verhältnis E : T betrug bei allen Versuchen 40 : 1. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. **(A)** ADCC-Aktivität des Glyko-engineerten RTX-GnT-III-Lenti-X-Antikörpers im Vergleich zur ADCC-Aktivität des nativen Antikörpers Rituximab (RTX). Die Auswertung der dreistündigen Chromfreisetzung zeigt, dass der Antikörper RTX-GnT-III-Lenti-X eine bessere Lyserate aufweist als der Wildtyp Rituximab. Der mutierte Antikörper ist bei der durchgeführten Anzahl an Experimenten ( $n = 3$ ) noch nicht signifikant besser als der Wildtyp Rituximab, zeigt aber im Schnitt eine um 12,58 % höhere Lyserate in der maximalen Konzentration von 2 µg/ml eingesetztem Antikörper. **(B)** Das Essay der

*dreistündigen Chromfreisetzung zeigt die unterschiedliche ADCC-Aktivität durch verschiedene Antikörper-Varianten im Vergleich: natives Rituximab (RTX), die Variante RTX-wt-Lec13 (afucosylierte Variante von Rituximab, auf Lec13-Zellen hergestellt), RTX-GnT-III-Lenti-X (Rituximab-Variante mit der Glyko-Optimierung) und zur Negativkontrolle das nichtbindende Trastuzumab, ein anti-HER2-Antikörper. Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. RTX-wt-Lec13 ist in der Konzentration bei 0,4 µg/ml einfach signifikant effektiver als der Wildtyp, nicht aber als die GnT-III-Variante. Das mittlere Effektivitätsmaximum ist jedoch schon bei einer geringeren Konzentration erreicht. Einfach statistisch signifikant bedeutet  $p < 0,05$ . Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.*

### 3.2 Herstellung einer doppelt-Fc-optimierten Variante des Antikörpers Rituximab

Um neben der ADCC- auch die CDC-Fähigkeiten des Antikörpers zu verbessern, lag ein zweites Hauptaugenmerk für gezielte Manipulationen auf der EFTAE-Optimierung. Ziel war ein Austausch bestimmter Aminosäuren, wodurch die CDC-Fähigkeiten des Antikörpers verbessert wurden, ohne die ADCC-Aktivität zu beeinflussen, und beide Manipulationen, die Protein- (EFTAE) und die Glyko-Optimierung, wurden dafür in einem Antikörper vereint (Abb. 6). Die Proteinoptimierung wurde dadurch erreicht, dass die Modifikation S267E/H268F/S324T/G236A/I332E (EFTAE-Optimierung) zur Steigerung der C1q-Bindung in den Fc-Teil des Antikörpers in die Domäne CH2 integriert wurde (Abb. 6A). Um auch die ADCC-Aktivität zu verbessern, wurde der Antikörper afucosyliert hergestellt, indem er in Lec13-Zellen exprimiert wurde. In dem Antikörper RTX-EFTAE-Lec13 waren somit die EFTAE-Modifikation und der afucosylierte Fc-Teil vereint. Um eine fucosylierte EFTAE-Variante mit dem doppelt optimierten Antikörper vergleichen zu können, wurde der Antikörper mit der EFTAE-Optimierung auch in CHO-K1-Zellen als fucosyliertes Protein hergestellt. Ebenfalls wurden die nativen Rituximab-Sequenzen sowohl in CHO-K1- als auch in Lec13-Zellen exprimiert, um den Vergleich einer fucosylierten mit einer afucosylierten Variante des nativen Rituximab vornehmen zu können (Abb. 6B).

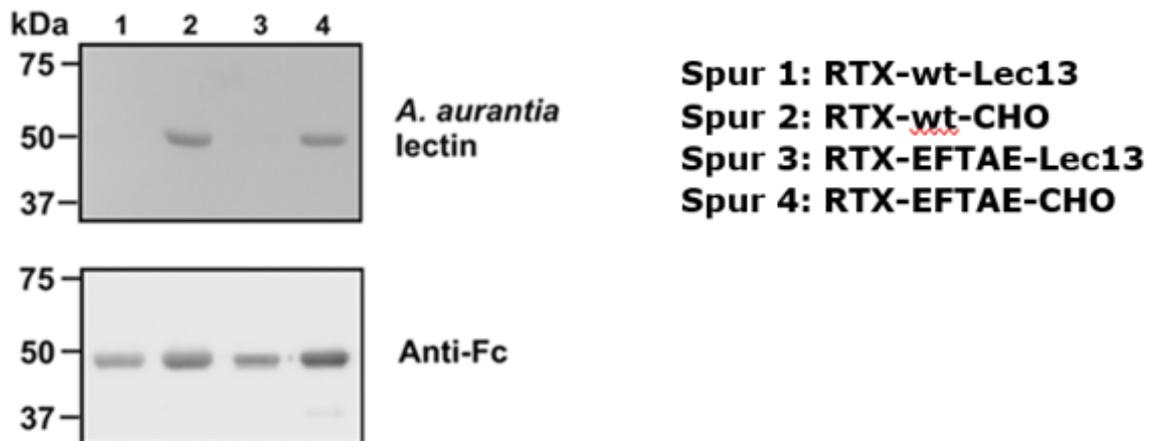


**Abbildung 6. Generation von Varianten des Antikörpers Rituximab mit verändertem Fc-Teil. (A)** In dem Strukturmodell sind die Positionen markiert, an denen Manipulationen zur Optimierung innerhalb der Domäne CH2 vorgenommen wurden, um die CDC-Aktivität zu erhöhen. Die leichte Kette (LC) ist in Hellgrau, die schwere Kette (HC) in Dunkelgrau dargestellt. Die Positionen der Aminosäuresubstitutionen S267E/H268F/S324T/G236A/I332E (EFTAE-Modifikation) sind lila markiert, der Überrest Fucose gelb. Das an Asn-297 gebundene Oligosaccharid ist grün eingefärbt. Das IgG-Strukturmodell basiert auf pdb-Daten, die von Dr. Mike Clark (83) zur Verfügung gestellt und durch Discovery Studio Visualizer (Biovia, San Diego, CA, USA) bearbeitet wurde. **(B)** Die EFTAE-Modifikation wurde in die Sequenz der Fc-Domäne von Rituximab eingebracht (RTX-EFTAE). Eine Variante mit der EFTAE-Modifikation (RTX-EFTAE) und eine Variante als Wildtyp (RTX-wt) wurden je in CHO-K1-Zellen und in Lec13-Zellen exprimiert. Die Antikörper, die in CHO-K1-Zellen exprimiert wurden (RTX-wt-CHO und RTX-EFTAE-CHO), sind fucosyliert (+), die Antikörper-Varianten, die in Lec13 exprimiert wurden (RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13), sind nicht fucosyliert (-). Dadurch wird eine Optimierung der ADCC-Fähigkeit erreicht. Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

Die vier verschiedenen CD20-Antikörper RTX-EFTAE-Lec13 (doppelt optimiert zur Verbesserung von ADCC und CDC), RTX-wt-CHO (nicht optimiert), RTX-EFTAE-CHO (CDC-optimiert) und RTX-wt-Lec13 (ADCC-optimiert) wurden in stabil transfizierten CHO-K1- bzw. Lec13-Zellen exprimiert und durch Affinitätschromatografie aus dem Überstand der Zellkultur gereinigt.

Die Integrität und Reinheit der Antikörper wurde durch reduzierte und nicht reduzierte SDS-Page und Coomassie-Blue-Färbung gesichert (Daten nicht gezeigt). Um den Fucosylierungsstatus der verschiedenen Varianten zu überprüfen, wurden Lectin-Blot-Experimente mit biotinyliertem *Aleuria aurantia* Lectin durchgeführt (Abb. 7). Und wie bereits in anderen Studien

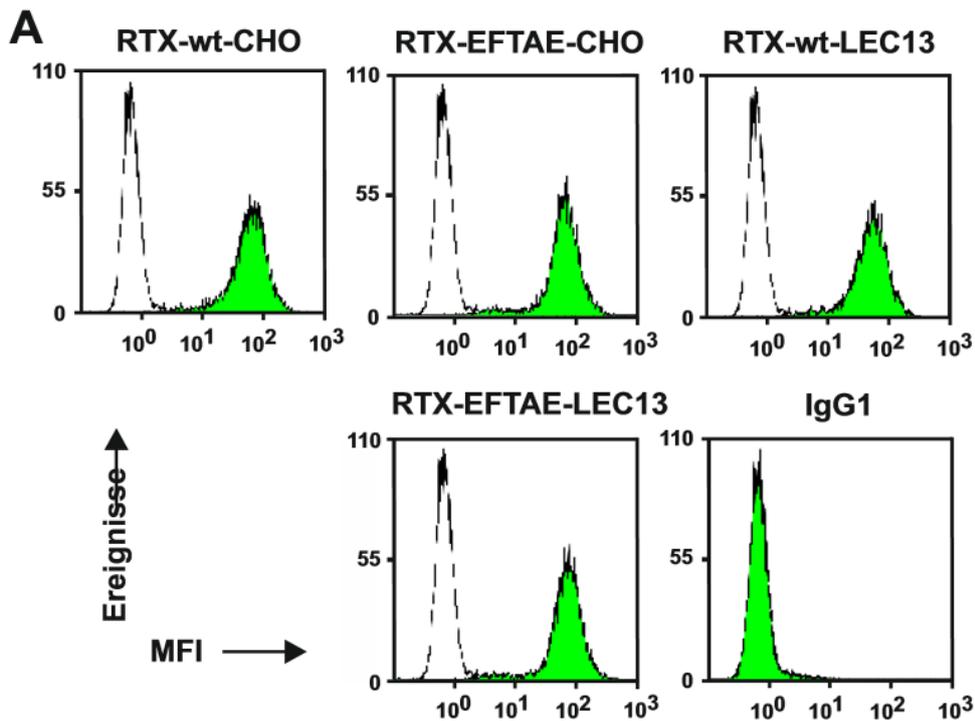
beschrieben (82), sind die Antikörper, die in CHO-K1-Zellen (z.B. RTX-wt-CHO und RTX-EFTAE-CHO) exprimiert wurden, fucosyliert und die Antikörper, die in Lec13-Zellen exprimiert wurden (z.B. RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13), sind afucosyliert.



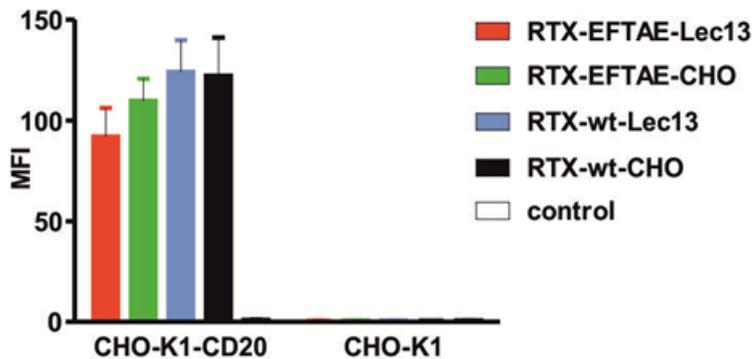
**Abbildung 7. Vergleich des Fucosylierungsstatus der hergestellten IgG1-Antikörper-Varianten.** Nach der Aufreinigung durch Affinitätschromatografie wurden die unterschiedlichen Antikörper-Sequenzen mit einem Lectin-Blot auf ihren Fucosylierungsstatus untersucht. Der Lectin-Blot wurde mit *A. aurantia*-Lectin und HRP-konjugiertem NeutrAvidin-Protein durchgeführt. An den dargestellten Banden ist zu erkennen, dass die Antikörper von Lec13-Zellen (oben, Spur 1 und 3) im Gegensatz zu den Antikörpern von CHO-Zellen (Spur 2 und 4) keine Fucose enthalten. Zur Kontrolle wurden die schweren Ketten mit HRP-konjugiertem Anti-human-IgG-Fc-Antikörper durch Western-Blot detektiert (unten). Dargestellt werden die Daten eines repräsentativen Experiments. Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

### 3.3 Analyse der Bindung an CD20-positive Zielzellen

Da an den Antikörperkonstrukten keine Veränderung am Fab-Fragment durchgeführt wurde, ist nicht von einer Veränderung der Bindung zu CD20 auszugehen. Um die Bindung zu CD20 messen zu können, führten wir durchflusszytometrische Messungen durch. Die folgenden Versuche zeigten, dass sich die Bindung der Antikörper an CD20 durch die Modifikationen an den Fc-Teilen nicht verändert hat. Die Bindung der Antikörpervarianten zu CD20 wurde mit MEC-2-Zellen (Abb. 8A) und mit CHO-K1-Zellen, die mit humanem CD20 stabil transfiziert wurden (CHO-K1-CD20, Abb. 8B) getestet. Alle hergestellten Varianten von Rituximab zeigten, wie erwartet, eine Bindung an MEC-2-Zellen und an CHO-K1-CD20-Zellen. Als Negativkontrolle wurde auch die Bindung auf nicht transfizierten CHO-K1-Zellen und an anderen CD20-negativen Zelllinien (z.B. SK-BR-3-Zellen, Daten nicht publiziert) getestet. Bei diesen Versuchen wurde nachgewiesen, dass die Rituximab-Varianten nicht mit CD20-negativen interagierten und die Spezifität erhalten blieb. Ebenso wurde mit der eingesetzten Negativkontrolle Trastuzumab keine Bindung an eine der CD20-positiven Zelllinien beobachtet.



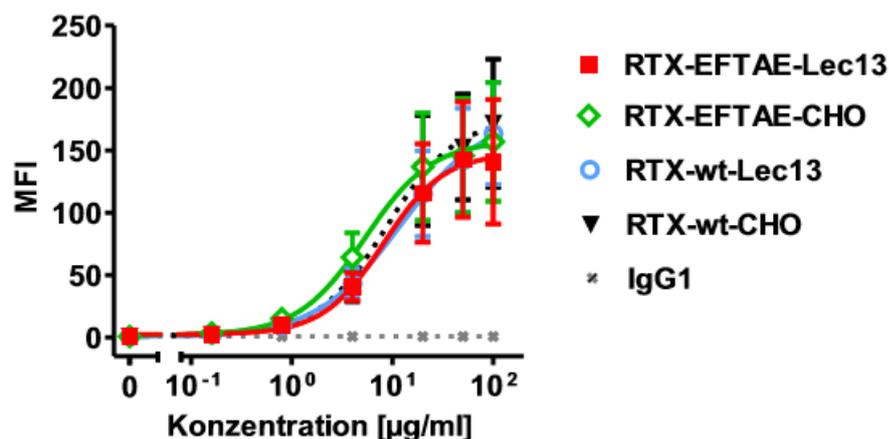
**B**



**Abbildung 8. Bindung der hergestellten Antikörper an CD20.** Grafisch dargestellt wird die MFI (mittlere Fluoreszenz-Intensität). **(A)** CD20-positive MEC-2-Zellen wurden mit Facs-Puffer alleine (weiße Histogramme) oder mit 50 µg/ml des angezeigten Antikörpers inkubiert (grüne Histogramme). Nach der Inkubation reagierten die unterschiedlichen Proben mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG-Fc-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurde das Experiment mit Facs-Puffer alleine durchgeführt. Die Histogramme der hergestellten Antikörper zeigten, dass deren Bindungsstärke zu CD20-positiven Zellen im Vergleich zum zugelassenen Rituximab nicht verändert war. **(B)** Für die Analyse wurden CHO-K1-CD20-Zellen hergestellt und die Bindung der Antikörper RTX-wt-CHO, RTX-EFTAE-CHO, RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13 (Konzentration: 50 µg/ml) wurde verglichen mit der Bindung von CHO-K1-Zellen, die nicht mit CD20 transfiziert wurden. Die in der Grafik dargestellten Messwerte zeigen eine Bindung

der Antikörper an die CHO-K1-CD20-Zellen, und ebenso, dass es keine Bindung an die nicht transfizierten CHO-K1-Zellen gab. Die Histogramme zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ). Die Antikörper wurden durch FITC-konjugiertes anti-humanes IgG Fc F(ab')<sub>2</sub> markiert und mit Durchflusszytometrie detektiert. Trastuzumab wurde als Kontrollantikörper eingesetzt. Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

Die Analyse der dosisabhängigen Bindung auf CHO-K1-CD20 Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikörper-Varianten (Abb. 9). Die durchgeführten Experimente beweisen, dass die Modifikationen an den Fc-Teilen der verschiedenen Konstrukte keinen Einfluss auf die Spezifität zu CD20 hatte.

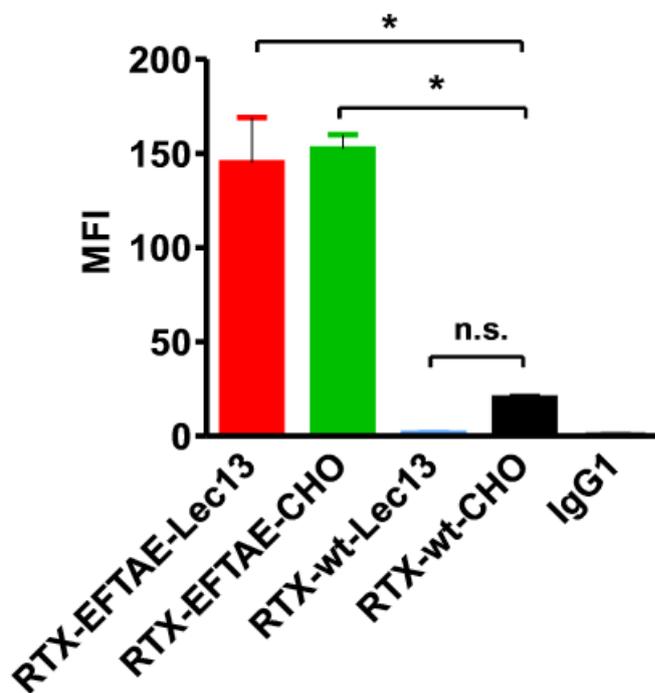


**Abbildung 9. Konzentrationsabhängige Bindungskurven zu CD20.** Die Grafik zeigt die Bindungsaktivität von CHO-K1-CD20-Zellen mit den verschiedenen Antikörpervarianten in Abhängigkeit der Konzentrationen. Die Antikörper wurden durch FITC-konjugiertes anti-humanes IgG Fc F(ab')<sub>2</sub> markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

### 3.4 Analyse der CDC-Aktivität

Eine Grundvoraussetzung für eine komplementabhängige Lyse von Tumorzellen (CDC) über den klassischen Weg ist die Ablagerung von C1q auf den Tumorzellen. Um die Fähigkeit der verschiedenen Varianten, C1q zu den Tumorzellen zu rekrutieren, zu vergleichen, wurden die fucosylierten

Varianten (RTX-wt-CHO und RTX-EFTAE-CHO) und die nicht fucosylierten Varianten (RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13) mit und ohne EFTAE-Modifikation gegeneinander getestet. Dafür wurden CD20-positive Daudi-Zellen (Burkitt-Lymphom) mit den verschiedenen Antikörpervarianten inkubiert und humanes Serum als C1q-Quelle wurde inkubiert (Abb. 10).



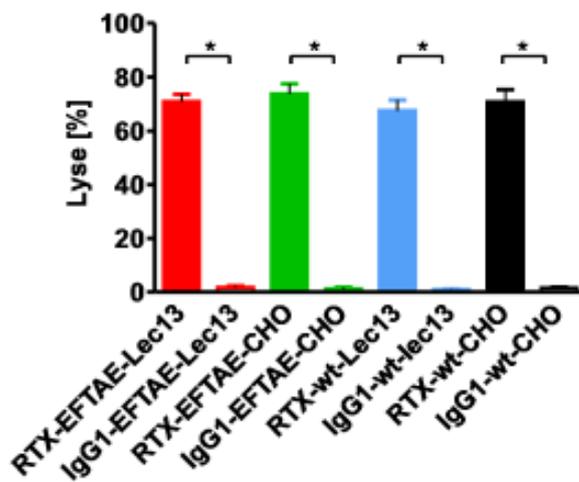
**Abbildung 10. C1q-Bindungsfähigkeit der Antikörpervarianten im Vergleich.** Für die Analyse wurden Daudi-Zellen als Zielzellen jeweils mit den Antikörpervarianten RTX-wt-CHO, RTX-EFTAE-CHO, RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13 (Konzentration: 50 µg/ml) bedeckt und zusammen mit humanem Plasma (1 %) als Quelle für C1q inkubiert. Eculizumab wurde hinzugefügt, um die CDC zu blocken. Die Anlagerung von C1q auf den Daudi-Zellen wurde durch einen FITC-gekoppelten Maus-anti-human-C1q-Antikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt. \* signifikant, n.s.: nicht signifikant. Jeder Balken zeigt die Mittelwerte ± SEM (n = 3). Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

Der Antikörper Eculizumab, der den Komplementfaktor C5 neutralisiert, wurde hinzugegeben, um die weitere Komplementkaskade der CDC während des Versuchs zu stoppen und eine Lyse der Zielzellen zu verhindern. C1q wurde über einen C1q-spezifischen Antikörper detektiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass die beiden Varianten mit

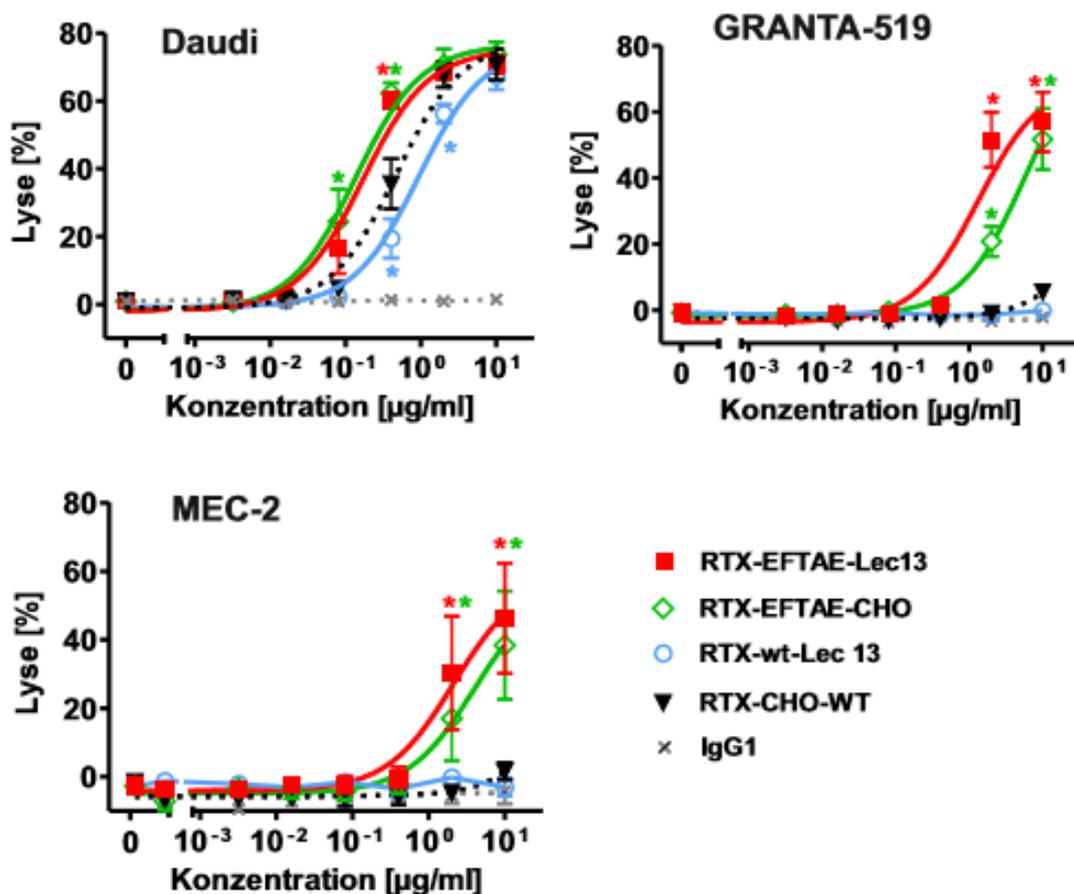
der EFTAE-Modifikation im Fc-Teil (RTX-EFTAE-CHO und RTX-EFTAE-Lec13) eine bessere Fähigkeit haben, C1q zu binden. Der unterschiedliche Fucosylierungsstatus der beiden Konstrukte zeigte keinen Einfluss auf die Effektivität, C1q zu rekrutieren. Da die EFTAE-Modifikation die einzige Veränderung an den optimierten Antikörpern im Vergleich zu RTX-wt-CHO beziehungsweise RTX-wt-Lec13 ist, ist davon auszugehen, dass die EFTAE-Modifikation im Fc-Teil der Grund für die Verbesserung der C1q-Bindungsfähigkeit ist.

Zum Nachweis der verbesserten komplementabhängigen Lysefähigkeit durch die EFTAE-Modifikation in den Konstrukten RTX-EFTAE-CHO und RTX-EFTAE-Lec13 wurden mit Daudi-Zellen 51-Chromfreisetzungsversuche durchgeführt (Abb. 11A). Alle CD20-positiven Antikörper zeigten dabei eine gewisse Fähigkeit zur komplementabhängigen Lyse gegen die Daudi-Zellen. Als Kontrolle wurden gleich designte, aber HER2-spezifische Antikörper eingesetzt. Bei diesen konnte wie erwartet keine Lyse gegen die Tumorzellen gemessen werden. Das zeigt, dass die verglichenen Konstrukte, RTX-wt-CHO, RTX-EFTAE-CHO, RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13, antigenabhängig die CDC eingeleitet haben. Alle CD20-spezifischen Antikörpervarianten zeigten schon bei nanomolaren Konzentrationen eine Wirkung. In ihrer Potenz sind Unterschiede zu erkennen. Die Varianten mit der EFTAE-Modifikation, RTX-EFTAE-CHO und RTX-EFTAE-Lec13, zeigten gleiche Fähigkeiten zur CDC-abhängigen Lyse. Im Vergleich zu den anderen Konstrukten, RTX-wt-CHO und RTX-wt-Lec13, erreichten sie bei ungefähr vier- bis fünffach niedrigerer Konzentration bereits die halbmaximale Effektivität. Bei Versuchen mit anderen Tumor-Zelllinien, (MEC-2 B-CLL und GRANTA-519 B-NHL), die weniger sensitiv gegenüber CDC sind, zeigte sich der mit Daudi-Zellen beschriebene Unterschied noch deutlicher: Die Antikörper mit der EFTAE-Modifikation zeigten eine deutlich bessere Fähigkeit, die Tumorzellen durch Komplementaktivierung zu lysieren, als die beiden Varianten des Wildtyps (Abb. 11B).

**A**



**B**

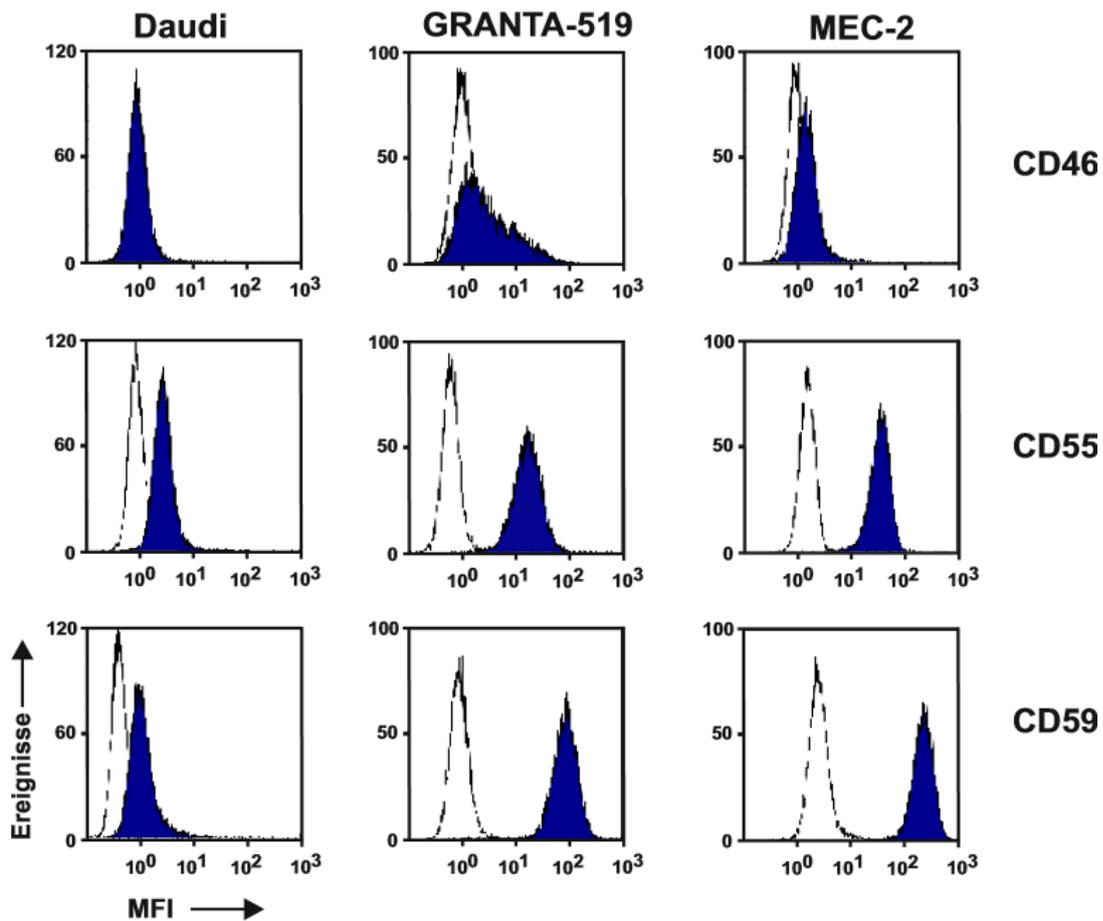


**Abbildung 11. CDC-Lyseraten der verschiedenen Antikörpervarianten. (A)** CDC mit den modifizierten Varianten des CD20-Antikörpers Rituximab im Vergleich zu HER2-positivem Kontrollantikörper auf Daudi-Zellen in einem Chromfreisetzungsexperiment mit 25 % humanem Plasma. Die Antikörperkonzentration betrug 10 µg/ml. Es wurden die Mittelwerte ± SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den CD20-positiven Antikörpern mit den gleich designten Kontrollantikörpern sind angezeigt (\*,  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ).

**(B)** *Dosisabhängige Induktion von CDC gegen Daudi (n = 3), MEC-2 (n = 4) und GRANTA-519 (n = 4) durch die Rituximabvarianten. 25 % humanes Plasma wurde als Komplementquelle hinzugefügt. Statistisch signifikante Unterschiede der Werte von den modifizierten Antikörpern gegenüber denen der nativen CD20-IgG1-Moleküle sind angezeigt (\*, p < 0,05). Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.*

Diese Konstrukte ohne EFTAE-Modifikation in den Fc-Teilen, RTX-wt-CHO and RTX-wt-Lec13, zeigten bei den beiden Tumorzelllinien kaum Lysefähigkeiten. Die Ergebnisse der Versuche mit MEC-2- und GRANTA-519-Zellen untermauerten damit die Ergebnisse der Versuche mit Daudi-Zellen, dass die EFTAE-Modifikation eine Optimierung für CDC erreicht.

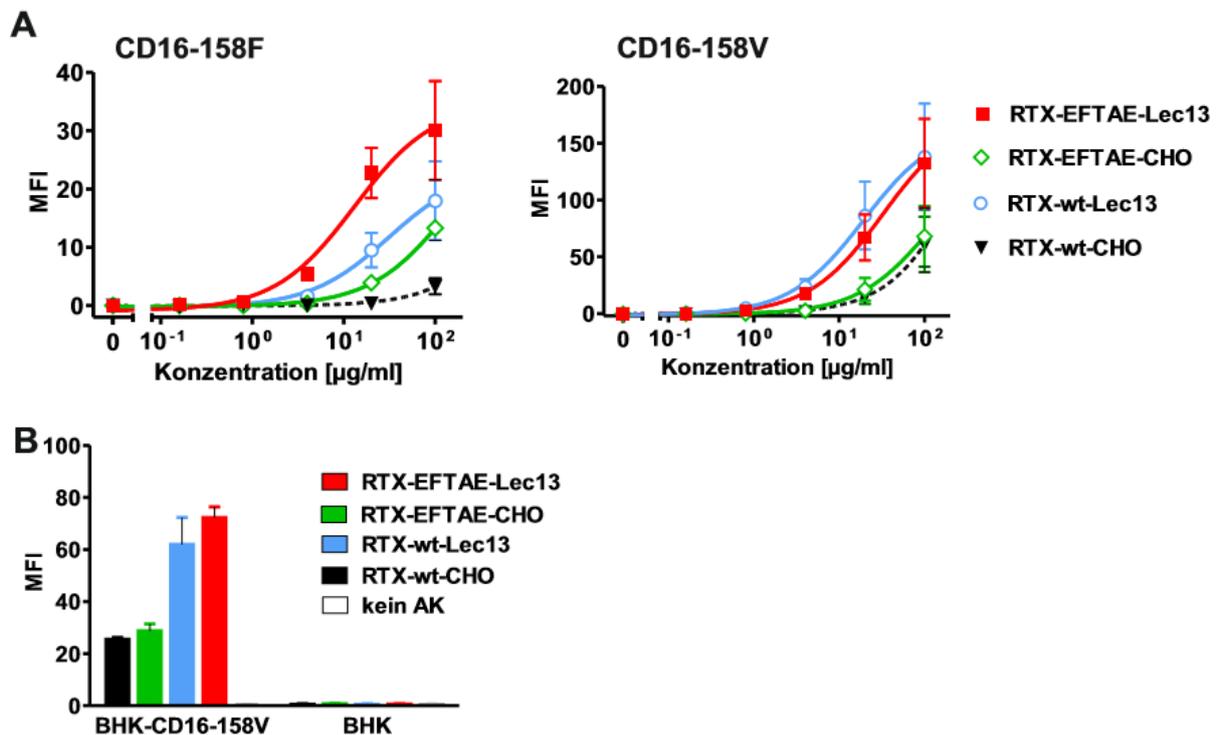
Für eine Lyse durch CDC bei MEC-2- und GRANTA-519-Zellen war eine höhere Konzentration an Antikörpern nötig als bei den Daudi-Zellen. Eine Erklärung für die geringere Lysefähigkeit durch CDC der Zelllinien MEC-2 und GRANTA-519 liegt vermutlich in der höheren Expression von mCRP CD46, CD55 und CD56 auf ihrer Zelloberfläche. Die genutzten Tumorzelllinien wurden daher durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenproteine mCRP CD46, CD55 und CD56 getestet (Abb. 12). Während die CDC-sensitiven Daudi-Zellen kaum Proteine dieser drei Inhibitoren CD46, CD55 und CD56 auf der Oberfläche aufwiesen, zeigte sich bei den beiden anderen Zelllinien (MEC-2 und GRANTA-519) mit geringerer Empfindlichkeit gegenüber dem Komplementsystem eine deutlich höhere Konzentration an allen drei mCRPs. Die unterschiedliche Expression der Verteidigungsproteine auf den Zelllinien könnte eine Erklärung für die Unterschiede sein, die durch die Chromrelease-Messung zum Nachweis der CDC-Aktivität mit den verschiedenen Tumorzelllinien festgestellt wurden.



**Abbildung 12. Expression von komplementregulatorischen Proteinen auf unterschiedlichen Zelllinien.** Daudi-, GRANTA-519- und MEC-2-Zellen wurden mit Antikörpern gegen die mCRPs CD46, CD55 und CD59 (blaue Ausschläge) oder mit zum Isotyp passenden Kontrollantikörpern (weiße Ausschläge) inkubiert. Um die Expression nachzuweisen, wurden sekundäre FITC-konjugierte Ziegen-anti-Maus-IgG-Fc-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente benutzt. Die Werte wurde durch Durchflusszytometrie gemessen. Resultate von einem repräsentativen Ergebnis aus n = 3 Versuchen wurden dargestellt. Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

### 3.5 Lyse durch ADCC

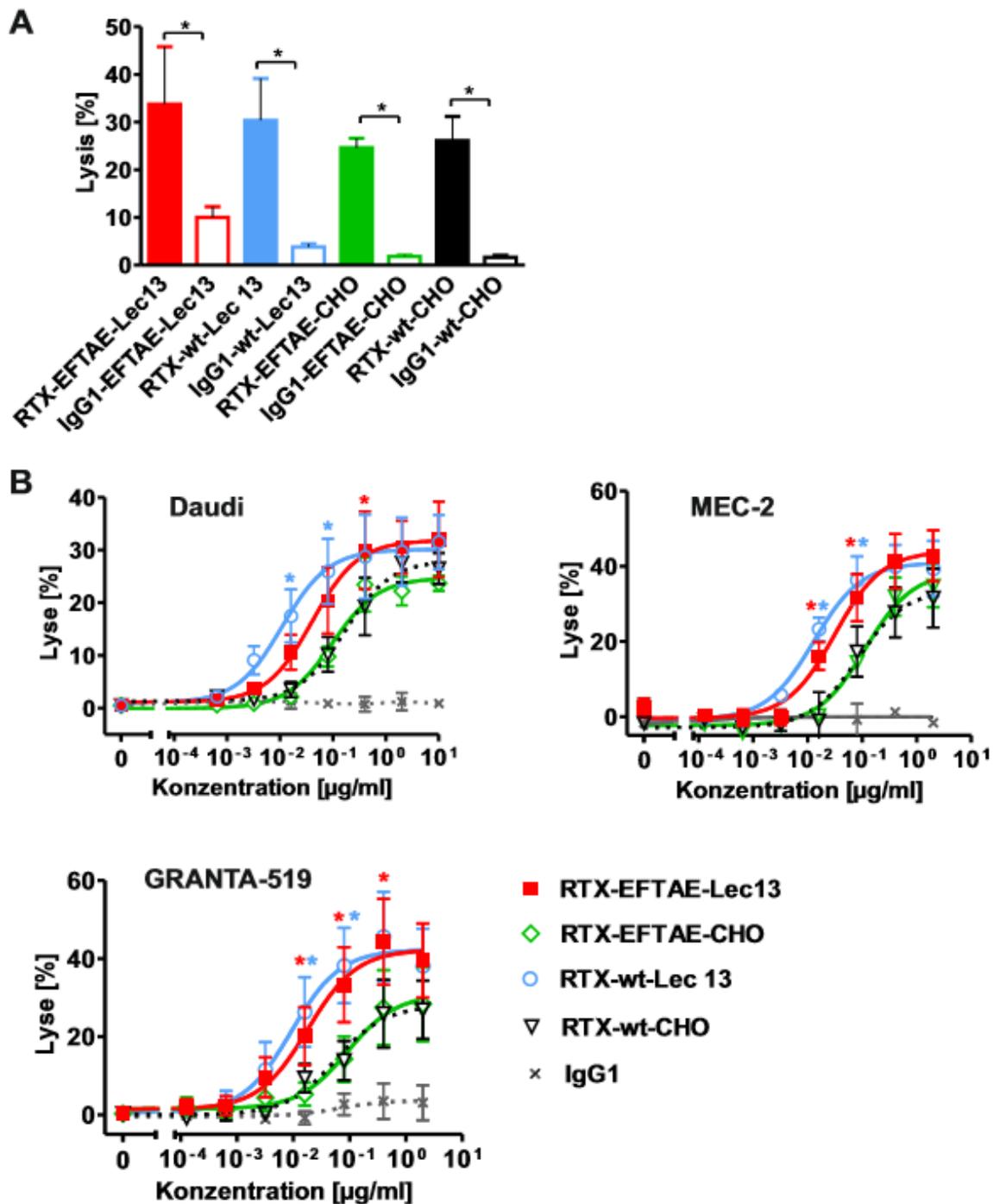
Die verschiedenen Antikörperkonstrukte wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, ADCC zu aktivieren, verglichen. Dafür wurde zuerst die Affinität der Fc-Teile der verschiedenen Antikörperkonstrukte zu FcγRIIIa getestet (Abb. 13A). Die Bindung wurde dosisabhängig ermittelt. Für die Analyse wurden BHK-Zellen und die zwei bekannten Varianten des FcγRIIIa eingesetzt. Die BHK-Zellen wurden durch stabile Transfektion mit FcγRIIIa-158 V oder mit FcγRIIIa-158 F ausgestattet. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die beiden afucosylierten Varianten (RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13) im Vergleich zu den fucosylierten Antikörpern (RTX-wt-CHO and RTX-EFTAE-CHO) eine signifikant höhere Affinität zu beiden FcγRIIIa-Varianten zeigten. Keiner der Antikörpervarianten zeigte eine Bindung zu nicht transfizierten BHK-Zellen, was beweist, dass die unterschiedliche Fluoreszenzintensität durch unterschiedlich starke Bindung an FcγRIIIa bedingt ist (Abb. 13B). Da der Fucosylierungsstatus der Antikörpervarianten RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13 der einzige Unterschied zu den Varianten RTX-wt-CHO und RTX-EFTAE-CHO ist, bedeuten die Ergebnisse, dass die unterschiedlich starke Affinität zum FcγRIIIa vom Fucosylierungsstatus abhängt.



**Abbildung 13. Fc $\gamma$ RIIIa-Bindung durch Rituximabvarianten. (A)** Die Grafik zeigt die dosisabhängige Bindung der unterschiedlichen Antikörpervarianten zu BHK-Zellen, die mit Vektoren transfiziert wurden, die Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  kodieren und entweder Fc $\gamma$ RIIIa-158 V (BHK-CD16-158 V) oder Fc $\gamma$ RIIIa-158 F (BHK-CD16-158 F) tragen. Analysiert wurden die Bindungen mit einem FITC-konjugierten anti-humanen IgG-Fc-F(ab') $_2$ -Fragment und mittels Durchflusszytometrie. **(B)** Die antigenspezifischen Bindungen wurden verifiziert durch Analyse der Bindung der vier Antikörpervarianten zu BHK-CD16-158-V im Vergleich zu untransfizierten BHK-Zellen. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt und wie oben beschrieben detektiert. Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.

Die Fähigkeit der Antikörper, Zellen durch ADCC zu lysieren, wurde durch Chromfreisetzungsexperimente mit Daudi-Lymphom-Zellen als Zielzellen und humanen MNCs als Effektorzellen analysiert (Abb. 14A). Im Gegensatz zu den HER2-spezifischen Negativkontrollen (IgG1-Varianten) zeigten alle Rituximab-Varianten sehr gute Lysefähigkeiten in diesen Experimenten. Dies weist darauf hin, dass die Zelllyse antigenabhängig induziert wurde. Um weiter die verschiedenen Varianten der CD20-spezifischen Antikörper hinsichtlich der induzierten ADCC-Aktivität miteinander zu vergleichen, wurden die Antikörpervarianten in verschiedenen Konzentrationen mit den Tumorzelllinien Daudi, MEC-2 und GRANTA-519 getestet (Abb. 14B). Wie

erwartet, zeigte sich bei den afucosylierten Antikörpern RTX-wt-Lec13 und RTX-EFTAE-Lec13 stimmig zur höheren Affinität zu FcγRIIIa (vgl. Abb. 13A) auch bei den Chromfreisetzungsexperimenten eine bessere Fähigkeit zur zellabhängigen Lyse (ADCC) bei allen drei getesteten Zielzelllinien. Beide afucosylierten Antikörpervarianten steigern also die ADCC-Aktivität stärker als der Wildtyp Rituximab. Noch höhere Werte zeigte der doppelt optimierte Antikörper RTX-EFTAE-Lec13, der afucosyliert ist und die EFTAE-Modifikation besitzt. Er erhöht noch effektiver die ADCC als die Variante RTX-wt-Lec13. Der Unterschied zwischen den beiden Varianten erreichte jedoch kein signifikantes Niveau. Bei den Chromfreisetzungsexperimenten sind die verschiedenen Probanden, mit deren Blut die Versuche durchgeführt wurden, nicht genetisch auf ihre FcγRIIIa-Varianten getestet worden.



**Abbildung 14. Chromfreisetzungsexperimente zur Analyse der ADCC-Aktivität.** (A) ADCC von Varianten des Antikörpers Rituximab (RTX) oder dem Wildtyp (wt) im Vergleich zu HER2-Kontrollantikörpern (IgG1), jeweils mit oder ohne Proteinsubstitution (EFTAE) und glykooptimiert (Lec13) oder nicht glykooptimiert (CHO). Getestet im Chromfreisetzungsexperiment mit Daudi-Zellen als Zielzellen und humanen MNCs als Effektorzellen. Die Antikörpervarianten wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugegeben. Die Grafik zeigt die Mittelwerte ± SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Konstrukten wurden angezeigt (\*,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ). (B) Dosisabhängige ADCC gegen Daudi ( $n = 3$ ), MEC-2 ( $n = 4$ ) und GRANTA-519 ( $n = 4$ ) durch die Rituximabvarianten mit MNCs als Effektorzellen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lysewerten

*der Zielzellen durch die Fc-veränderten Antikörpern und den Messwerten der nativen CD20-IgG1-Moleküle wurden markiert (\*,  $p < 0,05$ ). Aus Wirt et al. 2017 mit Genehmigung des Verlags S. Karger.*

## 4 Diskussion

### 4.1 Optimierung monoklonaler Antikörper durch Fc-Engineering

Die Entwicklung therapeutischer Antikörper hat in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung in der Tumorthherapie eingenommen. Dass Fc-Engineering eine gute Strategie ist, um die Effektivität der Lyse von Tumorzellen zu erhöhen, und somit zur Optimierung von Antikörpern führen kann, wurde bereits gezeigt (4). Mit dem Ansatz des Fc-Engineerings können die Effektormechanismen zur ADCC- ebenso wie zur CDC-Aktivität verbessert werden. Bei dem Versuch, die CDC- und ADCC-Fähigkeit in ein und demselben Antikörper zu verbessern, wurde eine doppelt Fc-optimierte Variante von Rituximab hergestellt, indem die Technologien sowohl des Glyko-Engineerings als auch des Protein-Engineerings angewandt und miteinander kombiniert wurden. Der doppelt optimierte afucosylierte Antikörper mit der EFTAE-Modifikation (52) zeigte in vitro signifikant gesteigerte Lyseraten gegen Leukämiezellen und Lymphomzellen. Sowohl durch CDC als auch durch ADCC konnten die Lyseraten unterschiedlicher Zielzellen im Vergleich zu den Raten bei dem nativen Antikörper Rituximab gesteigert werden. Mit den Versuchen wurde bewiesen, dass die Kombination aus Glyko- und Protein-Manipulationen in ein und demselben Antikörper die Lyse von Tumorzellen durch ADCC und CDC in vitro signifikant verbessern kann.

Obwohl die Antikörpertherapie immer weiter an Bedeutung zunimmt (1, 42), sind bisher keine Antikörper, die CDC-optimiert wurden, zur klinischen Anwendung zugelassen worden, während zwei Glyko-optimierte Antikörper (Mogamulizumab und Obinutuzumab) mit verbesserter ADCC-Fähigkeit bereits eingesetzt werden.

### 4.2 Die Rolle der ADCC und der CDC in der Antikörpertherapie

Zur Klärung der Frage, welche Rolle ADCC und CDC bei der Tumorthherapie spielen, wurden in Publikationen Versuche mit unterschiedlichen murinen

Modellen beschrieben. Aus den Ergebnissen ergibt sich keine eindeutige Antwort auf die Frage, welche Rollen ADCC und CDC in vivo spielen. Während Di Gaetano et al. 2003 in ihrer Untersuchung zur Wirkweise von Rituximab im Mausmodell mit Knockoutmäusen ohne C1q gegen Lymphomzellen zu dem Ergebnis kamen, dass dem Komplementsystem eine große Bedeutung zukommt (67), schlossen de Haij et al. 2010 aus ihren Versuchen im Mausmodell, dass ADCC in vivo gegen CD20-positive lymphoide Tumoren der entscheidende Wirkmechanismus sei. Bei den Versuchen von de Haij et al. 2010 wurden Mäuse mit normaler FcR-Expression genutzt, aber das FcR-Signal wurde durch eine Mutation an der zugehörigen Gamma-Kette inaktiviert. Bei diesen Mäusen konnte trotz der normalen Fähigkeit zur Bindung mit Immunkomplexen weder durch Ofatumumab noch durch Rituximab eine signifikante Lyse von Lymphomzellen gemessen werden (69). Bei weiteren klinischen Studien zeigte sich allerdings, dass Patienten während einer Behandlung mit Rituximab durch die Gabe von Plasma als Quelle für Komplement profitiert haben könnten und dass das Komplementsystem verbraucht wurde, was ein Hinweis auf die Effektorfunktion durch das Komplementsystem sein könnte (79).

Beers et al. stellten bereits 2008 eine Antikörpervariante von Rituximab (Mutation im Fc-Teil K322A) her, durch die bekannterweise im Mausmodell kaum Lyse von Tumorzellen durch Komplement möglich ist. Von dieser Modifikation abgesehen ist der Antikörper unverändert geblieben gegenüber dem nativen Rituximab. Es wurden keine Nachteile hinsichtlich der zellabhängigen Lyse durch den modifizierten Antikörper im Vergleich zum Wildtyp Rituximab nachgewiesen. Bei den Versuchen im Mausmodell zeigten beide Antikörper die gleichen Lyseraten, was darauf hinweist, dass im Tiermodell die CDC eine untergeordnete Rolle spielt und dass die Modifikation weder hilfreich noch störend ist (84). Die Autoren vermuteten, dass die Bindung zum Komplement die Lyse durch ADCC reduziert und dass hierin einer der Vorteile von Typ-II-Antikörpern gegenüber Typ-I-

Antikörpern bestehen könnte. Ein neu erstelltes Rituximab-Konstrukt wurde von Beers et al. in dieser Studie auch gegenüber Tositumomab getestet, einem Typ-II-Antikörper, der bessere Ergebnisse bei der Tumorlyse zeigte. Wang et al. schlossen aus ihren Untersuchungen ebenfalls, dass durch Bindung an Komplement die Lyse durch ADCC negativ beeinflusst wurde (85).

Um einen Hinweis auf den Mechanismus der Tumorlyse zu bekommen, wurde bei Patienten die Tumorcharakteristik im Hinblick auf ihre Zielantigene und auf ihre Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche untersucht. Diese Antigene auf der Zelloberfläche können Hinweise auf die Sensibilität des Tumors für CDC und ADCC bei einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern geben. Zum Beispiel können die Expression von Antigenen, die die Effektorzellaktivierung der ADCC hemmen, wie humane Leukozytenantigene oder CD47 (43, 86), und Rezeptoren, die die zelluläre Zytotoxizität fördern wie NKG2D (87), eine Rolle spielen. Desgleichen gibt es Faktoren wie die Expression von mCRP, die den Lysemechanismus durch CDC negativ beeinflussen können (88). Solche inhibierenden Faktoren könnten jedoch durch Engineering des Fc-Teils überwunden werden, wie unter anderem die vorliegende Studie zeigt. Zelllinien wie Mec-2 und GRANTA-519, welche eine hohe Anzahl an mCRP auf ihrer Oberfläche haben, konnten in vitro durch die Antikörper mit der EFTAE-Mutation auch gut durch die CDC lysiert werden. Beim Einsatz des nativen Rituximab-Antikörpers konnte auf diesen Zelllinien in vitro hinsichtlich dieses Mechanismus kaum bis gar keine Effektivität nachgewiesen werden.

Diebolder et al. haben zum weiteren Verständnis der Mechanismen, die zur Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper führen, beigetragen (56). Auf der Oberfläche können IgG-Antikörper, nachdem sie an ein Antigen auf der Zelloberfläche gebunden haben, ein geordnetes Hexamer bilden, an das C1, der erste Faktor des Komplementsystems, beziehungsweise C1q binden können. Dieses Hexamer aus Fc-Teilen der Antikörper scheint eine optimale Bindestelle für C1 und somit für die

Aktivierung des Komplementsystems darzustellen (89). Um diesen Mechanismus zu kopieren, wurden modifizierte CD20-Antikörper hergestellt (Mutation E345R, Glu345 → Arg), die besser aneinander binden und sich auch in Hexameren auf einer Zielzelle anordnen können. Es wurde gezeigt, dass die Bindung der modifizierten Antikörper an C1q fünffach und die Lyserate durch CDC sogar zehnfach erhöht war (56). Während in der vorliegenden Studie ein Ansatz zur parallelen doppelten Optimierung der Lyse mit CDC und ADCC durch Protein-Engineering und Glykooptimierung mit der EFTAE-Mutation und der Afucosylierung umgesetzt wurde, besteht die Strategie von Diebolder et al. darin, mittels eines modifizierten Antikörpers mit der Mutation E345R die Komplementaktivierung zu optimieren. Daten zur ADCC-Aktivität durch den E345R-modifizierten Antikörper wurden nicht dargestellt. Der E345R-modifizierte Antikörper hat auch mit anderen IgG-Isotypen die Komplementaktivierung verbessert und könnte ein fester Bestandteil in der Entwicklung effektiverer Antikörper werden, die das Komplementsystem stärker aktivieren.

### 4.3 Parallele Optimierung der ADCC und CDC

Ergebnisse von Tierversuchen, über die in einer Studie berichtet wurde, legen nahe, dass die Wirkmechanismen ADCC und CDC in vivo durch weitere Faktoren wie die anatomische Lokalität des Tumors und die Tumoralast beeinflusst werden (70). Während in diesen Versuchen eine niedrige Tumoralast durch CDC ausgelöscht werden konnte, waren bei einer höheren Tumoralast beide Mechanismen (Komplementsystem und ADCC) zum Töten der Tumorzellen notwendig. Zusätzlich wurde ein Einfluss auf die Antikörperfunktion im unmittelbaren Umfeld des Tumors nahegelegt. In transgenen Mäusen mit humanen CD20-Zellen wurde gezeigt, dass der Abbau von B-Zell-Lymphomen abhängig von verschiedenen Tumorlokalisationen durch verschiedene Wirkmechanismen wie CDC, ADCC und auch ADCP lysiert wurde (90). Während der Mechanismus zur

Eliminierung von B-Zellen in der Marginalzone stärker durch CDC eingeleitet wurde, konnte die Lyse von B-Zellen im Blut, in Lymphknoten, in folliculären B-Zellen und in der Milz verstärkt durch Effektorzellen als FcγR-vermittelte Lyse eingeleitet werden. Dieser Zusammenhang zeigt, dass bei bestimmten Konstellationen einer Tumorerkrankung beide Mechanismen, komplementabhängige Lyse und effektorzellabhängige Lyse zur suffizienten Tumoreradikation benötigt werden könnten, um alle Tumorzellen zu töten. Es ist zu vermuten, dass doppelt engierte Antikörper, die für CDC und ADCC optimiert wurden, wie zum Beispiel RTX-EFTAE-Lec13, in diesen Situationen gegenüber der korrespondierenden nativen Variante und auch gegenüber Varianten, die für nur einen Effektormechanismus optimiert wurden, entscheidende Vorteile hat. Das konnte zumindest durch signifikant bessere Ergebnisse im Chromfreisetzungsexperiment in dieser Studie gezeigt werden.

Das Optimieren von CDC und ADCC in Antikörpern durch Aminosäure-Manipulationen alleine ist sehr schwer zu erreichen. In einem früheren Ansatz wurde Fc-Glyko-Engineering mit einem gemischten IgG1/IgG3-Isotypen in einem Antikörper vereint, was in einer gesteigerten CDC- und ADCC-Aktivität resultierte (54). Die Ergebnisse der aktuellen Studie liefern profunde Nachweise dafür, dass auch durch die Kombination aus Fc-Protein- und Fc-Glyko-Engineering eine gesteigerte CDC- und ADCC-Aktivität erreicht werden kann. Typ-I-CD20-Antikörper sind bekannt für ihr starkes Potenzial, um ADCC und CDC zu triggern. Das ist zumindest teilweise der Charakteristik der Antigene der Zielzellen und deren bekannten Epitope zuzuschreiben (81). Der vorliegende Versuch des Doppelengineerings wurde bereits auch mit einem CD19-Antikörper, Tafasitamab durchgeführt (91). Es konnte gezeigt werden, dass durch Afucosylierung und durch die EFTAE-Mutation des Fc-Teils von Tafasitamab sowohl die ADCC als auch simultan die CDC-Aktivität des Antikörpers im Vergleich zur nativen Variante *in vitro* gesteigert wurde. Die beobachtete höhere ADCC-Fähigkeit mit MNC als Effektorzellen reflektiert mutmaßlich die NK-Zellaktivität in

Kurzzeit-Chromfreisetzungsexperimenten. Ob die afucosylierten Antikörper mit der EFTAE-Modifikation auch eine bessere Aktivierung der myeloiden Effektorzellen für ADCC und ADCP erreichen als der native Antikörper, sollte noch untersucht werden. Der Einfluss der EFTAE-Modifikation ist vermutlich stärker bei myeloiden Zellen ausgeprägt als bei NK-Zellen, da die Modifikation die Affinität zu dem aktivierenden FcγRIIa positiv beeinflusst (52). FcγRIIa und FcγRIIb werden jedoch nur von Makrophagen und von Monozyten exprimiert, nicht aber von NK-Zellen (92).

#### 4.4 Andere CD20-Antikörper

Rituximab ist ein Typ-I-CD20-Antikörper. Antikörper dieses Typs sind in der Lage, ADCC und CDC zu vermitteln. Durch Rituximab kam es bei der Therapie von B-Zelltumoren zu einem großen Fortschritt, nachweisbar aufgrund der Überlebensrate der Patienten. Im Jahr 2010 wurde der erste humanisierte Fc-engineerte CD20-Antikörper vom Typ II, Obinutuzumab, vorgestellt (47). Typ-II-Antikörper haben generell die Fähigkeit, neben der Lyse von Tumorzellen durch ADCC auch den direkten Zelltod und ADCP zu vermitteln. Sie können allerdings kaum das Komplementsystem aktivieren. Typ-I-Antikörper können im Vergleich zu Typ-II-Antikörpern stärker CDC induzieren, aber nur ganz schwach Lyse durch den direkten Zelltot vermitteln (62, 93). Aufgrund von Resistenzen und Rückfällen bei der Rituximab-Therapie ist Obinutuzumab eine Erweiterung bei der Therapie von B-Zelltumoren geworden und seit einigen Jahren zur Therapie der therapieresistenten CLL, eines follikulären Lymphoms, und beim indolenten Non-Hodgkin-Lymphom zugelassen (65). Durch das Glyko-Engineering ist die ADCC-induzierte Lyse mit Obinutuzumab sogar gegenüber Rituximab bei In-vitro- und bei In-vivo-Versuchen gesteigert (94).

Neben Rituximab und Obinutuzumab war Ofatumumab noch als ein weiterer CD20-Antikörper zur Therapie von malignen B-Zelltumoren zugelassen. Ofatumumab konnte jedoch keinen weiteren Nutzen als die bisherigen

Therapien bringen, und aus diesem Grund wurde das Medikament vom Hersteller wegen geringer Nachfrage im April 2019 für die Therapie von B-Zelltumoren zurückgezogen. Der Antikörper ist weiterhin zur Therapie der Multiplen Sklerose zugelassen. Ofatumumab bindet an ein anderes Epitop von CD20, und Bologna et al. konnten bei Versuchen zeigen, dass bei Experimenten mit Vollblut eine höhere Lyserate zu erreichen war als durch Rituximab (66). Hauptsächlich war die Lyse durch CDC bei In-vitro-Versuchen mit Ofatumumab optimiert.

Als Erklärungen für die Resistenzen und die Rückfälle bei der Rituximab-Therapie beim B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom werden die nachfolgend aufgezählten unterschiedlichen Mechanismen diskutiert: gesteigerter Metabolismus monoklonaler Antikörper, eingeschränkte Tumorpenetration, reduzierte Bindung der Antikörper durch FcγRIII-Polymorphismen, Resistenzen gegenüber den Effektormechanismen, Depletion von Komplement, abnormale Lipid-raft-Kompositionen einiger maligner B-Zellen, Herunterregulierung proapoptotischer Faktoren, Beeinträchtigungen der Effektorzellrekrutierung und -funktion (95, 96). Bei CLL-Zellen wurden weitere mögliche Mechanismen zur Resistenzentwicklung beschrieben. Einer davon ist das sogenannte *shaving*, ein Begriff, mit dem beschrieben wird, dass der CD20-Komplex durch Monozyten und Makrophagen von den Oberflächen entfernt wird. Dieser Mechanismus, den die Monozyten und Makrophagen ausüben, wird auch Trogozytose genannt (97). Um die Resistenzmechanismen zu überwinden, ist es wichtig, dass die Wirkmechanismen der Antikörper noch besser verstanden werden. Auf dieser Grundlage können neue Antikörper gezielt entwickelt werden, also effizienter verändert und weiter optimiert werden. Eine Neuerung war die Herstellung des humanisierten und Glyko-engineerten Typ-II-Antikörpers Obinutuzumab, der inzwischen den Weg in den klinischen Alltag gefunden hat. Obinutuzumab übersteigt die Lyseraten von Rituximab in vivo bei vielen B-Zelltumoren und konnte auch noch Tumorzellen lysieren, die gegen Rituximab Resistenzen entwickelt hatten (47). In einer Phase-III-Studie

wurde bei CLL-Patienten gezeigt, dass die Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil im Vergleich zu einer Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil überlegen ist, und die Zeit, ohne dass eine weitere Therapie gestartet werden musste, signifikant länger war (98).

Um die Effektivität von Antikörpertherapien noch weiter zu steigern, werden zurzeit viele Therapien aus Kombinationen mit Rituximab oder dem Glyko-engineerten Antikörper Obinutuzumab, mit und ohne Chemotherapie oder kombiniert mit weiteren Antikörpern mit anderen Strategien als klassische Antikörper getestet. Beispiele dafür sind Obinutuzumab in Kombination mit dem Checkpointinhibitor (anti-PD-L1) Atezolizumab, Obinutuzumab mit Lenalidomide (Immunmodulator) oder die Kombination von Rituximab oder Obinutuzumab mit Polatuzumab vedotin (anti-CD79b) (96). Man erhofft sich durch die Kombinationen synergistische Effekte und optimierte Ergebnisse bei der Therapie.

Zusammenfassend wurden für diese Arbeit verschiedene optimierte Antikörpervarianten von Rituximab hergestellt und diese in vitro an verschiedenen Tumorzellen getestet. Es wurde gezeigt, dass die ADCC- und CDC-Aktivität in einem therapeutischen Antikörper gesteigert werden kann, indem man Fc-Glyko-Engineering- und Fc-Protein-Engineering-Technologien in einem Antikörper gleichzeitig zusammenbringt. Es wurde ein afucosylierter Antikörper mit EFTAE-Modifikation hergestellt, was in vitro zu signifikant höherer CDC- und signifikant höherer ADCC-Aktivität geführt hat. Diese Strategie könnte auch für die Herstellung weiterer optimierter Antikörper eine interessante Möglichkeit darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Trotz der Erfolge, die mit therapeutischen Antikörpern in der Behandlung maligner Erkrankungen erzielt werden, ist die Prognose noch nicht zufriedenstellend, und Rezidive stellen ein Problem dar. Es wurde bereits gezeigt, dass Fc-Engineering attraktive Verbesserungsmöglichkeiten, zum Beispiel durch Glyko- und Protein-Engineering, bietet. Daher wurden in der vorliegenden Studie Glyko-Engineering (Afucosylierung) und Protein-Engineering (EFTAE) am Fc-Teil kombiniert.

Ziel dieser Arbeit war es also, verschiedene Fc-modifizierte Varianten des CD20-Antikörpers Rituximab herzustellen und diese funktional zu vergleichen. Dafür wurde bei dem CD20-Antikörper Rituximab an 5 Stellen eine Aminosäure-Austausch (S267E/H268F/S324T/G236A/I332E, bekannt als EFTAE) vorgenommen, um die C1q-Bindung und CDC zu verbessern. Zum anderen wurde die Zuckerstruktur durch Verminderung der Fucosylierung am N297-Oligosaccharid verändert, um gleichzeitig auch die Bindung an FcR zu verbessern und so die ADCC zu steigern. Die Proteine wurden affinitätschromatografisch gereinigt und zeigten die erwarteten Antigen-Bindungseigenschaften. Afucosylierte Antikörper banden FcR mit höherer Affinität, während die EFTAE-Modifikation zu einer gesteigerten C1q-Bindung führte. In Zytotoxizitätsexperimenten zeigte sich, dass die Kombination dieser Glyko-Optimierung und der gentechnischen Protein-Optimierungen in vitro simultan die Fähigkeit der CDC und der ADCC steigert. Sogar Tumorzelllinien, die ohne optimierende Maßnahmen nicht durch das Komplementsystem mit Rituximab zu lysieren sind wie GRANTA-519 und Mec-2, da diese gegen den Effektormechanismus der CDC mehrere mCRP auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigten gute Lyseraten durch CDC mit den optimierten Varianten mit der EFTAE-Modifikation. Die Strategie des Doppelengineerings mit Glyko- und Protein-Optimierungen ist ein guter Ansatz, um die Antikörpertherapie auch mit weiteren IgG1-Isotypen weiterzuentwickeln und Versuche bis hin zu klinischen Versuchen durchzuführen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Weiner GJ. (2015): Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015/15(6):361-70.
2. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. (2012): Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012/12(4):278-87.
3. Chaicumpa W, Thin-Inta W, Khusmith S, Tapchaisri P, Echeverria P, Kalambaheti T, et al. (1988): Detection with monoclonal antibody of Salmonella typhi antigen 9 in specimens from patients. *Journal of clinical microbiology*. 1988/26(9):1824-30.
4. Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, Klausz K, Peipp M. (2017): Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother*. 2017/44(5):327-36.
5. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. (2020): Antibodies to watch in 2020. *MAbs*. 2020/12(1):1703531.
6. Köhler G, Milstein C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975/256(5517):495-7.
7. Oldham RK, Dillman RO. (2008): Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol*. 2008/26(11):1774-7.
8. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. (1998): Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998/16(8):2825-33.
9. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. (1984): Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984/81(21):6851-5.
10. LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, Haynes A, Rogers K, Harvey EB, et al. (1989): Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989/86(11):4220-4.
11. Scott SD. (1998): Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer practice*. 1998/6(3):195-7.
12. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. (1988): Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988/332(6162):323-7.
13. Chaisri U, Chaicumpa W. (2018): Evolution of Therapeutic Antibodies, Influenza Virus Biology, Influenza, and Influenza Immunotherapy. *BioMed research international*. 2018/9747549.
14. Bruggemann M, Caskey HM, Teale C, Waldmann H, Williams GT, Surani MA, et al. (1989): A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989/86(17):6709-13.
15. Lonberg N, Huszar D. (1995) Human antibodies from transgenic mice. *International reviews of immunology*. 1995/13(1):65-93.
16. Green LL. (1999): Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*. 1999/231(1-2):11-23.

17. Ouisse LH, Gautreau-Rolland L, Devilder MC, Osborn M, Moyon M, Visentin J, et al. (2017): Antigen-specific single B cell sorting and expression-cloning from immunoglobulin humanized rats: a rapid and versatile method for the generation of high affinity and discriminative human monoclonal antibodies. *BMC biotechnology*. 2017/17(1):3.
18. Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T, Hust M, et al. (2017): Designing Human Antibodies by Phage Display. *Transfus Med Hemother*. 2017/ Sep;44(5):312-318.
19. Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, McCafferty J, Laustsen AH. (2018): Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins (Basel)*. 2018/10(6):236.
20. Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. (2016): Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MAbs*. 2016/8(7):1177-94.
21. Kellner C, Derer S, Klausz K, Roskopf S, Wirt T, Rosner T, et al. (2018): Fc Glyco- and Fc Protein-Engineering: Design of Antibody Variants with Improved ADCC and CDC Activity. *Methods Mol Biol*. 2018/1827:381-97.
22. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, et al. (2003): Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003/21(1):60-5.
23. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. (2009): Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*. 2009/157(2):220-33.
24. Fonseca MHG, Furtado GP, Bezerra MRL, Pontes LQ, Fernandes CFC. (2018): Boosting half-life and effector functions of therapeutic antibodies by Fc-engineering: An interaction-function review. *International journal of biological macromolecules*. 2018/119:306-11.
25. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. (2010): Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010/28(19):3167-75.
26. Stenehjem DD, Tran D, Nkrumah MA, Gupta S. (2018): PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *OncoTargets and therapy*. 2018/11:5973-89.
27. Carter CA, Oronsky BT, Roswarski J, Oronsky AL, Oronsky N, Scicinski J, et al. (2017): No patient left behind: The promise of immune priming with epigenetic agents. *Oncoimmunology*. 2017/Aug 30;6(10):e1315486.
28. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010/363(8):711-23.
29. Ehrlich P. (1913): Address in Pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br Med J*. Aug 1913/16;2(2746):353-9.
30. Polson AG, Yu SF, Elkins K, Zheng B, Clark S, Ingle GS, et al. (2007): Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007/110(2):616-23.
31. Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, Gangwar S, Schroeder GM, Vite GD, et al. (2014): Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug discovery today*. 2014/19(7):869-81.
32. Krishnamurthy A, Jimeno A. (2018): Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacology & therapeutics*. 2018/185:122-34.

33. Bruenke J, Fischer B, Barbin K, Schreiter K, Wachter Y, Mahr K, et al. (2004): A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and FcγRIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells. *Br J Haematol.* 2004/125(2):167-79.
34. Viardot A, Bargou R. (2019): Bispecific antibodies in haematological malignancies. *Clin Pharmacol Ther.* 2019/Oct; 106(4): 781–791.
35. Viardot A, Locatelli F, Stieglmaier J, Zaman F, Jabbour E. (2020): Concepts in immuno-oncology: tackling B cell malignancies with CD19-directed bispecific T cell engager therapies. *Ann Hematol.* 2020/99(10):2215-29.
36. Liu J, Zhao Q, Zhao B, Cheng J, Wang X, Song L, et al. (2005): A new format of single chain tri-specific antibody with diminished molecular size efficiently induces ovarian tumor cell killing. *Biotechnology letters.* 2005/27(22):1821-7.
37. Tong C, Zhang Y, Liu Y, Ji X, Zhang W, Guo Y, et al. (2020): Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood.* 2020/136(14):1632-44.
38. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. (2004): Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol.* 2004/172(1):104-13.
39. Townsend MH, Shrestha G, Robison RA, O'Neill KL. (2018): The expansion of targetable biomarkers for CAR T cell therapy. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR.* 2018/37(1):163.
40. Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, et al. (2008): Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008/112(6):2261-71.
41. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. (2014) Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev.* 257(1):107-26.
42. Kellner C, Derer S, Valerius T, Peipp M. (2014): Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions. *Methods.* 2014/65(1):105-13.
43. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. (2010): Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010/28(28):4390-9.
44. Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brunker P, Umana P. (2006): The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem.* 2006/281(8):5032-6.
45. Ferrara C, Grau S, Jager C, Sondermann P, Brunker P, Waldhauer I, et al. (2011): Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011/108(31):12669-74.
46. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. (2002): Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 2002/277(30):26733-40.
47. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, et al. (2010): Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* 2010/115(22):4393-402.

48. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. (2014): Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England journal of medicine*. 2014/370(12):1101-10.
49. Illidge T, Klein C, Sehn LH, Davies A, Salles G, Cartron G. (2015): Obinutuzumab in hematologic malignancies: lessons learned to date. *Cancer Treat Rev*. 2015/41(9):784-92.
50. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. (2006): Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006/103(11):4005-10.
51. Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, et al. (2008): Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res*. 2008/68(19):8049-57.
52. Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. (2010): Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010/2(2):181-9.
53. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, et al. (2001): Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*. 2001/166(4):2571-5.
54. Natsume A, In M, Takamura H, Nakagawa T, Shimizu Y, Kitajima K, et al. (2008): Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res*. 2008/68(10):3863-72.
55. Rosner T, Derer S, Kellner C, Dechant M, Lohse S, Vidarsson G, et al. (2013): An IgG3 switch variant of rituximab mediates enhanced complement-dependent cytotoxicity against tumour cells with low CD20 expression levels. *Br J Haematol*. 2013/161(2):282-6.
56. Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. (2014): Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*. 2014/343(6176):1260-3.
57. Schneider S, Zacharias M. (2012): Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol*. 2012/51(1):66-72.
58. Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. (2001): The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem*. 2001/276(19):16469-77.
59. Sonderrmann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. (2000): The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ<sub>3</sub> complex. *Nature*. 2000/406(6793):267-73.
60. Wirt T, Roskopf S, Rösner T, Eichholz KM, Kahrs A, Lutz S, et al. (2017): An Fc Double-Engineered CD20 Antibody with Enhanced Ability to Trigger Complement-Dependent Cytotoxicity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Transfus Med Hemother*. 2017/Sep;44(5):292-300.
61. Lim SH, Levy R. (2014): Translational medicine in action: anti-CD20 therapy in lymphoma. *J Immunol*. 2014/193(4):1519-24.
62. Rougé L, Chiang N, Steffek M, Kugel C, Croll TI, Tam C, et al. (2020): Structure of CD20 in complex with the therapeutic monoclonal antibody rituximab. *Science*. 2020/367(6483):1224.
63. Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, et al. (2008): Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2008/283(25):16971-84.

64. Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. (2016): The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunology & Cell Biology*. 2016/94(1):11-23.
65. Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, Elmacken M, Sabulski A, Barth MJ, et al. (2015): Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20(+) rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20(+) BL and pre-B-ALL. *Br J Haematol*. 2015/Dec;171(5):763-75.
66. Bologna L, Gotti E, Da Roit F, Intermesoli T, Rambaldi A, Introna M, et al. (2013): Ofatumumab is more efficient than rituximab in lysing B chronic lymphocytic leukemia cells in whole blood and in combination with chemotherapy. *J Immunol*. 2013/190(1):231-9.
67. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, et al. (2003): Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003/171(3):1581-7.
68. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000/6(4):443-6.
69. de Haij S, Jansen JH, Boross P, Beurskens FJ, Bakema JE, Bos DL, et al. (2010): In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res*. 2010/70(8):3209-17.
70. Boross P, Jansen JH, de Haij S, Beurskens FJ, van der Poel CE, Bevaart L, et al. (2011): The in vivo mechanism of action of CD20 monoclonal antibodies depends on local tumor burden. *Haematologica*. 2011/96(12):1822-30.
71. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. (2002): Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002/299(3):754-8.
72. Weng WK, Levy R. (2003): Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003/21(21):3940-7.
73. Persky DO, Dornan D, Goldman BH, Braziel RM, Fisher RI, Leblanc M, et al. (2012): Fc gamma receptor 3a genotype predicts overall survival in follicular lymphoma patients treated on SWOG trials with combined monoclonal antibody plus chemotherapy but not chemotherapy alone. *Haematologica*. 2012/97(6):937-42.
74. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. (2008): Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008/26(11):1789-96.
75. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, et al. (2009): Impact of FcγRIIIa-FcγRIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009/27(7):1122-9.
76. Veeramani S, Wang SY, Dahle C, Blackwell S, Jacobus L, Knutson T, et al. (2011): Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism.

- Blood. 2011/118(12):3347-9.
77. Weng WK, Levy R. (2001): Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001/98(5):1352-7.
  78. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, et al. (2004): Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2004/172(5):3280-8.
  79. Klepfish A, Schattner A, Ghoti H, Rachmilewitz EA. (2007): Addition of fresh frozen plasma as a source of complement to rituximab in advanced chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007/8(4):361-2.
  80. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, Pearson M, Young D, Reed JC, et al. (2003): Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003/ 21(8):1466-71.
  81. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PW, Glennie MJ, Cragg MS. (2010): Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010/95(1):135-43.
  82. Repp R, Kellner C, Muskulus A, Staudinger M, Nodehi SM, Glorius P, et al. (2006): Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *Journal of immunological methods*. 2006/373(1-2):67-78.
  83. Patnaik SK, Stanley P. (2006): Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. *Methods Enzymol*. 2006/416:159-82.
  84. Beers SA, Chan Ch Fau - James S, James S Fau - French RR, French Rr Fau - Attfield KE, Attfield Ke Fau - Brennan CM, Brennan Cm Fau - Ahuja A, et al. (2008): Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*. 2008/Nov 15;112(10):4170-7.
  85. Wang SY, Racila E Fau - Taylor RP, Taylor Rp Fau - Weiner GJ, Weiner GJ. (2008): NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*. 2008/Feb 1;111(3):1456-63.
  86. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. (2010): Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*. 2010/142(5):699-713.
  87. Inagaki A, Ishida T, Yano H, Ishii T, Kusumoto S, Ito A, et al. (2009): Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer*. 2009/125(1):212-21.
  88. Meyer S, Leusen JH, Boross P. (2014): Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs*. 2014/6(5):1133-44.
  89. Melis JP, Strumane K, Ruuls SR, Beurskens FJ, Schuurman J, Parren PW. (2015): Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Mol Immunol*. 2015/Oct;67(2 Pt A):117-30.
  90. Gong Q, Ou Q, Ye S, Lee WP, Cornelius J, Diehl L, et al. (2005): Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol*. 2005/174(2):817-26.
  91. Roßkopf S, Eichholz KM, Winterberg D, Diemer KJ, Lutz S, Münnich IA, et al. (2020): Enhancing CDC and ADCC of CD19 Antibodies by Combining Fc Protein-Engineering with Fc Glyco-Engineering. *Antibodies (Basel)*. 2020/ 9(4).

92. Nimmerjahn F, Ravetch JV. (2007): Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol.* 2007/19(2):239-45.
93. Kumar A, Planchais C, Fronzes R, Mouquet H, Reyes (2020): N. Binding mechanisms of therapeutic antibodies to human CD20. *Science.* 2020/369(6505):793-9.
94. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, et al. (2013): Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther.* 2013/12(10):2031-42.
95. Alduaij W, Illidge TM. (2011): The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood.* 2011/Mar 17;117(11):2993-3001.
96. Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G. (2017): 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):324-56.
97. Beum PV, Lindorfer Ma Fau - Taylor RP, Taylor RP. (2008): Within peripheral blood mononuclear cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-opsonized Daudi cells is promoted by NK cells and inhibited by monocytes due to shaving. *J Immunol.* 2008/Aug 15;181(4):2916-24.
98. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LF, et al. (2015): Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia.* 2015/Jul;29(7):1602-4.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Funktionen therapeutischer IgG1-Antikörper...	1
Abbildung 2: Zunehmende Bedeutung therapeutischer Antikörper in klinischen Studien von 2010 bis 2020.....	2
Abbildung 3: Entwicklung therapeutischer Antikörper.....	4
Abbildung 4: Darstellung der an Asparagin (N297) gebundenen Oligosacharidkette.....	9
Abbildung 5: Vergleich der ADCC-induzierten Chromfreisetzung von unterschiedlichen glyko-optimierten Antikörpern und nativem Typ.....	27
Abbildung 6: Generation von Varianten des Antikörpers Rituximab mit verändertem Fc-Teil.....	29
Abbildung 7: Vergleich des Fucosylierungsstatus der hergestellten IgG1-Antikörper-Varianten.....	30
Abbildung 8: Bindung der hergestellten Antikörper an CD20.....	32
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Bindungskurven zu CD20.....	33
Abbildung 10: C1q-Bindungsfähigkeit der Antikörpervarianten im Vergleich.....	34
Abbildung 11: CDC-Lyseraten der verschiedenen Antikörpervarianten...	36

Abbildung 12: Expression von komplementregulatorischen Proteinen auf unterschiedlichen Zelllinien.....	38
Abbildung 13: FcγRIIIa-Bindung durch Rituximabvarianten.....	40
Abbildung 14. Chromfreisetzungsexperimente zur Analyse der ADCC-Aktivität.....	42
<b>7.2 Tabellenverzeichnis</b>	
Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	14
Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper.....	15

### 7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Matthias Peipp und meinem Betreuer Christian Kellner, die diese Arbeit ermöglicht haben und mich bestens betreut und unterstützt haben.

Zusätzlich möchte ich dem ganzen Labor-Team vom Dr. Mildred-Scheel-Haus meinen Dank aussprechen, für allzeit gute Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Problemen während der Experimente, und während der weiteren Laborarbeit. Hier möchte ich ganz besonders Britta von Below, Anja Muskulus, und Dr. Katja Klausz nennen, und mich für die große Unterstützung bedanken.

Ich danke auch meiner Familie, und meiner Frau die mich immer motiviert und unterstützt haben diese Arbeit anzufertigen. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter für das Lektorat bedanken.

## 7.4 Publikationen

### Zitierfähige Abstracts:

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

### Originalarbeiten:

Wirt,T., Roskopf,S., Rösner,T., Eichholz,K.M., Kahrs,A., Lutz,S., Kretschmer,A., Valerius,T., Klausz,K., Otte,A., Gramatzki,M., Peipp,M., Kellner,C.(2017): An Fc double-engineered CD20 antibody with enhanced ability to trigger complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transfus. Med. Hemother*, 44, 292–300.

### Buchkapitel:

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